



# 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

# STUDIUM PROTINÁDOROVÉ A ANTIMETASTATICKÉ AKTIVITY NOVÉHO KOMPLEXU PLATINY OBSAHUJÍCÍHO INHIBITOR PROTEINOVÝCH KINÁZ A STAT INHIBITOR

STUDY OF ANTICANCER AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF A NOVEL PLATINUM COMPLEX  
CONTAINING PROTEIN KINASE INHIBITOR AND STAT INHIBITOR

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Urbaníková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Lenka Marková, Ph.D.

BRNO 2024

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1997/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Lucie Urbaníková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Mgr. Lenka Marková, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Studium protinádorové a antimetastatické aktivity nového komplexu platiny obsahujícího inhibitor proteinových kináz a STAT inhibitor

### Zadání bakalářské práce:

1. Sepsání rešerše zaměřené na téma nových protinádorových komplexů obsahujících ve své molekule těžký kov a zároveň jinou biologicky aktivní látku (př. inhibitory tyrozinových kináz, STAT inhibitory apod.).
2. Seznámit se a provést laboratorní práce s buněčnými kulturami.
3. Provést experimenty ke stanovení cytotoxicity nového Pt(IV) komplexu na vybraných lidských nádorových liniích.
4. Stanovit akumulaci komplexu v buňkách a na jaderné DNA v porovnání s cisplatinou.
5. Studovat antimigrační vlastnosti nového Pt komplexu metodou zacelování jizvy.
6. Příprava 3D kultur a sledování vlivu komplexu na velikost a soudržnost vzniklých sferoidů.
7. Výsledky pro nový Pt komplex porovnat s výsledky získanými při aplikaci jednotlivých složek či jejich mixu. Vyvodit závěry, zda spojení inhibitorů a platiny do jednoho komplexu přináší výhody či ne, oproti simultánní aplikaci jednotlivých složek (v mixu).

## **Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:**

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

-----

Lucie Urbaníková  
studentka

Mgr. Lenka Marková, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

-----

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Nádorová onemocnění stále představují výzvu v hledání účinné terapie. Jednou z možností je chemoterapie, která využívá nově syntetizované a testované platinové komplexy s potenciálem v léčbě nádorových onemocnění. Cílem této práce bylo zkoumat antiproliferativní aktivitu nového platinového komplexu, jeho průnik a akumulaci v nádorových buňkách a také jeho antimigrační vlastnosti.

Antiproliferativní aktivita byla hodnocena pomocí MTT testu a CellTiterGLO assay. Průnik a akumulace komplexu byly studovány metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Antimigrační vlastnosti byly zkoumány pomocí metody zacelování jizvy.

Komplex prokázal účinnou antiproliferativní aktivitu, průnik a akumulaci v nádorových buňkách. Zároveň byly potvrzeny jeho antimigrační vlastnosti.

## **ABSTRACT**

Tumor diseases continue to pose a challenge in the search for effective therapy. One option is chemotherapy, which utilizes newly synthesized and tested platinum complexes with potential in cancer treatment. The aim of this study was to investigate the antiproliferative activity of a new platinum complex, its penetration and accumulation in tumor cells, as well as its antimigratory properties.

Antiproliferative activity was assessed using the MTT test and CellTiterGLO assay. Complex penetration and accumulation were studied using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Antimigratory properties were examined through scratch assays.

The complex demonstrated effective antiproliferative activity, penetration, and accumulation in tumor cells. Additionally, its antimigratory properties were confirmed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

platinové komplexy, antiproliferativní aktivita, dasatinib, cisplatina, HJC0152, nádorové buněčné linie

## **KEY WORDS**

platinum complexes, antiproliferative activity, dasatinib, cisplatin, HJC0152, cancer cell lines

URBANÍKOVÁ, Lucie. Studium protinádorové a antimetastatické aktivity nového komplexu platiny obsahujícího inhibitor proteinových kináz a STAT inhibitor. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/157259>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Mgr. Lenka Marková, Ph.D.

## **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.

.....

Lucie Urbaníková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lence Markové, Ph.D. za mnoho potřebných rad, velký prostor, pevné nervy a podporu mého výzkumu. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Smetanovi, Ph.D. za cenné rady v průběhu mého vypracování závěrečné práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým kamarádům, blízkým a rodině za podporu během celého mého studia.

## OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
	2.1 Nádorová onemocnění.....	9
	2.2 Terapie nádorového onemocnění.....	10
	2.2.1 Metalofarmaka.....	10
	2.2.1.1 Cisplatina a její deriváty.....	11
	2.2.1.2 Pt (IV) komplexy.....	15
	2.2.2 Terapie nádorových onemocnění – inhibitory.....	16
	2.2.2.1 Inhibitory Src kináz – dasatinib.....	16
	2.2.2.2 Inhibitory STAT3 – HJC.....	17
	2.2.3 Kombinovaná terapie.....	19
3	Cíl práce.....	21
4	Experimetální část.....	22
	4.1 Testované sloučeniny a použité buněčné linie.....	22
	4.2 Rozmražení buněk.....	22
	4.3 Příprava zásobních roztoků.....	23
	4.4 Pasážování adherentních buněk.....	23
	4.5 MTT test.....	23
	4.6 Kultivace 3D sferoidů.....	24
	4.7 Stanovení cytotoxicity komplexů na 3D sferoidech.....	24
	4.8 Akumulace komplexů v buňkách.....	24
	4.9 Stanovení vazby komplexu na jadernou DNA.....	24
	4.10 Stanovení buněčné smrti.....	25
	4.11 Metoda zacelování jizvy.....	25
5	Výsledky a diskuze.....	26
	5.1 Stanovení protinádorové účinnosti.....	26
	5.2 MTT na 2D adherentních buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231.....	26
	5.3 CellTiterGlo na 3D sferoidech generovaných z MCF-7 a MDA-MB-231 buněčných linií.....	26
	5.4 Akumulace komplexů v buňkách.....	29
	5.5 Vazba komplexu na jadernou DNA.....	31
	5.6 Účinnost komplexů v NER-deficientní buněčné linii.....	32

5.7 Stanovení buněčné smrti.....	33
5.8 Stanovení antimigračních vlastností komplexu metodou zacelování jizvy.....	34
6 Závěr .....	37
Seznam použitých zdrojů.....	38
Seznam použitých zkratek a symbolů .....	43

## 1 ÚVOD

V současné době jsou nádorová onemocnění velmi rozšířená. Jejich léčba zahrnuje různé metody, a jednou z nich je chemoterapie, kdy jsou k léčbě nádorů využívána léčiva, tzv. chemoterapeutika. Tyto léky působí na rakovinné buňky takovým způsobem, že jednak narušují jejich rychlé dělení, čímž zastaví nekontrolovanou proliferaci nádoru či mohou způsobovat přímo buněčnou smrt nádorových buněk. Cytostatických či cytotoxických léčiv používaných k léčbě nádorových onemocnění je celá řada. Zajímavou skupinou jsou léčiva zahrnujících ve své struktuře těžký kov, tzv. metalofarmaka. Velkou výhodou metalofarmak je jejich chemická rozmanitost. Nejznámější skupinou metalofarmak jsou komplexy s centrálním kovem platiny. Platinové komplexy se již v dnešní době hojně využívají v klinické praxi. Mezi platinové komplexy se řadí cisplatina a i se svými deriváty oxaliplatinou, karboplatinou, nedaplatinou, heptaplatinou a lobaplatinou.

Bohužel léčba spojená s metalofarmaky s sebou nese celou řadu nežádoucích účinků, jakými jsou nefrotoxicita, ototoxicita apod. či jejich neúčinnost u nádorů s vrozenou či postupem času získanou rezistencí. V současnosti jsou hledána nová léčiva, která by byla schopná výše zmíněným nežádoucím účinkům předejít. Zajímavým přístupem je spojení více biologicky aktivních látek do jedné molekuly, což umožňují právě látky obsahující ve své struktuře těžký kov.

Předkládaná práce se zabývá jedním z těchto nových léčiv, kdy je v jedné molekule spojena cisplatina, inhibitor tyrozinových kináz dasatinib a STAT inhibitor HJC0152.

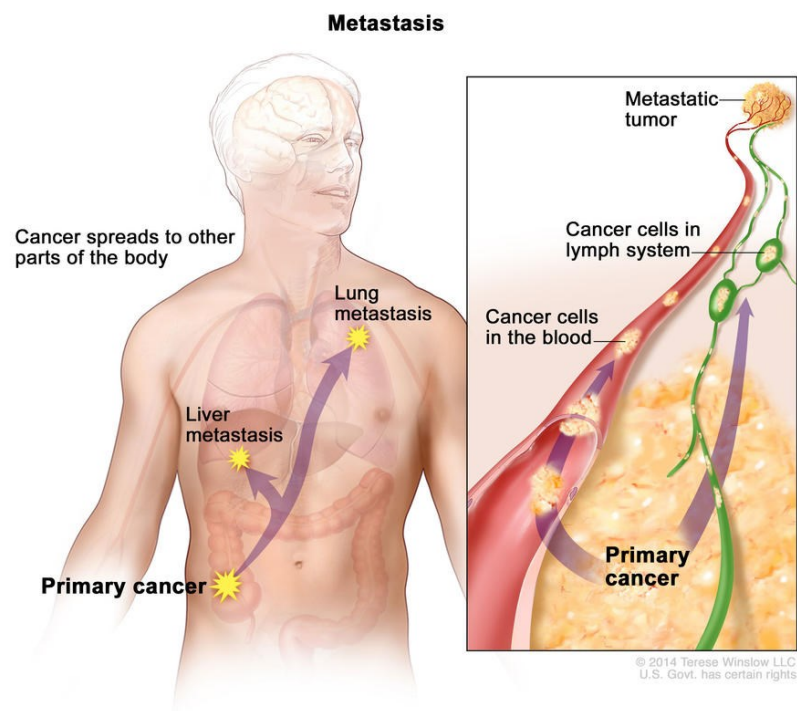


## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nádorová onemocnění

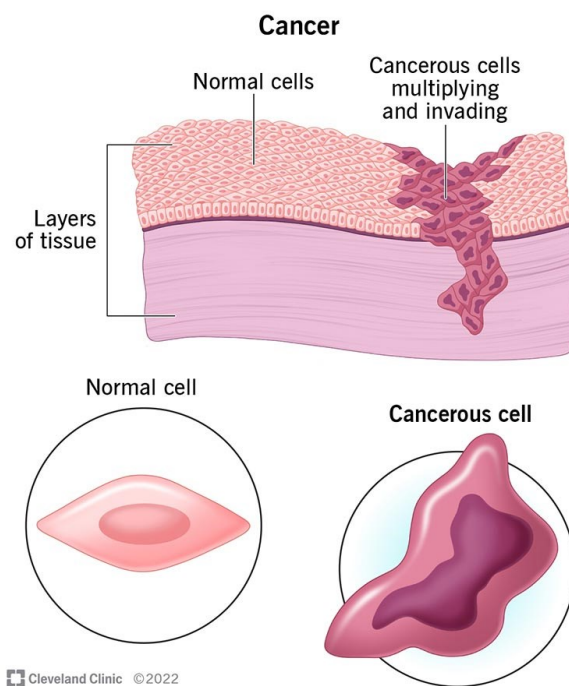
Rakovina je nádorové onemocnění, které se projevuje mutací některých skupin buněk v organismu. Může se objevit téměř kdekoli v lidském těle, které je složeno z biliónů buněk. U tohoto různorodého souboru chorob rakovinné buňky poškozují okolní orgány a nekontrolovaně se dělí, což vede k tvorbě nádorů. Tyto shluky tkáně dělíme na zhoubné a nezhooubné nádory. U zhoubných nádorů se projevuje malignita, kdy nádor prorůstá do okolní tkáně, napadá orgány a zakládá vzdálená nádorová ložiska, tzv. metastázy [1, 2].

Při metastázování se rakovinné buňky šíří z původního místa, kde vznikly, do jiných částí těla. Obrázek 1 znázorňuje, jak se nádorové buňky oddělují od původního nádoru a putují lymfatickým nebo krevním systémem do jiných orgánů či tkání. Metastatický nádor je tvořen původními rakovinnými buňkami. Pokud se například rakovina prsu rozšíří do plic, jsou v plicích přítomny rakovinné buňky prsu, nikoliv buňky rakoviny plic [1, 2].



Obrázek 1: Vznik metastatického nádoru z původních rakovinných buněk [2].

Rakovinné buňky se liší od normálních buněk v tom, že nepodléhají pokynům genů. Geny normálních buněk určují pravidla, kterými se mají řídit – například kdy začít nebo přestat růst (viz. Obrázek 2). Rakovinné buňky se množí nekontrolovatelně a ignorují signály programované buněčné smrti (apoptózy). Navíc rostou rychleji než normální buňky. Rakovinné buňky také pronikají do dalších částí těla a unikají imunitnímu systému, který by měl odstraňovat poškozené a abnormální buňky [1, 2, 3].



Obrázek 2: Rozdíl mezi normální a rakovinnou buňkou [3].

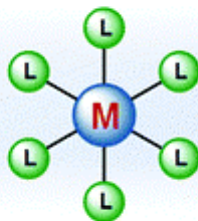
## 2.2 Terapie nádorového onemocnění

Nádorové onemocnění lze v dnešní době léčit různými způsoby; chirurgicky, chemoterapií, radioterapií, hormonálně, transplantací kmenových buněk atd. Chemoterapie využívá léky k zabíjení rakovinných buněk [4]. Konkrétně používá cytostatika, která jsou navržena tak, aby způsobovala buněčnou dysfunkci. Změnou metabolismu nádorových buněk cytostatika inhibují jejich růst a blokují jejich buněčné dělení a reprodukci [5]. Léčba snižuje počet rakovinných buněk na minimální úroveň, v tomto okamžiku odstraní jiné mechanismy (např. programovaná buněčná smrt) zbývající nádorové buňky. Při chemoterapii je hlavním cílem vyléčit pacienta a je důležité to provést co nejúčinněji. K posílení chemoterapie bylo navrženo několik alternativ, jako je použití kombinací toxických léků, imunoterapie a v poslední době viroterapie. Při použití cytostatika k podpoře cytotoxického léčiva v chemoterapii existují v lékařské literatuře důkazy, že tento typ kombinované terapie má zvýšenou účinnost [6].

### 2.2.1 Metalofarmaka

Častá léčiva používaná k léčbě nádorového onemocnění jsou metalofarmaka. Jako účinnou látku obsahují kov jako je například platina, lithium, stříbro, bismut, ruthenium a železo [7]. Obrázek 3 poukazuje na strukturu metaloléčiva, kde M představuje kov a L navázané ligandy. Při sestavě metaloléčiva ovlivňuje volba kovu, ligandu a oxidační stav kovu konečné fyzikálně-chemické vlastnosti, farmakokinetiku a také biologickou aktivitu [8].

## METALLODRUGS



Obrázek 3: Struktura metaloléčiva. Převzato z [8] a upraveno.

Metalofarmaka s terapeutickými i diagnostickými účely byla vyvinuta z obrovského množství kovových komplexů nejen pro léčbu rakoviny, ale i pro léčbu diabetes, zánětů, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění. Některá z nich byla schválena pro lékařské ošetření nebo pro klinické zkoušky. Ve srovnání s organickými léčivy, která se ve farmacii využívají častěji i s jejich biologicky odvozenými sloučeninami, metalofarmaka stále přitahují pozornost svými jedinečnými a fascinujícími vlastnostmi [9].

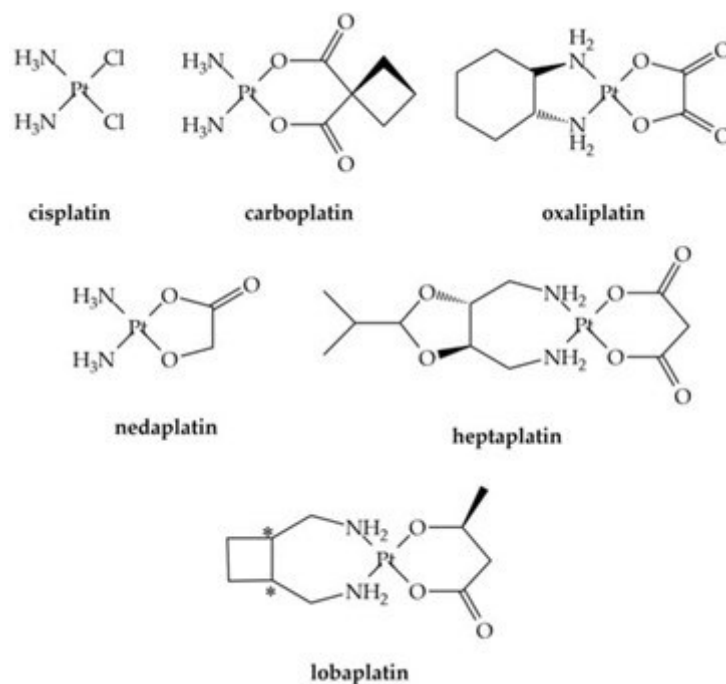
Většina schválených terapeutických látek jsou na organické bázi [8]. Metalofarmaka jsou ale na rozdíl od organických molekul biologicky a chemicky rozmanitá, což je jejich hlavní výhodou. U organických sloučenin je tato rozmanitost nedostupná. Metalofarmaka neboli léčiva na bázi kovů nabízejí rozmanitost ve formě různé koordinační geometrie jako jsou čtvercové rovinné, čtvercové pyramidální, čtyřstěnné, trigonální bipyramidové a osmistěnné tvary. Geometrie může také záviset na proměnných koordinačních číslech centrálních kovových iontů, ty dodávají komplexům široký rozsah bioaktivity v biologických procesech. Kovové ionty mají samy o sobě jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti. Další z rozmanitostí jsou oxidační stavy kovových iontů. Při větším počtu těchto stavů se budou komplexy chovat redoxně a budou vykazovat nový mechanismus účinku v biologických procesech. Mezi rozmanitostí se řadí ještě všestranné strukturní vlastnosti, typy a počty ligandů a různé typy substituce ligandů [9].

Metalofarmaka jsou často proléčiva, která jsou aktivována při cestě k cílovému místu nebo přímo v něm. Proléčivo je látka, která vykazuje farmakologický efekt až poté, co projde biotransformací. K aktivaci v cílovém místě může dojít vnějším stimulem jako je světlo, zvuk, teplo a záření. Při této aktivaci dochází k otevření chelátového kruhu, vytěsnění jednoho nebo více labilních ligandů nebo ke změně oxidačního stavu (energetického stavu) kovu nebo ligandu. Metalofarmaka mohou být také aktivována hydrolýzou, redoxně, fotoaktivací, ionizujícím zářením atd. [7, 10].

### 2.2.1.1 Cisplatina a její deriváty

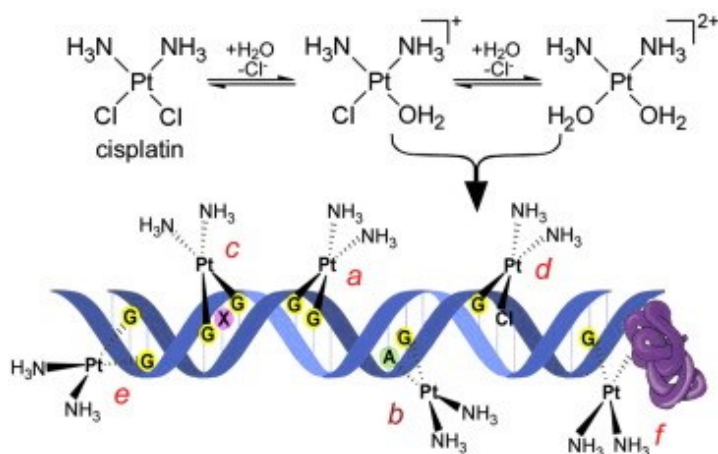
Platinové komplexy hrají od doby objevení protinádorové účinnosti cisplatinou důležitou roli v klinické chemoterapii. Cisplatina tedy byla první sloučeninou platiny s protinádorovou aktivitou [11]. Do doby jejího objevu byly v klinické terapii používané pouze organické

sloučeniny [12]. Platinové komplexy způsobovaly závažné vedlejší účinky spojené s lékovou rezistencí, čímž bylo omezeno jejich použití. To byl důvod k vývoji nových komplexů platiny se stejnou nebo vyšší protinádorovou aktivitou a nižší toxicitou pro využití v chemoterapii rakoviny. Komplexy se skládají z centrální platiny, dvou stabilních aminů a odstupujících skupin [11]. Kromě cisplatiny bylo pro léčbu rakoviny schváleno pět jejích derivátů, a to oxaliplatina, karboplatina, nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina (viz. Obrázek 4). Oxaliplatina a karboplatina se stejně jako cisplatina používají celosvětově. Tyto tři sloučeniny vykazují cytotoxické účinky tím, že se navážou na DNA, inhibují procesy replikace i transkripce a iniciují buněčnou dráhu vedoucí k buněčné smrti. Zbylé tři deriváty se používají zatím jen ve specifických zemích. Všechny pět sloučenin obsahuje chelatační ligandy nacházející se naproti aminovým skupinám. Ligandy jsou pomalu nahrazovány molekulami vody [13].



Obrázek 4: Platinové komplexy (\* označují chirální centra) [5].

Platinové komplexy jsou schopné vstupovat nebo vystupovat z buněk transmembránovým transportním systémem. Obrázek 5 ukazuje, že platinové komplexy se zaměřují hlavně na DNA. Po vstupu komplexu do buňky jejich mechanismus závisí na odstoupení hydrolyzující skupiny z centrální platiny. K odstoupení dochází z důvodu relativně nízké koncentrace chloridových iontů v cytosolu buňky a po odstoupení se substituují jeden nebo dva chloridové ligandy molekulami vody. Nakonec dochází k tvorbě vnitřetězcových příčných vazeb s DNA, čímž se inhibuje syntéza DNA [13, 14].



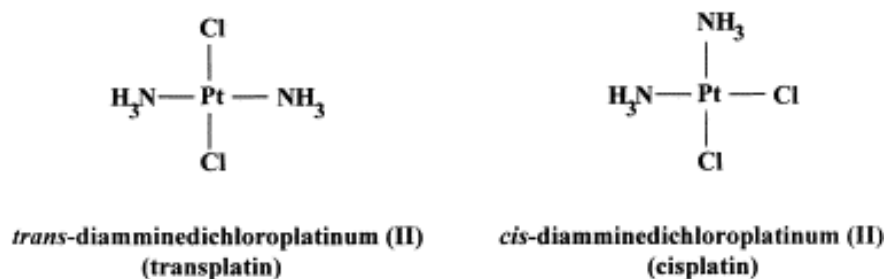
Obrázek 5: Hydrolýza cisplatinu a aduktů indukovaných v DNA. a) vnitrořetězcová cisplatinu spojující dva sousední guaniny; b) vnitrořetězcová cisplatinu spojující adenin a guanin; c) 1,3-vnitrořetězcová cisplatinu spojující dva guaniny oddělené další intervenující bázi; d) monofunkční adukt; e) vnitrořetězcová cisplatinu; f) DNA-platina-proteinová cisplatinu [13].

Oxaliplatinu má na rozdíl od cisplatinu dvě aminové skupiny nahrazeny trans-1,2-diaminocyklohexanem, čímž je zlepšena její protinádorová aktivita [15]. Její celý chemický název je (trans-R,R-cyklohexan-1,2-diamin)oxalitoplatina (II) [16]. Oxaliplatinu má nahrazené i chloridové ligandy za bidentátní oxalátovou skupinou odvozenou od kyseliny šťavelové, čímž je zlepšena její rozpustnost ve vodě [13]. Oxaliplatinu se používá zejména k léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. Právě pro pacienty, u kterých se objevila rezistence na cisplatinu, byla vyvinuta oxaliplatinu. Po následné recidivitě je opět možné léčení cisplatinou [17].

Úplný chemický název karboplatinu je diammin(cyklobutan-1,1-dikarboxylát)platina (II), čímž se jedná o koordinační sloučeninu platiny (II), stejně jako oxaliplatinu [16]. Karboplatina se jako léčivo používá proti rakovině hlavy, krku, plic a vaječníků. Karboplatina se v chemické struktuře od cisplatinu liší především přítomností bidentátového dikarboxylátového ligandu místo dvou chloridových ligandů [5].

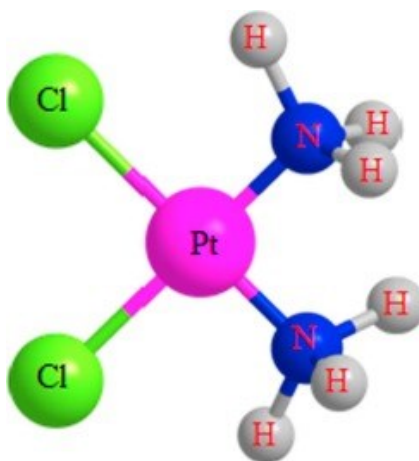
Dalším derivátem odvozeným od cisplatinu je také nedaplatina (chemický název cis-diammineglykolatoplatina (II)). Opět se jedná o platina (II) koordinační komplex [16].

Z hlediska významnosti cis-konfigurace v molekule cisplatinu na její protinádorovou účinnost byl pro srovnání vytvořen také její trans-analog – transplatinu. Zajímavým zjištěním pak bylo, že platinové komplexy v cis-konfiguraci vykazují vyšší protinádorovou účinnost, transplatinu totiž se svojí trans konfigurací postrádá protinádorovou aktivitu. Obrázek 6 znázorňuje rozdílnou konfiguraci cisplatinu a transplatinu [13].



Obrázek 6: Struktura transplatiny a cisplatiny [18].

Cisplatinu se používá na léčbu různých solidních nádorů, jako je rakovina plic, děložního čípku, varlat, vaječníku, močového měchýře, hlavy a krku, žaludku a několik dalších. Je jedním z nejpoužívanějších a nejpotenciálnějších léků. Její chemický název je cis-diamminedichloroplatinu (II) a Obrázek 7 zobrazuje její strukturu. Cisplatinou je léčeno téměř 50 % všech pacientů [19, 20, 21].



Obrázek 7: Struktura cisplatiny [19].

Nejpříjemnější mechanismus cisplatiny závisí na interakci s purinovými bázemi na DNA, čímž se generují léze DNA. Přičemž cisplatinu vykazuje protirakovinnou aktivitu mnoha mechanismy. Svou aktivitu uplatňuje tím, že napadá více míst najednou. Váže se na genomickou DNA (gDNA) nebo mitochondriální DNA (mtDNA) [19].

Jak již bylo zmíněno, podrobnější mechanismus probíhá aktivací cisplatiny po vstupu do cytoplazmy nahrazením atomů chloridu molekulami vody. Na proteinech vzniká elektrofil s afinitou k donorovým atomům dusíku na nukleonových kyselinách a sulfhydrylových skupinách. Opět je aktivováno několika signálních transdukčních drah po selektivní vazbě na 1,2-vnitrořetězcové křížové vazbě purinových bází, které nakonec vedou k indukci apoptotické buněčné smrti [19].

K toxicitě cisplatiny přispívají nefunkční adukty a meziřetězcové a vnitrořetězcové příčné vazby. Aduky cisplatinu-DNA se nejběžněji tvoří v polohách N7 imidazolového kruhu dvou sousedních guaninů prostřednictvím kovalentní vazby [20].

Cisplatinu je omezena jejími vedlejšími účinky a lékovou rezistencí. Kvůli tomu není možné využít její plný potenciál, je omezena její aplikace a účinnost. Rezistence na cisplatinu závisí



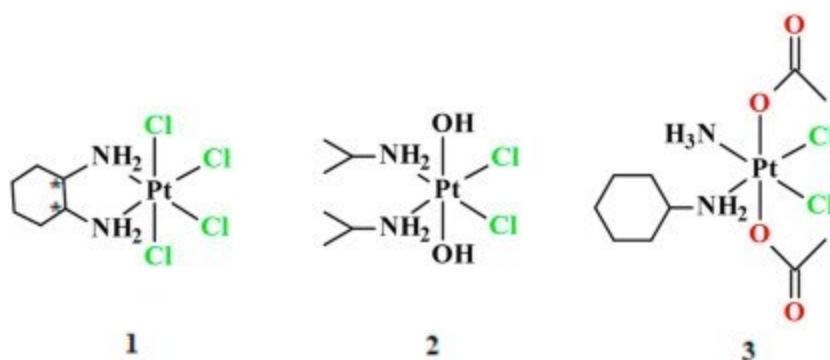
na mnoha faktorech, mezi které se řadí zvýšená oprava lézí DNA, snížení akumulace léčiva uvnitř rakovinových buněk a inaktivace léčiva vazbou na různé proteiny jako je glutathion a metalothionein. Kombinované terapie jsou používány pro minimalizaci vedlejších účinků a rezistence na cisplatinu. Z terapie cisplatinou vychází vysoká systémová toxicita, jako je nefrotoxicita, hepatotoxicita, gastrointestinální toxicita, neurotoxicita a ototoxicita. Je tedy vysoká snaha o vytvoření substituentů cisplatiny. Zatím byly celosvětově schváleny pouze dva, a to karboplatina a oxaliplatin [19].

### 2.2.1.2 Pt (IV) komplexy

Pt (II) koordinační sloučeniny jsou známé pro své antiproliferativní účinky. Mezi tyto sloučeniny spadá cisplatin a její deriváty (viz. kap. 2.2.1.1). Z důvodu nutného intravenózního podání platinových (II) koordinačních komplexů byly vyvinuté platinové komplexy „třetí generace“. Tyto komplexy obsahují Pt (IV) jádro s šesti navázanými ligandy [16].

Komplexy Pt (IV) by měly být odolné vůči hydrolyze žaludečními šťávami, což by mělo vést k možnosti perorálního podání [16]. Další studie popisují, že Pt (IV) mohou účinně překonávat vedlejší účinky cisplatiny a dalších léčiv [22].

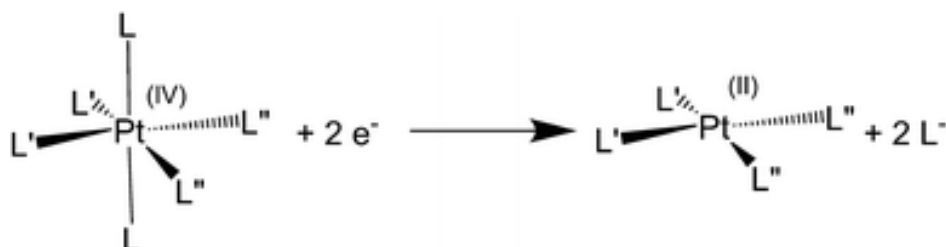
Následující komplexy prošly klinickými studiemi hodnotícími bezpečnost a účinnost léčiva, což je nutný krok k jejich schválení pro běžné používání. Jedná se o komplex tetraplatina, iproplatin a satraplatina, jejichž chemickou strukturu znázorňuje Obrázek 8. Tetraplatina neboli ormaplatina s chemickým názvem cis-tetrachlorido(1R,2R-cyklohexan-1,2-diamin)platina (IV) má vyšší akumulaci platiny ve srovnání s cisplatinou a oxaliplatinou. U tetraplatiny je její vyšší akumulace doprovázena vyšší neurotoxicitou. Iproplatinu s chemickým názvem cis,trans,cis-dichloridodihydroxodiisopropilaminoplatina (IV) je méně ototoxická a orgánově toxická než cisplatin s její vysokou ototoxicitou a nefrotoxicitou. Od iproplatiny se upustilo vzhledem k tomu, že nevykazovala lepší aktivitu než cisplatin nebo karboplatina. Satraplatina je trans,cis,cis-bis(acetato)ammin(cyklohexylamin)dichloridoplatina (IV) s velkou pozorností jako první perorální Pt (IV) léčivo. Perorální podání satraplatiny je možné vzhledem k přítomnosti dvou ethylových skupin, které způsobují menší rozpustnost ve vodě a dobrou rozpustnost v tucích. [16, 22].



Obrázek 8: Strukturální vzorce tetraplatiny (1), iproplatiny (2) a satraplatiny (3). Převzato z [22] a upraveno.

Obrázek 9 zobrazuje obecný vzorec  $[Pt(L)_2(L')_2(L'')_2]$  komplexů platiny (IV), kde L jsou axiální ligandy Cl<sup>-</sup>, RCOO<sup>-</sup> nebo OH<sup>-</sup>, L' jsou ekvatoriálními ligandy jako dva aminy nebo

jeden diamín a L'' je Cl<sup>-</sup> nebo glykolát. Platinové komplexy (IV) se považují za proléčiva z důvodu pomalejšího podléhání substitučních reakcí ligandů než Pt (II) komplexy. Jiné studie však dokazují, že ne všechny Pt (IV) komplexy musí nutně působit jako proléčiva. K aktivaci Pt (IV) komplexů dochází redukcí na Pt (II), kdy následuje hydrolyza a elektrofilní útok na DNA (viz. Obrázek 9) [16]. Geometrie Pt (II) komplexů je čtyřkoordinovaná, oproti tomu je geometrie Pt (IV) komplexů oktaedrická a nasycená. Větší stabilita Pt (IV) komplexů oproti Pt (II) může přispívat ke snížení nežádoucích reakcí [16].



Obrázek 9: Obecné schéma dvouelektronové redukce komplexu Pt(IV) v oktaedrickém uspořádání [16].

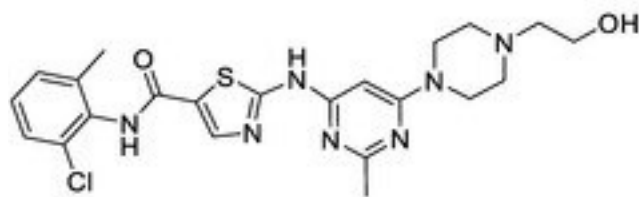
## 2.2.2 Terapie nádorových onemocnění – inhibitory

### 2.2.2.1 Inhibitory Src kináz – dasatinib

Src je proteinová tyrozin kináza schopná regulovat různé nádorové procesy na intracelulární úrovni. Mezi tyto procesy patří invaze, růst, přežití, adheze a exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (*VEGF*). Inhibitory Src jsou schopny zabránit růstu buněk u karcinomu jater, prsu, vaječníků a tlustého střeva, proto jsou navrhovány jako protinádorové léčebné postupy [23]. Tyrozin kinázy se podílejí na vzniku a progresi nádorů [24]. *VEGF* je gen, který je klíčovým mediátorem při tvorbě nových krevních cév tzv. angiogenezi. Při nádorovém onemocnění je regulace *VEGF* zvýšená, čímž dochází k zásobení a výživě vznikajícího nádoru. Kromě toho reguluje Src funkci osteoklastů v normální kosti a kostních metastázách [25].

Dasatinib (viz. Obrázek 10) je inhibitor tyrozin kinázy. V klinice se používá k léčbě chronické myeloidní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie s pozitivním filadelfským chromozomem [26]. Dasatinib tedy působí jako cytostatikum inhibující procesy buněčné proliferace, invaze a metastázování. Dasatinib vykazuje synergickou nebo aditivní aktivitu s celou řadou dalších látek, čímž se stává vhodným adeptem pro kombinovanou léčbu [27]. Kombinací dasatinibu s dalšími neoplastickými léčivy se zvyšuje jeho účinnost a protinádorová aktivita. Dasatinib vykazuje kromě různých druhů protinádorové aktivity i antiproliferační a antiinvazivní vlastnosti. Potenciální usmrcení rakovinných buněk spočívá u dasatinibu v posílení imunitních buněk organismu [28].





**Dasatinib**

Obrázek 10: Struktura dasatinibu. Převzato z [23] a upravano.

Dasatinib je inhibitor tyrosin kinázy druhé generace a je asi 300krát účinnější než zástupce první generace imatinib [28, 29]. Imatinib je prvním inhibitorem tyrozin kinázy používaným pro léčbu chronické myeloidní leukémie. Dalšími inhibitory tyrosin kináz, které jsou v dnešní době vyvíjeny a studovány jednak pro léčbu chronické myeloidní leukémie, ale také pro jejich účinnost v pevných nádorech, jsou například bosutinib, ponatinib či nilotinib [29, 30].

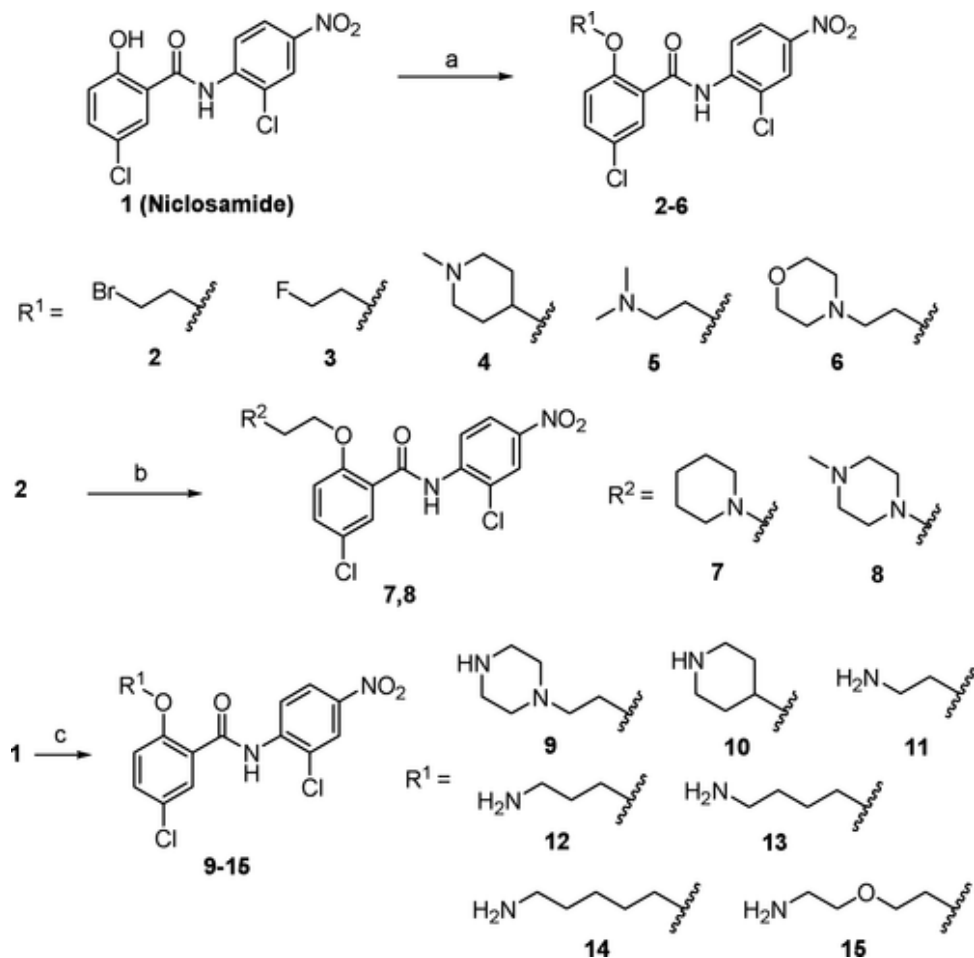
#### 2.2.2.2 Inhibitory STAT3 – HJC

STAT3 je členem rodiny STAT, což je přenašeč signálu a aktivátor transkripce. Rodina STAT se u savců skládá ze 7 členů. STAT3 je tedy transkripční faktor, což je protein. Může být aktivován různou řadou cytokinů a růstových faktorů [31, 32]. Ovlivňuje buněčnou diferenciaci, tumorigenezi, buněčný růst a progresi rakoviny za patologických a fyziologických stavů. STAT3 je vysoce aktivní u mnoha druhů rakovinného onemocnění, jako je onemocnění plic, žaludku tlustého střeva a prsu. Jeho zvýšenou aktivitou je spojován se špatnou prognózou. Tento transkripční faktor je dále aktivní u primárního maligního nádoru mozku (glioblasty). U tohoto nádoru se STAT3 podílí na proliferaci, buněčné chemosensitivitě a apoptóze. Glioblastomy jsou odolné vůči standardní terapii, kam spadá třeba radioterapie a chirurgie. Žádný z testovaných inhibitorů STAT3 v poslední době nepostoupil ke schválení, a to hlavně z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě nebo malému inhibičnímu účinku [33].

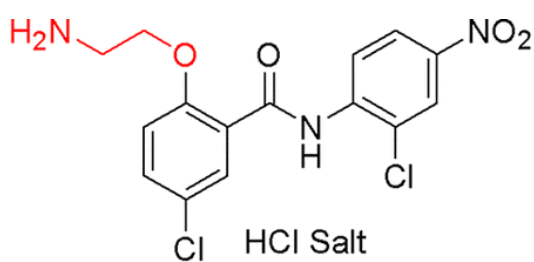
Studie potvrzují vývin derivátů z niklosamidu, který má jako léčivo inhibiční účinek vůči signalizaci STAT3 [33]. Niklosamid nemá ideální farmakokinetický profil, jelikož není dobře rozpustný ve vodě a biologicky dostupný [31]. Mezi vyvinuté deriváty, které se vážou s O-alkylaminem, spadá i HJC0150, což je O-alkylamino-vázaný derivát z niklosamidu. HJC0152 je nízkomolekulární sloučenina s antiSTAT3 aktivitou, která je silnější než aktivita niklosamidu [33]. HJC0152 inhibuje fosforylaci STAT3 [34].

Obrázek 11 zobrazuje, že deriváty byly vytvořeny modifikací hydroxylové skupiny na fenolovém kruhu niklosamidu. Modifikace spočívá v navázání postranního řetězce O-alkyloaminu. Deriváty 2-6 byly připraveny Mitsunobuovou reakcí. Deriváty 7,8 vznikly alkyací meziproductů R<sup>1</sup>. Deriváty 9-15 byly získány Mitsunobuovou vazbou niklosamidu

s N-boc-chráněnými aminoalkoholy a následnou Boc-deprotekcí. HJC0152 je derivátem číslo 11, což znázorňuje Obrázek 12 [31].



Obrázek 11: Příprava derivátů niklosamidu (reagenty a podmínky: (a) R<sup>1</sup>OH, Ph<sub>3</sub>P, DIAD, THF, rt, 50-93 %. (b) R<sup>2</sup>H, KI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, aceton, reflux, 55-91 %. (c) (i) Boc-R<sup>1</sup>OH, Ph<sub>3</sub>P, DIAD, THF, rt; (ii) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C až rt, 34-81 % (dva kroky) [31].



**11 (HJC0152)**

Improved aqueous solubility (3,300-fold better than niclosamide)

High *in vivo* antitumor efficacy (i.p. & p.o.)

Obrázek 12: Derivát niklosamidu – HJC0152 [31].

Studie potvrdily schopnost HJC0152 inhibovat růst a invazivitu nádorů *in vitro* i *in vivo* pro buněčné linie karcinomu prsu a dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku [33]. Studie

prokazují schopnost HJC0152 potlačit buněčnou proliferaci u buněčných linií MCF-7 a MDA-MB-231 [35].

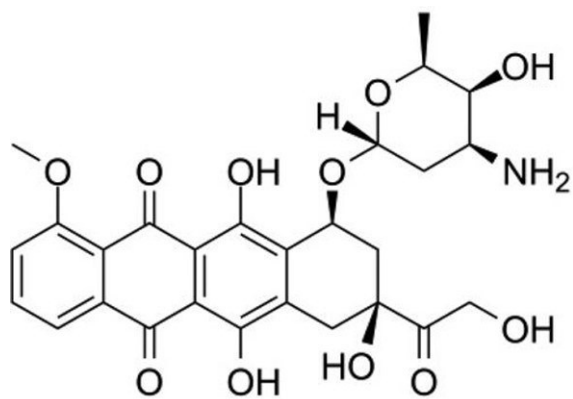
### 2.2.3 Kombinovaná terapie

Kombinovaná terapie je léčebná terapie, která kombinuje dvě nebo více léčebných látek. Oproti monoterapii se spojením více protinádorových léčiv zvyšuje její účinnost, a to tím, že se zaměřují na klíčové dráhy charakteristickým synergickým nebo aditivním způsobem. Tímto způsobem se potenciálně snižuje rezistence vůči lékům. Současně kombinovaná terapie poskytuje terapeutické protinádorové výhody, jako je snížení růstu nádoru a metastatického potenciálu, vyvolání apoptózy, zastavení mitoticky aktivních buněk a snížení populace nádorových kmenových buněk. Monoterapie je náchylnější na rezistenci vůči léčivům, protože neustálá léčba jedním typem sloučeniny navádí nádorové buňky k náboru alternativních záchranných drah. Kombinovaná terapie může být toxická, ale při použití jedné z látek jako chemoterapeutickou se toxicita výrazně sníží, protože budou cíleny různé dráhy. Z důvodu synergického a aditivního působení je potřebná nižší terapeutická dávka každého z jednotlivých léčiv. Kombinovaná léčba může zabránit toxicitě vůči normálním buňkám a zároveň může být cytotoxická vůči nádorovým buňkám. K tomu může dojít, pokud je v kombinovaném režimu léčivo z hlediska cytotoxicity antagonistické vůči jinému léčivu v normálních buňkách, což v podstatě chrání normální buňky před cytotoxickým působením [36].

V preklinických studiích bylo prokázáno, že kombinací cisplatiny s přírodními produkty je těmito produkty zvýšená terapeutická aktivita cisplatiny a její toxicita je snížena. Formací cisplatiny s lipidovými, polymerními, anorganickými a organickými nanodávkovacími systémy je zpomaleno uvolňování léčiva, snížena systémová toxicita a je prodloužen poločas rozpadu. Zatímco jinými formacemi, jako jsou nanogely, nanokapsule a hydrogely je zlepšen průnik do buněk, cíl na nádorovou buňku a inhibice pokroku nádoru [37].

Kombinovanou léčbou dasatinibu s antracyklinem doxorubicinem došlo k synergické inhibici růstu u studovaných buněčných linií karcinomu prsu MDA-MB-231 a MCF-7. Kombinace vedla k synergickému snižování buněčného metabolismu, proliferaci a životaschopnosti u buněčné linie MCF-7. Zároveň tato kombinace vedla k blokaci migrace a invazivity vysoce metastatické buněčné linie MDA-MB-231 [38].

Další synergický účinek vykazuje kombinace STAT inhibitoru HJC0152 a doxorubicinu proti buněčné linii MDA-MB-231. Léčiva vykazují synergický účinek při inhibici růstu buněk [34]. Doxorubicin se používá jako léčivo rakoviny vaječníku, plic, žaludku, prsu, měchýře atd. Doxorubicin byl ve formě liposomální injekce hydrochloridu doxorubicinu jako první schválen ke klinickému použití jako protinádorové léčivo. Liposomální zapouzdřené léčivo působí proti řadě zhoubných nádorů, mezi které spadají solidní nádory, transplantovaná leukémie a lymfomy. Obrázek 13 znázorňuje strukturu doxorubicinu [39].



Obrázek 13: Struktura doxorubicinu. Převzato z [40] a upraveno.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo studovat působení protinádorové a antimetastatické aktivity nového komplexu platiny obsahujícího inhibitor proteinových kináz a STAT inhibitor. Komplex Pt(IV)-das-HJC byl připraven pracovní skupinou prof. D. Gibsona (Hebrew University of Jerusalem) a poskytnut pro studia jeho protinádorové účinnosti. Komplex obsahuje ve své struktuře 3 látky (dasatinib, cisplatinu, HJC0152), se kterými byl zároveň porovnáván. Struktura komplexu i jeho jednotek je popsána v kapitole 4.1.

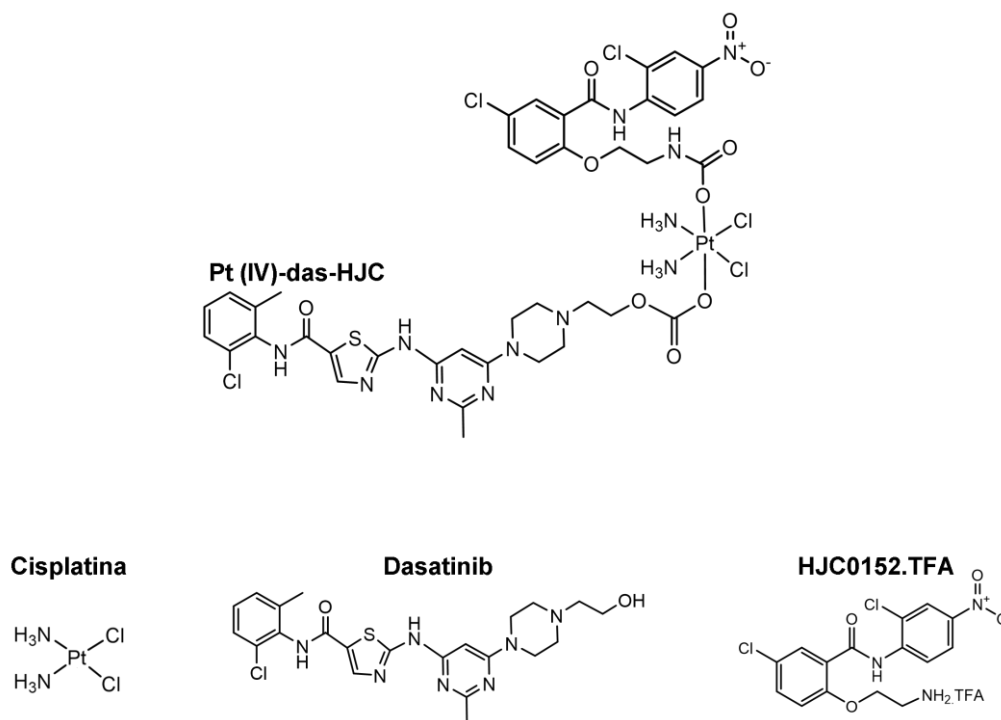
Cílem práce bylo:

- Stanovit antiproliferativní aktivitu této nové sloučeniny v buněčných liniích odvozených z nádoru prsu (MCF-7 a MDA-MB-231). Antiproliferativní aktivitu porovnat s jednotlivými složkami, dasatinibem, cisplatinou, HJC0152 inhibitorem či s jejich směsí.
- Připravit 3D kultury a sledovat vliv komplexu na velikost a soudržnost vzniklých sferoidů.
- Stanovit schopnost průniku a akumulace studovaných látek do nádorových buněk.
- Zjistit schopnost komplexu vázat se na jadernou DNA.
- Sledovat úlohu nukleotidové excizní opravy v mechanismu protinádorové účinnosti nového komplexu Pt(IV)-das-HJC.
- Studovat mechanismus buněčné smrti buněk po ovlivnění komplexem.
- Studovat antimigrační vlastnosti nové látky.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Testované sloučeniny a použité buněčné linie

Komplex Pt(IV)-das-HJC byl připraven, charakterizován a poskytnut prof. D. Gibsonem (Hebrew University of Jerusalem, Izrael). Komplex ve své struktuře nese 3 specificky protinádorově účinné jednotky: cisplatinu, dasatinib a STAT3 inhibitor HJC0152. Experimenty jsou pro srovnání provedeny i s jednotlivými látkami, tedy s cisplatinou, dasatinibem, HJC0152 a jejich kombinací.



Obrázek 14: Struktura komplexu Pt(IV)-das-HJC a jeho podjednotek (cisplatinu, dasatinib a HJC0152).

Buněčné linie použité v určitých experimentech byly buňky lidského karcinomu prsu MCF-7 a MDA-MB-231 získané z ATCC, buňky vaječníků čínského křečka CHO-K1 („wild type“) a odvozená linie MMC-2 nesoucí ERCC3/XPB mutaci (linie NER-deficientní). Křeččí linie byly poskytnuty od Dr. M. Piršela (Slovenská Akademie Věd).

### 4.2 Rozmražení buněk

Buňky se dlouhodobě uchovávají v Dewarově nádobě v tekutém dusíku při teplotě pod -150 °C. Zkumavka s buněčnou linií se rozmrazuje v kádince s vodou vytemperovanou na 37 °C. Buněčná linie byla umístěna do vytemperované kádinky na 1–2 minuty. Buňky byly za pomoci pipety přemístěny do 15 ml falkonky. K buňkám bylo po kapkách pipetou přidáno 10 ml kompletního kultivačního média. Falkonka s buňkami a médiem byla centrifugována, poté byl odsán supernatant. Získaný buněčný pelet byl rozsuspendován v nových 20 ml kompletního kultivačního média a přenesen do kultivační lahve. Buňky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C.

### 4.3 Příprava zásobních roztoků

Komplex Pt(IV)-das-HJC byl navážen do čisté zkumavky eppendorf. Hmotnost potřebného komplexu Pt(IV)-das-HJC byla vypočítána podle vzorce 1.

$$m = c \cdot V \cdot M \quad (1)$$

Kde  $m$  je hmotnost [g],  $c$  je koncentrace [mol/ml],  $V$  je objem [ml] a  $M$  je molární hmotnost [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]. Komplex Pt(IV)-das-HJC ve formě prášku byl rozpuštěn ve 200  $\mu\text{l}$  DMF. Roztok byl promíchán pipetou nasáváním a vysáváním. Pro určení přesné koncentrace komplexu Pt(IV)-das-HJC byl připravený roztok naředěn a proměřen na spektrofotometru. Ze získaného roztoku komplexu Pt(IV)-das-HJC byl připraven 300 $\times$  zředěný roztok (1  $\mu\text{l}$  komplexu Pt(IV)-das-HJC a 299  $\mu\text{l}$  vody). Dále byl připraven blank (1  $\mu\text{l}$  DMF a 299  $\mu\text{l}$  vody). Na UV/VIS spektrometru byl nejdříve proměřen blankový roztok a po té naředěný roztok komplexu Pt(IV)-das-HJC. Koncentraci vypočítáme přes Lambertův-Beerův zákon, se získanou absorbancí při vlnové délce 325 nm.

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Kde  $A$  je absorbance [-],  $\epsilon_{\lambda}$  je absorpční koeficient při vlnové délce 325 nm [ $\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ],  $c$  je koncentrace látky [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ] a  $d$  je tloušťka kyvety [cm]. Absorpční koeficient pro komplex Pt(IV)-das-HJC je 55680  $\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  při 325 nm.

### 4.4 Pasážování adherentních buněk

Pasážování je přenesení určitého počtu buněk do čerstvého média. Pasážování se provádí z důvodu udržení buněk na kultivačním flasku o určité hustotě, aby nedošlo k jejich přerůstání a buňky měly kam růst.

Z inkubátoru přeneseme kultivační láhev s buněčnou kulturou do laminárního boxu (nutná sterilita). Z flasku odsajeme médium a buňky nasedlé na dně opatrně propláchneme PBS, které je zahřáté ve vodní lázni na 37 °C. PBS následně odsajeme a přidáme 1,5 ml Trypsinu a flask umístíme na 2–3 minuty do inkubátoru. Po uvolnění buněk ze dna přidáme 8 ml zahřátého DMEM (37 °C) a médiem smyjeme buňky z flasku. Buňky nasáváním a vysáváním pipetorem oddělíme od sebe.

Na počítací sklo se napipetuje 10  $\mu\text{l}$  buněk. Sklo se vloží do počítačky buněk BIORAD. Do čisté kultivační lahve se napipetuje nové kultivační médium a přidá se buněčná suspenze. Média i suspenze se přidá takové množství, abychom získali daný počet buněk, a aby výsledný objem byl 20 ml.

### 4.5 MTT test

Metodou MTT stanovujeme cytotoxickou aktivitu komplexů. Lépe řečeno, stanovujeme schopnost komplexů usmrtit nebo inhibovat růst nádorových buněk. Metoda je založena na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat žlutou sůl MTT 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid na fialové krystalky formazanu.

Na 96 jamkovou destičku byly nasazeny buňky o hustotě 6000 buněk ve 100  $\mu\text{l}$  DMEM na jamku. Buňky byly přes noc kultivovány v inkubátoru. K buňkám bylo v koncentrační řadě

přidáno 100 µl roztoku komplexu do každé jamky. Buňky byly inkubovány 72 hodin. Bylo přidáno 20 µl MTT roztoku do každé jamky. Buňky byly inkubovány 3 až 4 hodiny. Médium bylo odsáno a fialové krystalky formazanu byly rozpuštěny ve 100 µl DMSO na jamku. Krystalky byly dokonale rozpuštěny na shakeru. Na spektrofotometru Tecan SPARK byla změřena absorbance při 570 nm a reference při 620 nm.

#### **4.6 Kultivace 3D sferoidů**

Buňky byly posbírány trypsinizací, jako při pasážování (viz. kapitola 4.4). Buňky byly spočítány, tak aby v čisté falkonce bylo 500 tisíc buněk. Buňky byly centrifugovány a rozsuspendovány v připraveném přefiltrovaném Tumorsphere médiu. Na 10 ml zmíněného média je potřeba 9,8 ml DMEM/F12, 0,2 µl EGF (1 mg/ml), 200 µl B27, 50 µl BSA (300 mg/ml) a 5 µl Gentamycinu (10 µl/ml). Buňky byly spočítány a nasazeny na 96 jamkovou destičku s kulatým dnem a s povrchovým upravením, aby nedocházelo k přichycování buněk ke dnu, tzv. ultralow attachment. Buňky byly nasazeny o hustotě 500 buněk na jamku ve 100 µl média. Buňky byly nechány růst 4 dny.

#### **4.7 Stanovení cytotoxicity komplexů na 3D sferoidech**

Aktivita studovaných léčiv byla na 3D sferoidech sledována jednak focením sferoidů v časech 24, 48, 72 hodin s následným vyhodnocením velikosti plochy sferoidů.

Druhým přístupem bylo studování cytotoxicity studovaných komplexů na 3D sferoidech přidáním reagentie CellTiterGlo® 3D (Promega). CellTiterGlo® 3D je luminescenční metoda pro stanovení počtu životaschopných buněk v kultuře na základě kvantifikace přítomného ATP, což signalizuje přítomnost metabolicky aktivních buněk. Po přidání komplexů ke sferoidům byly sferoidy kultivovány 96 hodin. Poté byl přidán CellTiterGlo přímo do jamek k buňkám a po 30 min promíchávání byla změřena chemoluminiscence na Tecan SPARK.

#### **4.8 Akumulace komplexů v buňkách**

Na Petriho misku byly nasazeny buňky o hustotě  $2 \cdot 10^6$  buněk. Buňky byly kultivovány přes noc. Poté byly přidány komplexy, aby finální koncentrace u buněk odpovídala koncentraci 0,5 µM nebo 5 µM. Buňky byly inkubovány 4 hodiny a poté byly buňky sesbírány do čistých falkonek. Buňky byly trypsinizací sesbírány do studeného PBS do čisté falkonky. Buňky byly na 3 minuty při 10 °C centrifugovány. Buňky byly propláchnuty studeným PBS a pelety byly drženy na ledu. Buňky byly spočítány a centrifugovány při 10 °C na 3 minuty. Od pelety bylo odsáno PBS a přidáno 200 µl koncentrované HCl. Buňky jsou v kyselině ponechány několik dní při pokojové teplotě, kdy dochází k digesci buněk. Buňky jsou podle potřeby zahřívány nebo sonikovány, aby bylo docíleno homogenních roztoků. K buňkám bylo přidáno 1,3 ml vody, aby byla finální koncentrace kyseliny maximálně 5%. Metodou ICP-MS bylo stanoveno množství kovu (platiny).

#### **4.9 Stanovení vazby komplexu na jadernou DNA**

Na Petriho misku byly nasazeny buňky o hustotě  $2 \cdot 10^6$  buněk. Buňky byly kultivovány přes noc a poté byly přidány komplexy o koncentracích odpovídajících hodnotám  $1 \times IC_{50}$  (stanovené pro jednotlivé komplexy metodou MTT, po 72 hodin). Buňky byly inkubovány 24 hodin a přesunuty do čistých falkonek. Buňky byly trypsinizací sesbírány do studeného PBS do čistých falkonek. Buňky byly na 3 minuty při 10 °C centrifugovány. K peletu byl přidán



1 ml reagentu DNazol. DNA bylo precipitováno přidáním 0,5 ml 100% ethanolu. Vzorby byly inkubovány 3 minuty při pokojové teplotě. DNA ve formě bílého precipitátu byla přenesena do čisté eppendorf zkumavky. Přebytková kapalina byla ze dna odsáta. DNA byla propláchnuta 75% ethanolem, který byl následně odsán. DNA byla rozpuštěna v 0,5 ml vody a ponechána stát několik dní při pokojové teplotě. U rozpuštěné DNA byla měřena koncentrace, celkový objem a absorbance při 260 nm, 280 nm a 350 nm. K DNA vysušené lyofilizací bylo přidáno 200 µl koncentrované HCl. Buňky jsou v kyselině ponechány několik dní při pokojové teplotě, kdy dochází k digesci DNA. Vzorby jsou podle potřeby zahřívány nebo sonikovány, aby bylo docíleno homogenních roztoků. K vzorkům bylo přidáno přibližně 1,3 ml vody, aby byla finální koncentrace kyseliny maximálně 5%. Metodou ICP-MS bylo stanoveno množství kovu (platiny).

#### **4.10 Stanovení buněčné smrti**

Na 6 jamkovou destičku byly nasazeny buňky o hustotě 150 tisíc buněk na jamku. Buňky byly kultivovány do dalšího dne. K buňkám byly přidány komplexy o koncentraci odpovídající  $2 \times IC_{50_{MTT, 72h}}$ . Médium s uvolněnými buňkami bylo odebráno do falkonky. Přisedlé buňky byly opláchnuty DPBS a byly přidány k plovoucím buňkám. Byl přidán cellstripper a buňky byly inkubovány 3 minuty v inkubátoru. Čistým PBS byly spláchnuty z DNA uvolněné buňky a přidány do falkonky. Buňky byly centrifugovány na 3 minuty. Médium bylo odsáto a pelet byl propláchnut PBS. Buňky byly opět centrifugovány. K peletu bylo přidáno 100 µl Annexin/PI roztoku. Na jeden vzorek je potřeba roztok připravit z 94 µl Annexin binding buffer (1×), 1 µl Propidium Iodide a 5 µl Annexin V pacific blue. Buňky byly na 15 minut inkubovány ve tmě. Buňky byly analyzovány na Flow cytometru BD FACS.

#### **4.11 Metoda zacelování jizvy**

Na 6 jamkovou destičku byly nasazeny buňky o hustotě 200 tisíc buněk na jamku. Buňky byly ponechány růst, tak aby pokryly plně dno. Z jamek bylo odsáto médium a zespodu plátíčka byly nakresleny pomocné čáry pro usnadnění orientace při focení jizev. V buněčné kultuře byla podle pravítka špičkou pipety vytvořena jizva. Buňky byly opatrně propláchnuty PBS a bylo přidáno médium s komplexy. Médium s komplexy bylo po 2 hodinách odsáto a bylo přidáno čisté médium. Zarůstání jizev bylo foceno v časech 2 (čas ihned po treatmentu, kdy bylo přidáno čisté médium), 24 a 48 hodin. Plochy jizev byly vyhodnocovány v programu ImageJ.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Stanovení protinádorové účinnosti

Prvotním cílem práce bylo zjistit účinnost nového komplexu Pt(IV)-das-HJC na nádorových liniích prsu MCF-7 a MDA-MB-231 a porovnat jeho účinnost s jednotlivě podávanými látkami cisplatinou, dasatinibem, HJC inhibitorem či látkami podávanými ve směsi (mix) (1:1:1).

### 5.2 MTT na 2D adherentních buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231

Metodou MTT byla stanovena schopnost komplexů usmrtit či inhibovat růst nádorových buněk. Metoda je založena na redukci žluté soli MTT 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid na fialové krystalky formazanu pomocí metabolicky aktivních buněk.

Metoda byla provedena pro buněčné linie MCF-7 a MDA-MB-231. Protinádorová účinnost jednotlivých látek je vyjádřena hodnotami IC<sub>50</sub>, což je hodnota odpovídající koncentraci dané látky zodpovědné za 50% inhibici růstu nádorové linie. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vyhodnoceny v programu GraphPad. Tabulka 1 uvádí hodnoty IC<sub>50</sub> pro komplex Pt(IV)-das-HJC, jednotlivé složky a mix složek (1:1:1) v lidských nádorových liniích prsu MCF-7 a MDA-MB-231. U obou testovaných buněčných linií byl komplex Pt(IV)-das-HJC nejúčinnější, podobně jako pro látky ve směsi (mix 1:1:1).

Tabulka 1: Hodnoty IC<sub>50</sub> pro buněčné linie MCF-7 a MDA-MB-231 vyhodnoceny po 72 h metodou MTT

Buněčná linie	MCF-7	MDA-MB-231
	IC <sub>50</sub> [μM]	IC <sub>50</sub> [μM]
Komplex Pt(IV)-das-HJC	0,4 ± 0,1	0,09 ± 0,03
Cisplatina	7,7 ± 0,1	22,5 ± 0,1
Dasatinib	26 ± 3	0,2 ± 0,1
HJC0152	3,1 ± 0,4	11 ± 1
Mix (1:1:1)	0,4 ± 0,1	0,22 ± 0,08

Komplex Pt(IV)-das-HJC vykazuje značnou protinádorovou účinnost jednak v linii pro dasatinib sensitivní (MDA-MB-231), a co je zajímavé, také v případě linie MCF-7, kde jednotlivě použité složky dasatinib, cisplatina či HJC0152 vykazují pouze střední účinnost. Podobně významné účinnosti dosahuje také použití směsi jednotlivých látek (dasatinib, cisplatina, HJC0152, 1:1:1).

### 5.3 CellTiterGlo na 3D sferoidech generovaných z MCF-7 a MDA-MB-231 buněčných linií

Účinnost komplexu Pt(IV)-das-HJC, jednotlivých složek i mixu, byla studována také na 3D buněčných modelech, tzv. sferoidech.

Pro stanovení účinnosti látek na 3D sferoidech byla použita reagentie CellTiterGlo® 3D (Promega). CellTiterGlo® 3D je metoda stanovující množství viabilních buněk v 3D buněčných kulturách založená na kvantifikaci ATP, jehož přítomnost je znakem pro přítomnost metabolicky aktivních buněk.

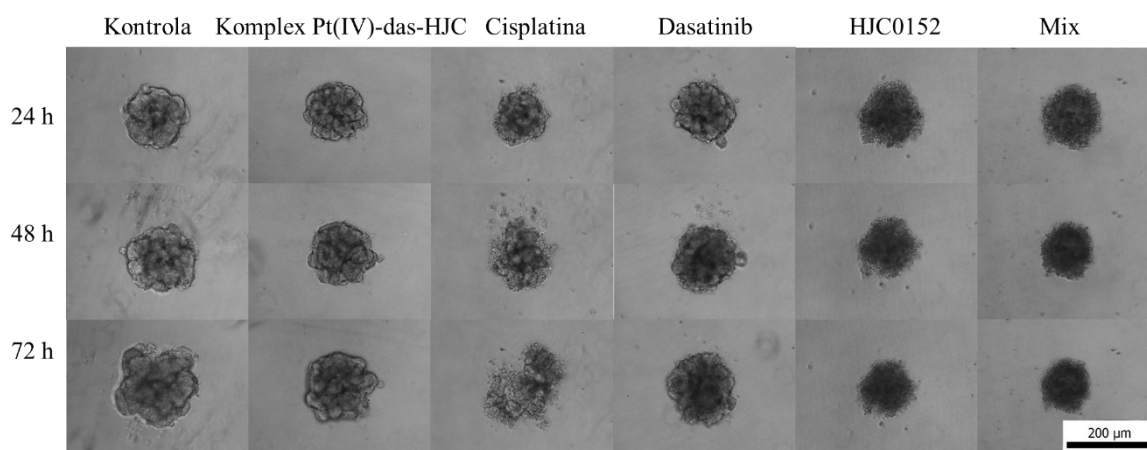
Tabulka 2 zobrazuje získané hodnoty IC<sub>50</sub> pro buněčné linie MCF-7 a MDA-MB-231.

Tabulka 2: Hodnoty IC50 pro 3D sferoidy vyhodnoceny po 96 hodin metodou CellTiterGlo

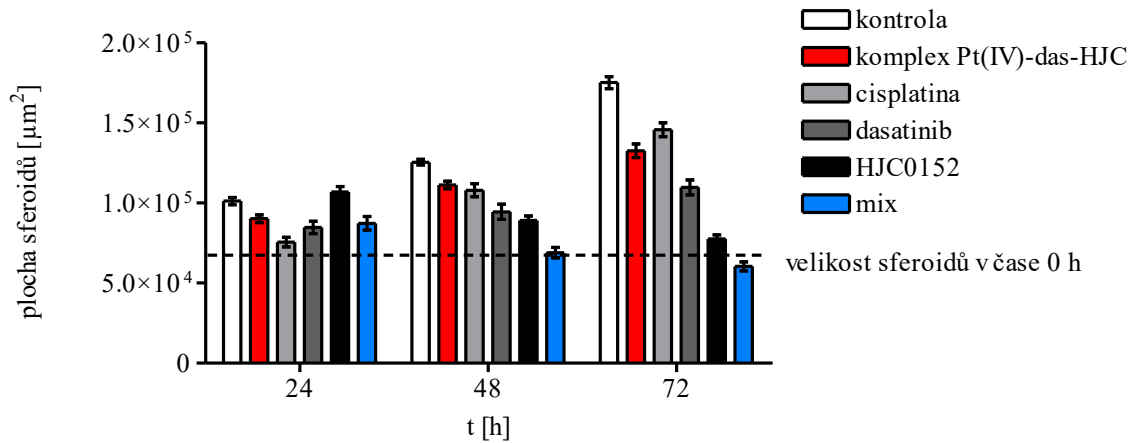
Buněčná linie	MCF-7	MDA-MB-231
	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]
Komplex Pt(IV)-das-HJC	28,8 $\pm$ 0,1	20,4 $\pm$ 0,1
Cisplatina	24,9 $\pm$ 0,1	49,6 $\pm$ 0,2
Dasatinib	30,7 $\pm$ 0,2	13,6 $\pm$ 0,1
HJC	11,7 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 0,1
Mix (1:1:1)	7,9 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1

Na 3D sferoidech je účinnost studovaných komplexů nižší než na 2D adherentních buněčných liniích. K nižší aktivitě komplexů může přispívat nižší schopnost penetrace komplexu dovnitř do sferoidu. Primárně jsou tedy komplexy ovlivněny okrajové buňky sferoidu a dochází spíše ke zmenšování sferoidů.

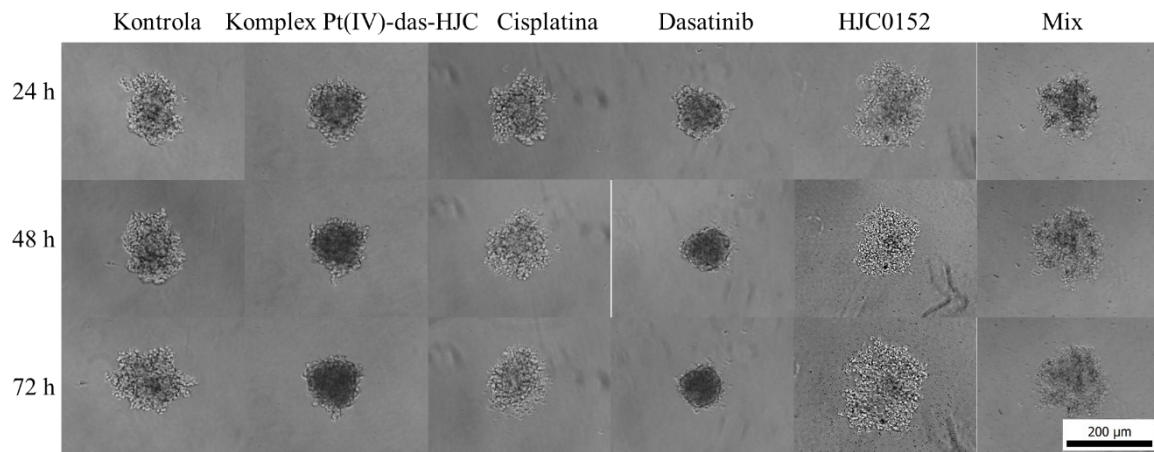
Dalším ověřením účinnosti látek bylo tedy sledování změny plochy sferoidů ošetřených zmíněnými látkami. Jednotlivé sferoidy byly v průběhu času foceny a jejich plocha byla vyhodnocena v programu ImageJ. Sferoidy byly foceny pro buněčnou linii MCF-7 a MDA-MB-231 v časech 0, 24, 48, 72 hodin (viz. Obrázek 15 a Obrázek 17). Vyhodnocení pro dané linie znázorňuje Obrázek 16 a Obrázek 18.



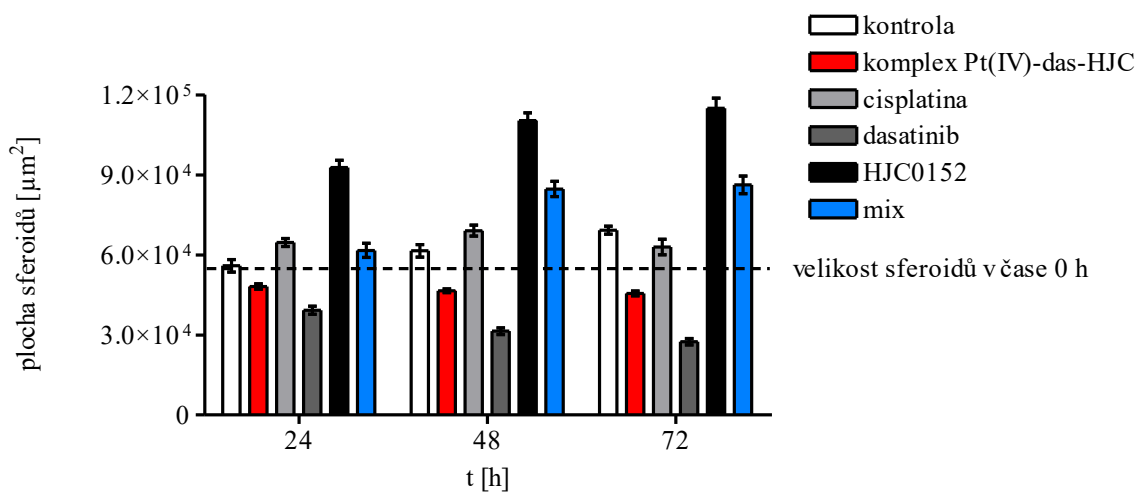
Obrázek 15: MCF-7 sferoidy ošetřené komplexy o koncentraci 20  $\mu\text{M}$ .



Obrázek 16: Graf závislosti změny plochy sferoidů na čase (buněčná linie MCF-7). Sferoidy byly ošetřeny komplexy o koncentraci 20 μM. V čase 0 h byly nasazeny stejně velké sferoidy.



Obrázek 17: MDA-MB-231 sferoidy ošetřeny komplexy o koncentraci 20 μM.

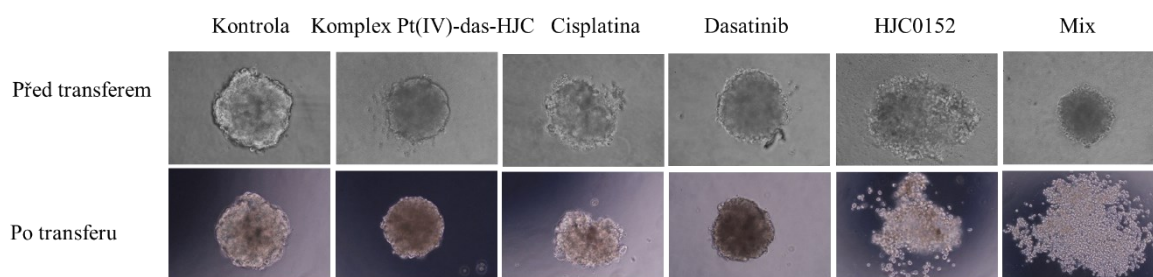


Obrázek 18: Graf závislosti změny plochy sferoidů na čase (buněčná linie MDA-MB-231). Sferoidy byly ošetřeny komplexy o koncentraci 20 μM. V čase 0 h byly nasazeny stejně velké sferoidy.

Obrázek 15 a Obrázek 16 zobrazuje účinnost komplexů u buněčné linie MCF-7. Nejúčinnější byl u této linie mix jednotlivých látek (dasatinib:cisplatina:HJC, 1:1:1), který sferoidy nejvíce zmenšoval.

Pro buňky MDA-MB-231 byly sledovány změny růstu sferoidů ve stejných časových intervalech jako pro buněčnou linii MCF-7 (viz. Obrázek 17 a Obrázek 18). Výsledky pozorované pro sferoidy linie MDA-MB-231 jsou však odlišné. Tyto sferoidy byly nejvíce zmenšovány po ošetření dasatinibem a komplexem Pt(IV)-das-HJC. MDA-MB-231 sferoidy ošetřené HJC inhibitorem či mixem byly dokonce větší než netreatované kontroly. Možným vysvětlením je jejich „rozsypávání“.

Buňky MDA-MB-231 tvoří tzv. nepravé sferoidy, které nejsou tolik kompaktní a nemají pevné mezibuněčné spoje. Dobře penetrující látky je dokážou snadno rozvolnit (rozsypat). Odečítaná plocha sferoidu pak může být trochu zavádějící, kdy rozsypané sferoidy vidíme jako sferoidy s vyšší plochou. Komplex Pt(IV)-das-HJC společně s dasatinibem se jeví jako látky, které MDA-MB-231 sferoidy nejméně rozvolňují. Překvapivě, podobný efekt byl pozorován u MCF-7 sferoidů po ovlivnění komplexu přenesených na mikroskopické sklíčko. U sferoidů ovlivněných cisplatinou, HJC inhibitorem či mixem, jsme pozorovali rozsypání sferoidů na jednotlivé buňky. Zatímco MCF-7 sferoidy ovlivněné dasatinibem či Pt(IV)-das-HJC komplexem zůstaly podobně jako v případě neovlivněných sferoidů kompaktní a touto manipulací se nerozpadly (viz. Obrázek 19).



Obrázek 19: Sledování transferu sferoidů pro buněčnou linii MCF-7.

U buněčné linie MCF-7 sice komplex Pt(IV)-das-HJC tedy nezmenšuje sferoidy, ale po následné manipulaci jsme zjistili, že alespoň nepotencuje jejich „rozsypávání“ (viz. Obrázek 19).

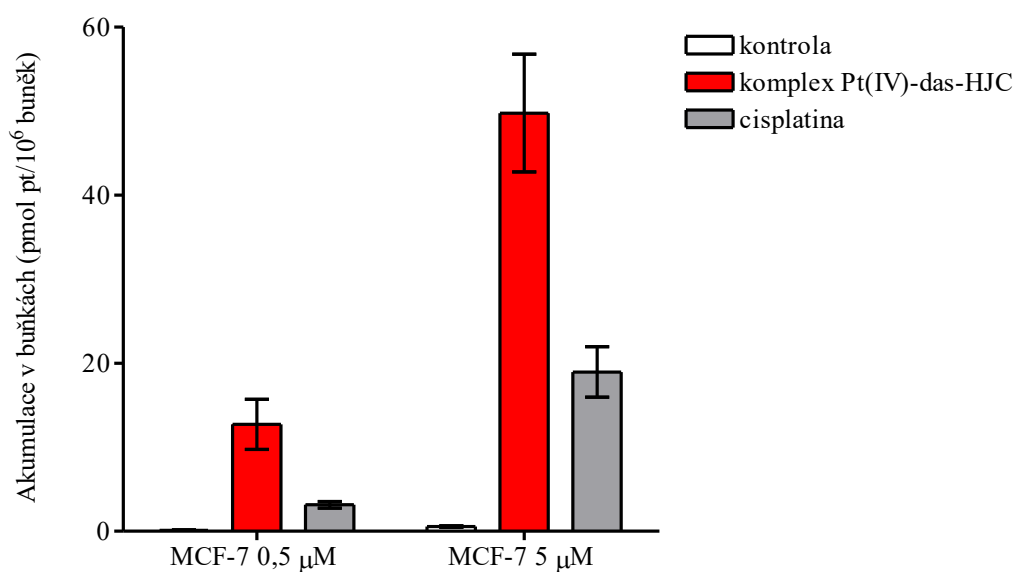
#### 5.4 Akumulace komplexů v buňkách

Dalším z cílů práce bylo stanovit schopnost průniku komplexu do nádorových buněk a jeho finální akumulace v buňkách.

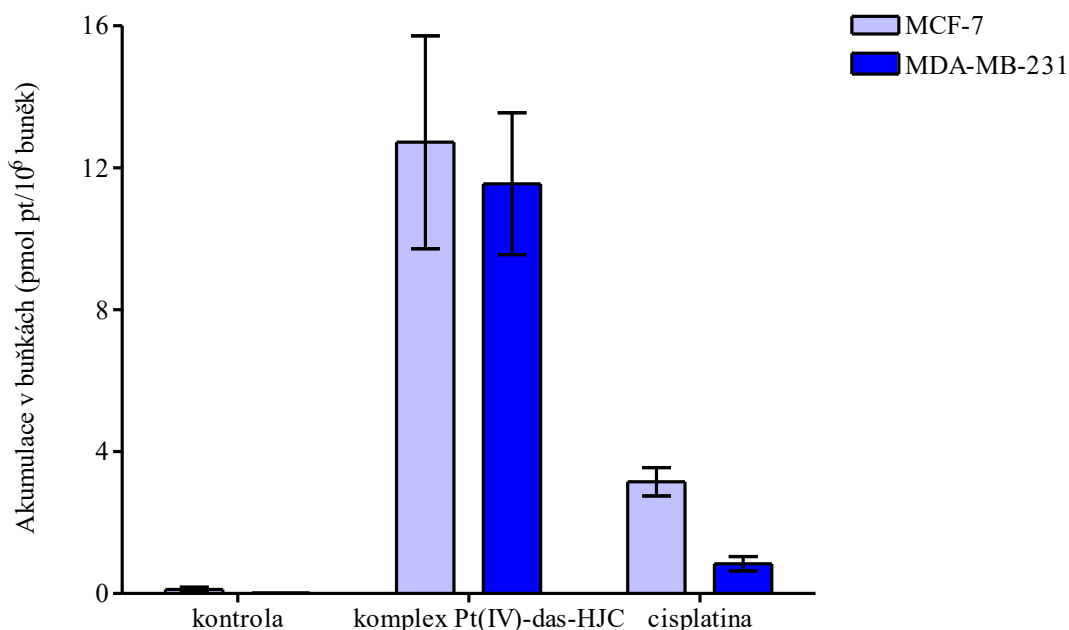
Bylo stanoveno množství kovu, konkrétně platiny za pomoci hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Byla použita buněčná linie MCF-7 a MDA-MB-231. Tabulka 3, Obrázek 20 a Obrázek 21 zobrazují výsledky akumulace komplexů.

Tabulka 3: Akumulace komplexů v buňkách pro MCF-7 a MDA-MB-231 (variabilita buněk > 90 %)

Vzorky		pmol Pt/1 mil buněk
MCF-7 (0,5 μM/4 h)	Kontrola	0,10 ± 0,06
	Komplex Pt(IV)-das-HJC	13 ± 3
	Cisplatina	3,1 ± 0,4
MDA-MB-231 (0,5 μM/4 h)	Kontrola	0,0
	Komplex Pt(IV)-das-HJC	12 ± 2
	Cisplatina	0,8 ± 0,2
MCF-7 (5 μM/4 h)	Kontrola	0,6 ± 0,1
	Komplex Pt(IV)-das-HJC	50 ± 7
	Cisplatina	19 ± 3



Obrázek 20: Akumulace komplexu Pt/IV-das-HJC a cisplatin v MCF-7 buňkách. Buňky byly ošetřeny komplexem či cisplatinou o koncentraci 0,5 μM či 5 μM po dobu 4 h.



Obrázek 21: Akumulace komplexu Pt(IV)-das-HJC a cisplatin v MCF-7 a MDA-MB-231 buňkách. Buňky byly ošetřeny komplexem či cisplatinou o koncentraci 0,5  $\mu$ M po dobu 4 h.

Výsledky ukazují na signifikantně vyšší akumulaci komplexu Pt(IV)-das-HJC u obou buněčných linií MCF-7 a MDA-MB-231 v porovnání s cisplatinou. V porovnání s cisplatinou je akumulace komplexu Pt(IV)-das-HJC 2,6 až 4,1krát vyšší v MCF-7 buněčné linii. V MDA-MB-231 buněčné linii je akumulace komplexu dokonce 14,5krát vyšší v porovnání s cisplatinou. Zvýšený průnik a akumulace komplexu v buňkách bude zřejmě přispívat k vyšší cytotoxické aktivitě tohoto komplexu.

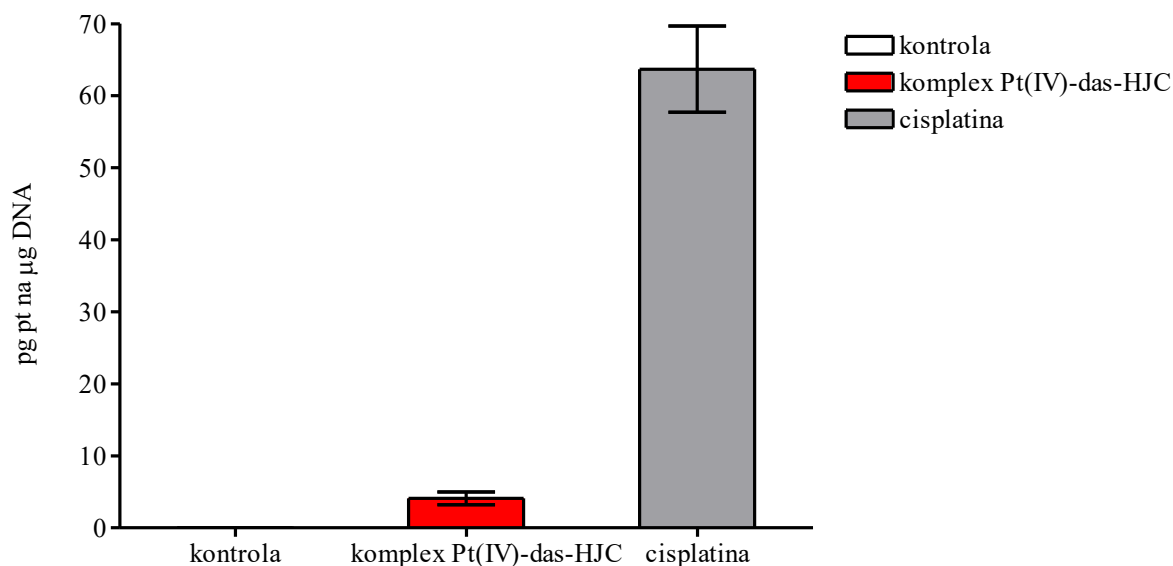
### 5.5 Vazba komplexu na jadernou DNA

Kromě stanovení množství komplexu akumulovaného v nádorových buňkách nás zajímalo také to, zda se komplex váže na jadernou DNA v jádře buňky. Byla vyizolovaná jaderná DNA z buněk ovlivněných komplexem Pt(IV)-das-HJC či cisplatinou.

Bylo stanoveno množství platiny na množství DNA pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Byly použity buňky MCF-7. Pro buňky MDA-MB-231 bylo možné použít pouze velmi nízkou koncentraci komplexu Pt(IV)-das-HJC (< 0,1  $\mu$ M), abychom mohli pracovat ještě s živými buňkami. Bohužel při takto nízké koncentraci komplexu nebylo možné stanovit jeho množství navázané na jaderné DNA. Množství platiny bylo pod hranici detekce přístroje ICP-MS. Tabulka 4 uvádí hodnoty získané v buňkách MCF-7, kde mohla být použita vyšší koncentrace komplexu Pt(IV)-das-HJC a mohlo být stanoveno množství platiny na jaderné DNA.

Tabulka 4: Stanovení vazby komplexu na jadernou DNA pro MCF-7

Vzorek	pg Pt na $\mu$ g DNA
Kontrola	0
Komplex Pt(IV)-das-HJC	4 $\pm$ 1
Cisplatina	64 $\pm$ 6



Obrázek 22: Množství komplexu Pt(IV)-das-HJC a cisplatinu navázané na jaderné DNA. Buňky MCF-7 byly ošetřeny komplexem či cisplatinou o koncentraci odpovídající  $1 \times IC_{50} MTT$ , 72 h po dobu 24 h.

Tabulka 4 zobrazuje, že při koncentracích komplexu či cisplatinu odpovídajících hodnotě  $1 \times IC_{50}$  (získaných MTT po 72 h), je množství komplexu Pt(IV)-das-HJC navázaného na jadernou DNA cca 15krát nižší než pro cisplatinu. Zatímco pro cisplatinu je DNA významným cílovým místem její protinádorové účinnosti, pro komplex Pt(IV)-das-HJC budou zřejmě hrát důležitou roli i jiná cílová místa.

## 5.6 Účinnost komplexů v NER-deficientní buněčné linii

Abychom ukázali, jakou roli v protinádorovém mechanismu hraje poškození jaderné DNA komplexem Pt(IV)-das-HJC, provedli jsme experiment s využitím buněčných linií CHO-K1 a její mutantní partnerské linie MMC-2 (linie NER-deficientní).

Tabulka 5: MTT test, hodnoty  $IC_{50}$  pro buněčné linie CHO-K1 a MMC-2

IC <sub>50</sub> (µM), 72 h, MTT			
	CHO-K1	MMC-2	Poměr IC <sub>50</sub> <sub>CHO-K1</sub> /IC <sub>50</sub> <sub>MMC-2</sub>
Komplex Pt(IV)- das-HJC	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,02	1,2
Dasatinib	4,6 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,3
Cisplatina	9,0 ± 0,9	1,4 ± 0,2	6,4
HJC	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,6	0,7
Mix (1:1:1)	0,41 ± 0,07	0,4 ± 0,1	1,0

Tabulka 5 ukazuje, že pro cisplatinu, u níž je poškození DNA známé cílové místo její protinádorové účinnosti, jsou buňky s nefunkčním DNA opravným mechanismem (NER) významně citlivější (6,4krát) než buňky parentální. V případě komplexu Pt(IV)-das-HJC k takovému výraznému zcitlivění nedochází. Účinnost komplexu Pt(IV)-das-HJC je shodná

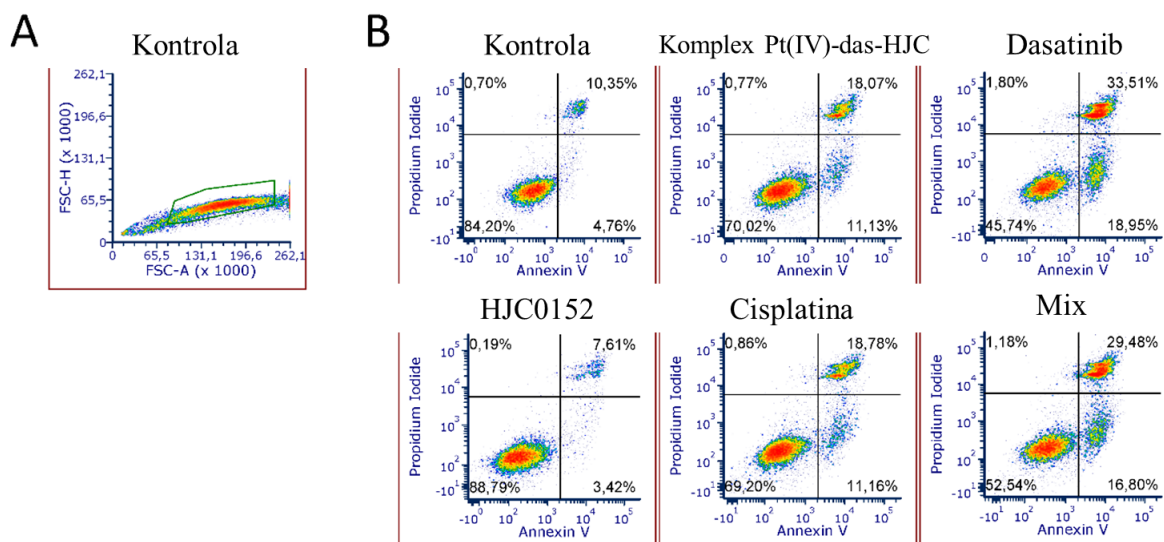


v buňkách parentálních (CHO-K1) i v buňkách NER-deficientních (MMC-2). Lze tedy usuzovat, že pro nový komplex Pt(IV)-das-HJC nebude hrát jaderná DNA tak významnou roli v mechanismu protinádorové účinnosti, jako je tomu v případě cisplatiny.

## 5.7 Stanovení buněčné smrti

Buněčnou smrt jsme stanovili použitím dvojitého barvení Annexin V/PI. Jako buněčnou smrt touto metodou stanovujeme buď apoptózu, nebo nekrózu. Mezi těmito typy buněčné smrti jsou některé podstatné rozdíly. Při apoptóze neboli programované buněčné smrti se buňka zmenšuje, tedy scvrkává. Mezitím u nekrózy buňka zvětšuje svůj objem, tedy bobtná. Annexin V se jako protein váže k apoptotickým buňkám silnou interakcí s fosfatidylserinem, který je součástí buněčných membrán. Fosfatidylserin je fosfolipidem, který je běžně lokalizován na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Při počátku apoptózy je transportován na vnější stranu membrány. Na vnější straně navádí signálem fagocyty směrem k apoptotické buňce. Červené fluorescenční barvivo propidium jodid proniká do jádra, kde barví DNA. Do buněk se dostane skrze narušenou membránu nekrotických a pozdně apoptotických buněk [41, 42, 43].

Buňky byly vyhodnoceny na Flow cytometru BD FACS. Obrázek 23 B, poukazuje na densitogramy rozdělené na 4 kvadranty. V levém dolním kvadrantu se nacházejí vitální buňky (Annexin V – negativní, PI – negativní). V pravém dolním kvadrantu se nacházejí raně apoptotické buňky (Annexin V – pozitivní, PI – negativní). V pravém horním kvadrantu se nacházejí buňky pozdně apoptotické či nekrotické (Annexin V – pozitivní, PI – pozitivní) a v levém horním kvadrantu se nacházejí buňky nekrotické (Annexin V – negativní, PI – pozitivní) [41, 42, 43].



Obrázek 23: Annexin V/PI assay. MDA-MB-231 buňky byly ovlivněny komplexy o koncentraci odpovídající  $1 \times IC_{50} MTT$ , 72 h po dobu 24 h. A) Výběr populace buněk bez buněčné debris či agregátů. B) Densitogramy ukazující distribuci buněk v jednotlivých kvadrantech.

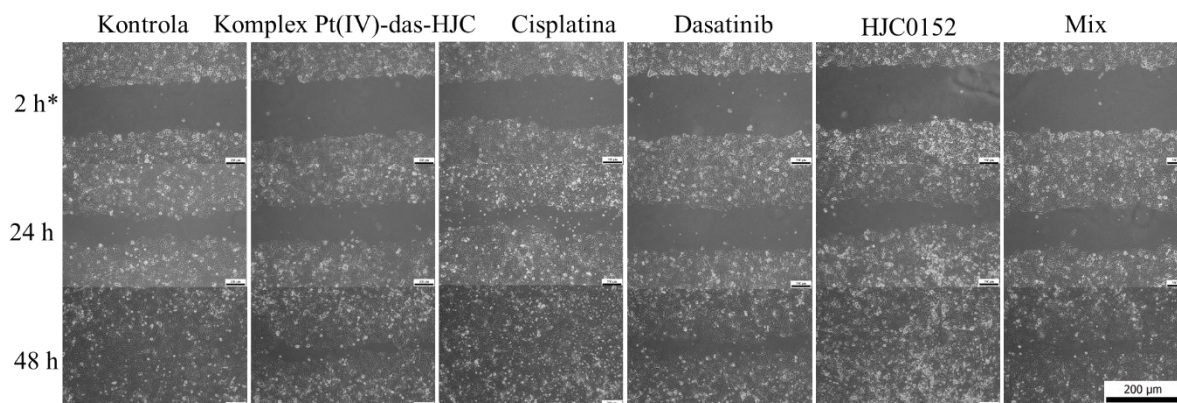
Pro buněčnou linii MCF-7 se nepodařilo získat densitogramy, ze kterých by bylo možné stanovit, zda jde o smrt buněk apoptózou či nekrózou. Největším zádrhelem bylo, že již v kontrolních netreatovaných buňkách bylo vysoké procento mrtvých buněk. Pro buňky MCF-7

bude potřeba pozměnit protokol sběru, barvení a analýzy buněk. Toto již bude předmětem dalších studií a nebude zahrnuto v předložené bakalářské práci.

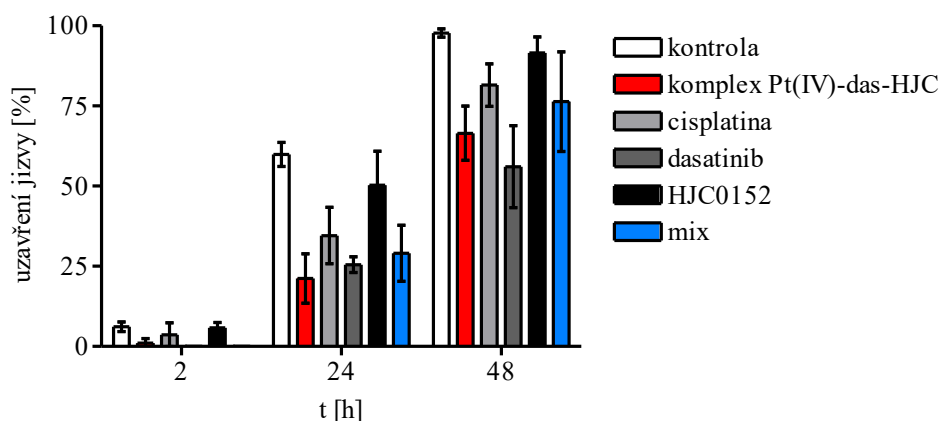
Obrázek 23 zobrazuje, že podobně jako pro cisplatinu je po ovlivnění MDA-MB-231 buněk komplexem Pt(IV)-das-HJC, cca 11% buněčné populace v kvadrantu Annexin V – pozitivní, PI – negativní ukazující na apoptotický typ smrti. Vyšší procenta buněk byla v tomto kvadrantu zjištěna pro dasatinib či směs jednotlivých složek značící opět, že buňky MDA-MB-231 po ovlivnění dasatinibem či mixem umírají apoptotickou smrtí. Informaci, zda jde opravdu o buněčnou smrt apoptózou či jiným typem buněčné smrti jdoucí přes Annexin V pozitivitu (jakou je například onkóza) bude opět předmětem dalších studií.

### 5.8 Stanovení antimigračních vlastností komplexu metodou zacelování jizvy

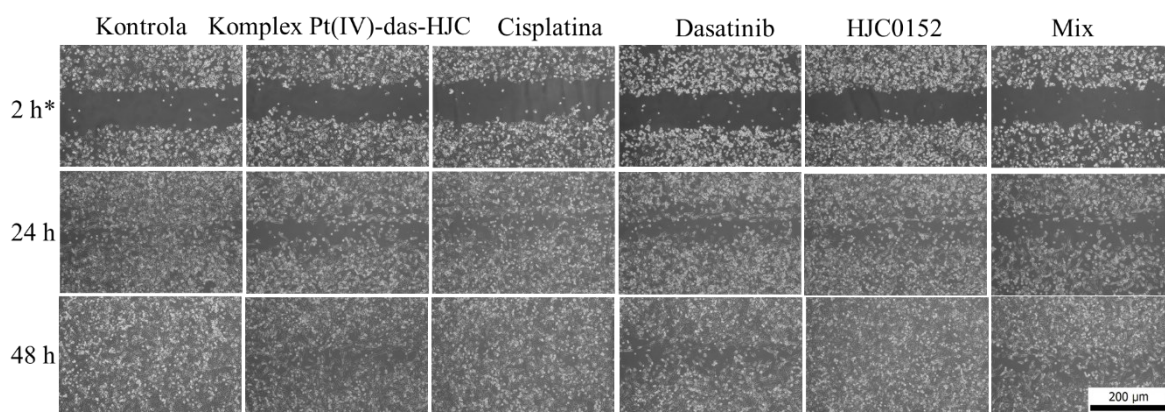
Pro stanovení antimigračních vlastností komplexu bylo sledováno zarůstání vytvořených jizev. Buňky, které ztratí po ošetření komplexem svoje migrační vlastnosti, se nedostávají do místa jizvy a jizva zůstává otevřena. Pro tento experiment byla použita linie MCF-7 a MDA-MB-231. Buňky MCF-7 byly ošetřeny komplexem o koncentraci 0,3  $\mu\text{M}$  po dobu 2 hodin a poté byly komplexy odmyty. Pro buňky MDA-MB-231 byly použity komplexy o koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$ . Jizvy byly sledovány a foceny po dobu 2, 24 a 48 hodin (viz. Obrázek 24 a Obrázek 26). Plocha jizvy pro jednotlivé komplexy a časy byla vyhodnocena v programu ImageJ.



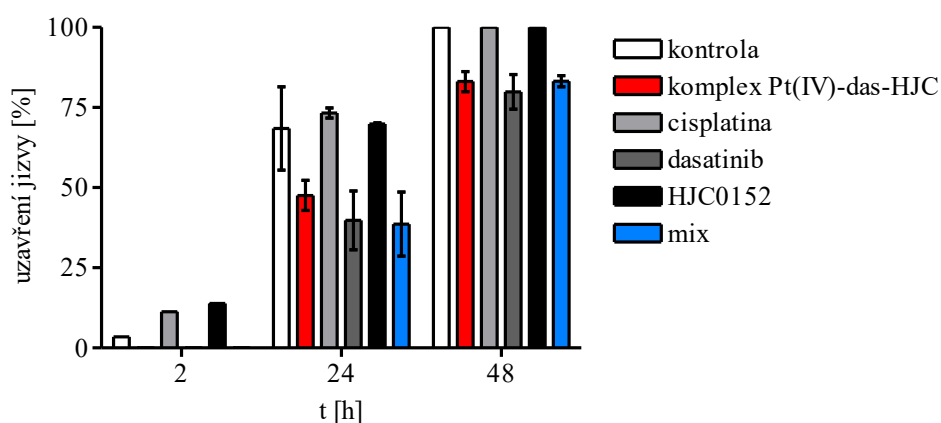
Obrázek 24: Sledování zarůstání jizev vytvořených v kultuře MCF-7 buněk \*(pro čas 2 h bylo vyměněno médium s komplexem o koncentraci 0,3  $\mu\text{M}$  za čisté médium).



Obrázek 25: Graf závislosti procentuálního uzavírání plochy jizvy na čase. Buňky MCF-7 byly ošetřeny komplexy o koncentraci  $0,3 \mu\text{M}$  po dobu 2 h (pro čas 2 h bylo vyměněno médium s komplexy za čisté médium). Procenta uzavření jsou vztahována k jizvě v čase 0 h (vytvoření jizvy, před treatmentem, 0 h ~ uzavření 0 %).



Obrázek 26: Sledování zarůstání jizev vytvořených v kultuře MDA-MB-231 buněk \*(pro čas 2 h bylo vyměněno médium s komplexy o koncentraci  $0,1 \mu\text{M}$  za čisté médium).



Obrázek 27: Graf závislosti procentuálního uzavírání plochy jizvy na čase. Buňky MDA-MB-231 byly ošetřeny komplexy o koncentraci  $0,1 \mu\text{M}$  po dobu 2 h (pro čas 2 h bylo vyměněno médium s komplexy za čisté médium). Procenta uzavření jsou vztahována k jizvě v čase 0 h (vytvoření jizvy, před treatmentem, 0 h ~ uzavření 0 %).

Obrázek 24 a Obrázek 25 ukazuje, že pro buněčnou linii MCF-7 došlo k největšímu uzavření jizvy u kontroly a po ošetření HJC0152. Naopak nejméně „zamigrovaná“ byla jizva po 48 h po ošetření dasatinibem či Pt(IV)-das-HJC komplexem. Podobně bylo pozorováno u linie MDA-MB-231 (viz. Obrázek 26 a Obrázek 27), kde opět dasatinib a komplex Pt(IV)-das-HJC, navíc také mix, nejvíce bránily zarůstání jizvy.

Z výsledků těchto experimentů můžeme říci, že u obou linií jsou pro komplex Pt(IV)-das-HJC potvrzeny jeho antimigrační vlastnosti.

## 6 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci byla studována protinádorová a antimetastatická aktivita nového komplexu Pt(IV)-das-HJC, obsahujícího inhibitor proteinových kináz a STAT3 inhibitor. Aktivita komplexu Pt(IV)-das-HJC byla porovnána s jednotlivými složkami, cisplatinou, dasatinibem, HJC0152 inhibitorem či jejich mixem.

Na 2D adherentních buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231 vykazuje nově připravený komplex Pt(IV)-das-HJC nejvyšší účinnost. Překvapivě vykazuje vysokou účinnost v linii MCF-7, ve které jednotlivé složky (cisplatin, dasatinib, HJC0152), pokud použijeme samostatně, jsou signifikantně méně účinné. Jejich smícháním do mixu (1:1:1) a aplikací na buněčné linie dochází k synergistickému efektu a aktivita je značně zvýšena. Pokud jsou tyto látky spojeny do Pt(IV)-das-HJC komplexu, je aktivita ještě vyšší (u linie MDA-MB-231). Spojení tří funkčních látek do jedné molekuly se ukazuje u hlediska antiproliferativních vlastností jako účinnější než jejich prosté smíchání do směsi.

Průnik a akumulace komplexu Pt(IV)-das-HJC je v porovnání s cisplatinou vyšší, nicméně množství stanovené na jaderné DNA je oproti cisplatině mnohem nižší. Společně s experimentem využívajícím pár buněčných linií CHO-K1 a MMC-2 (s defektním NER mechanismem) poukazuje toto zjištění na fakt, že na rozdíl od cisplatin budou v mechanismu protinádorové účinnosti nového Pt(IV) komplexu hrát roli také další cílová místa či mechanismy.

Důležitým výsledkem této práce je, že byly experimentem zacelování jizvy zjištěny antimigrační vlastnosti nového Pt(IV)-das-HJC komplexu. Navíc schopnost komplexu Pt(IV)-das-HJC nenarušovat mezibuněčné spoje ve 3D kulturách (sferoidech), a tudíž nezvyšovat motilitu buněk, je také dalším slibným parametrem pro účinná antimetastatická chemoterapeutika.

Spojení tří funkčních látek do jedné molekuly komplexu Pt(IV)-das-HJC se ukázalo být jako výhodné z hlediska vyšší účinnosti, v porovnání se směsí jednotlivých složek. Důležité jsou také antimigrační vlastnosti nového komplexu, které jsou určitě velkou výhodou pro nová potenciální protinádorová léčiva.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. ALTANER, Čestmír. *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*. Vyd. v českém jazyce 1. Praha: Liga proti rakovině, 2008. ISBN isbn978-80-86031-85-9. [cit. 2024-05-18].
2. *Cancer*. Online. What is cancer? 2021. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [cit. 2024-04-20].
3. *Cancer*. Online. Cancer. 2022. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/12194-cancer>. [cit. 2024-05-18].
4. *Cancer treatment*. Online. Cancer treatment. 2022. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/cancer-treatment/about/pac-20393344>. [cit. 2024-04-22].
5. ROQUE-DIAZ, Yessica; SANADAR, Martina; HAN, Dong; LÓPEZ-MESAS, Montserrat; VALIENTE, Manuel et al. The Dark Side of Platinum Based Cytostatic Drugs: From Detection to Removal. Online. *Processes*. 2021, roč. 9, č. 11. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr9111873>. [cit. 2024-05-16].
6. VILLASANA, Minaya; OCHOA, Gabriela a AGUILAR, Soraya. Modeling and optimization of combined cytostatic and cytotoxic cancer chemotherapy. Online. *Artificial Intelligence in Medicine*. 2010, roč. 50, č. 3, s. 163-173. ISSN 09333657. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2010.05.009>. [cit. 2024-05-18].
7. ANTHONY, Elizabeth J.; BOLITHO, Elizabeth M.; BRIDGEWATER, Hannah E.; CARTER, Oliver W. L.; DONNELLY, Jane M. et al. Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. Online. *Chemical Science*. 2020, roč. 11, č. 48, s. 12888-12917. ISSN 2041-6520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>. [cit. 2024-05-18].
8. PEÑA, Quim; WANG, Alec; ZAREMBA, Orysia; SHI, Yang; SCHEEREN, Hans W. et al. Metallodrugs in cancer nanomedicine. Online. *Chemical Society Reviews*. 2022, roč. 51, č. 7, s. 2544-2582. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1CS00468A>. [cit. 2024-05-16].
9. WANG, Xiaohui; WANG, Xiaoyong; JIN, Suxing; MUHAMMAD, Nafees a GUO, Zijian. Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs. Online. *Chemical Reviews*. 2019, roč. 119, č. 2, s. 1138-1192. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00209>. [cit. 2024-05-18].
10. DONG, Xiao; BRAHMA, Rajeev K.; FANG, Chao a YAO, Shao Q. Stimulus-responsive self-assembled prodrugs in cancer therapy. Online. *Chemical Science*. 2022, roč. 13, č. 15, s. 4239-4269. ISSN 2041-6520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D2SC01003H>. [cit. 2024-05-18].
11. BAI, Linkui; GAO, Chuanzhu; LIU, Qinghua; YU, Congtao; ZHANG, Zhuxin et al. Research progress in modern structure of platinum complexes. Online. *European Journal*

- of Medicinal Chemistry*. 2017, roč. 140, s. 349-382. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.034>. [cit. 2024-05-19].
12. ZHANG, Chunyu; XU, Chao; GAO, Xueyun a YAO, Qingqiang. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. Online. *Theranostics*. 2022, roč. 12, č. 5, s. 2115-2132. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.69424>. [cit. 2024-05-19].
  13. BRABEC, Viktor; HRABINA, Ondrej a KASPARKOVA, Jana. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. Online. *Coordination Chemistry Reviews*. 2017, roč. 351, s. 2-31. ISSN 00108545. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.04.013>. [cit. 2024-05-18].
  14. CHEN, Shang-Hung a CHANG, Jang-Yang. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20174136>. [cit. 2024-05-18].
  15. ALCINDOR, Thierry a BEAUGER, N. Oxaliplatin: A Review in the Era of Molecularly Targeted Therapy. Online. *Current Oncology*. 2011, roč. 18, č. 1, s. 18-25. ISSN 1718-7729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3747/co.v18i1.708>. [cit. 2024-05-16].
  16. GRAMATICA, Paola; PAPA, Ester; LUINI, Mara; MONTI, Elena; GARIBOLDI, Marzia B. et al. Antiproliferative Pt(IV) complexes: synthesis, biological activity, and quantitative structure–activity relationship modeling. Online. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2010, roč. 15, č. 7, s. 1157-1169. ISSN 0949-8257. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0676-4>. [cit. 2024-05-16].
  17. ZHU, Chen; REN, Xiuhua; LIU, Dong a ZHANG, Chengliang. Oxaliplatin-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. Online. *Toxicology*. 2021, roč. 460. ISSN 0300483X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152882>. [cit. 2024-05-18].
  18. GIRAUD-PANIS, Marie-Josèphe a LENG, Marc. Transplatin-modified oligonucleotides as modulators of gene expression. Online. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000, roč. 85, č. 3, s. 175-181. ISSN 01637258. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00058-3). [cit. 2024-05-19].
  19. GHOSH, Sumit. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Online. *Bioorganic Chemistry*. 2019, roč. 88. ISSN 00452068. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>. [cit. 2024-05-18].
  20. TCHOUNWOU, Paul B; DASARI, Shaloam; NOUBISSI, Felicite K; RAY, Paresh a KUMAR, Sanjay. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. Online. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2021, roč. 13, s. 303-328. ISSN 1179-1454. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>. [cit. 2024-05-18].
  21. ALDOSSARY, Sara A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. Online. *Biomedical and Pharmacology Journal*.

- 2019, roč. 12, č. 1, s. 07-15. ISSN 09746242. Dostupné z: <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>. [cit. 2024-05-18].
22. MU, Meilin; ZHAN, Jiuyu; DAI, Xiaohan a GAO, Hongwei. Research progress of azido-containing Pt(IV) antitumor compounds. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022, roč. 227. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113927>. [cit. 2024-05-16].
23. BAHMAN, Fatemah; PITTALÀ, Valeria; HAIDER, Mohamed a GREISH, Khaled. Enhanced Anticancer Activity of Nanoformulation of Dasatinib against Triple-Negative Breast Cancer. Online. *Journal of Personalized Medicine*. 2021, roč. 11, č. 6. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm11060559>. [cit. 2024-05-16].
24. HUANG, Liling; JIANG, Shiyu a SHI, Yuankai. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001–2020). Online. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020, roč. 13, č. 1. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00977-0>. [cit. 2024-05-16].
25. FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-Peter a LECOATER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. Online. *Nature Medicine*. 2003, roč. 9, č. 6, s. 669-676. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>. [cit. 2024-05-19].
26. LEVÊQUE, Dominique; BECKER, Guillaume; BILGER, Karin a NATARAJAN-AMÉ, Shanti. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dasatinib. Online. *Clinical Pharmacokinetics*. 2020, roč. 59, č. 7, s. 849-856. ISSN 0312-5963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00872-4>. [cit. 2024-05-18].
27. ARAUJO, John a LOGOTHETIS, Christopher. Dasatinib: A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. Online. *Cancer Treatment Reviews*. 2010, roč. 36, č. 6, s. 492-500. ISSN 03057372. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.02.015>. [cit. 2024-05-18].
28. FAUZIYA; GUPTA, Akash; NADAF, Arif; AHMAD, Shadaan; HASAN, Nazeer et al. Dasatinib: a potential tyrosine kinase inhibitor to fight against multiple cancer malignancies. Online. *Medical Oncology*. 2023, roč. 40, č. 6. ISSN 1559-131X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02018-5>. [cit. 2024-05-16].
29. KEATING, Gillian M. Dasatinib: A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph+ Acute Lymphoblastic Leukaemia. Online. *Drugs*. 2017, roč. 77, č. 1, s. 85-96. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0677-x>. [cit. 2024-05-18].
30. VENER, Claudia; BANZI, Rita; AMBROGI, Federico; FERRERO, Annalisa; SAGLIO, Giuseppe et al. First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: a systematic review and meta-analysis. Online. *Blood Advances*. 2020, roč. 4, č. 12, s. 2723-2735. ISSN 2473-9529. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001329>. [cit. 2024-05-18].



31. CHEN, Haijun; YANG, Zhengduo; DING, Chunyong; CHU, Lili; ZHANG, Yusong et al. Discovery of O -Alkylamino-Tethered Niclosamide Derivatives as Potent and Orally Bioavailable Anticancer Agents. Online. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013, roč. 4, č. 2, s. 180-185. ISSN 1948-5875. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ml3003082>. [cit. 2024-05-18].
32. HILLMER, Emily J.; ZHANG, Huiyuan; LI, Haiyan S. a WATOWICH, Stephanie S. STAT3 signaling in immunity. Online. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2016, roč. 31, s. 1-15. ISSN 13596101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.05.001>. [cit. 2024-05-16].
33. A novel STAT3 inhibitor, HJC0152, exerts potent antitumor activity in glioblastoma. Online. *Original article*. 2019, roč. 9, č. 4, s. 15. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6511646/>. [cit. 2024-05-18].
34. VASIYANI, Hitesh; MANE, Minal; RANA, Khushboo; SHINDE, Anjali; ROY, Milton et al. DNA damage induces STING mediated IL-6-STAT3 survival pathway in triple-negative breast cancer cells and decreased survival of breast cancer patients. Online. *Apoptosis*. 2022, roč. 27, č. 11-12, s. 961-978. ISSN 1360-8185. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01763-8>. [cit. 2024-05-16].
35. DONG, J; XU, J; KIM, H; ZHOU, J a SHEN, Q. Abstract P2-06-13: A novel small molecule JMX0293 inhibits the growth of triple-negative breast cancer via suppressing STAT3 and inducing apoptosis. Online. *Cancer Research*. 2019, roč. 79, č. 4\_Supplement, s. P2-06-13-P2-06-13. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS18-P2-06-13>. [cit. 2024-05-16].
36. MOKHTARI, Reza Bayat; HOMAYOUNI, Tina S.; BALUCH, Narges; MORGATSKAYA, Evgeniya; KUMAR, Sushil et al. Combination therapy in combating cancer. Online. *Oncotarget*. 2017, roč. 8, č. 23, s. 38022-38043. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>. [cit. 2024-05-19].
37. DASARI, Shaloam; NJIKI, Sylvianne; MBEMI, Ariane; YEDJOU, Clement G. a TCHOUNWOU, Paul B. Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23031532>. [cit. 2024-05-16].
38. PICHOT, C S; HARTIG, S M; XIA, L; ARVANITIS, C; MONISVAIS, D et al. Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. Online. *British Journal of Cancer*. 2009, roč. 101, č. 1, s. 38-47. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605101>. [cit. 2024-05-16].
39. RIVANKAR, Sangeeta. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. Online. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2014, roč. 10, č. 4. ISSN 0973-1482. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>. [cit. 2024-05-16].

40. RAUF, Abdul; ISHTIAQ, Muhammad; SIDDIQUI, Muhammad Kamran a ANDLEEB, Rimsha. Topological Properties of Doxorubicin Conjugated PEG-PAsp Copolymer Molecular Structure Used in Cancer Treatment. Online. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2022, roč. 42, č. 4, s. 1596-1609. ISSN 1040-6638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1791918>. [cit. 2024-05-16].
41. VERMES, I.; HAANEN, C. a REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. Online. *Journal of Immunological Methods*. 2000, roč. 243, č. 1-2, s. 167-190. ISSN 00221759. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7). [cit. 2024-04-27].
42. RIEGER, Aja M.; NELSON, Kimberly L.; KONOWALCHUK, Jeffrey D. a BARREDA, Daniel R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2011, č. 50. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/2597>. [cit. 2024-04-27].
43. ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Online. *Toxicologic Pathology*. 2007, roč. 35, č. 4, s. 495-516. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>. [cit. 2024-04-27].

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin-5'-trifosfát
BOC	Terčbutyloxykarbonyl
BSA	Hovězí sérový albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EGF	Epidermální růstový faktor
gDNA	Genomická DNA
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IC50	Koncentrace zodpovědná za 50% inhibici růstu nádorové linie
kap.	Kapitola
mtDNA	Mitochondriální DNA
MTT	3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-difenyyl-2H-tetrazolium bromid
NER	Nukleotidová excizní reparace
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
STAT	Přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TM	Médium tumorsphere
<i>VEGF</i>	Vaskulární endoteliální růstový faktor