



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vliv nových organokovových komplexů na proliferaci nádorových buněk

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Šošolíková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Šošolíková
Název práce	Vliv nových organokovových komplexů na proliferaci nádorových buněk
Typ práce	bakalářská
Vedoucí práce	Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Mezi nejznámější protinádorová cytostatika patří cisplatina, která se využívá k léčbě řady nádorových onemocnění. Interakcí s DNA způsobuje cisplatina vznik jednořetězcových a dvouřetězcových můstků a zlomů. Tento účinek má za následky zastavení buněčného cyklu a následnou indukci apoptosy. Cisplatinovou chemoterapii provází řada závažných nežádoucích účinků, které je třeba eliminovat. Další limitací této léčby je výskyt získané nebo vrozené rezistence k cisplatině. Z těchto důvodů probíhá v dnešní době vývoj nových organokovových derivátů. V praktické části této práce byl zkoumán mechanismus účinků nových organokovových sloučenin s obsahem iridia a osmia na buněčný cyklus a aktivaci apoptosy. Bylo popsáno působení těchto látek a porovnáno se známým mechanismem působení konvenčního léčiva cisplatinu. Účinky byly studovány na linii A2780, která je citlivá k cisplatině a linii A2780cis, která vykazuje k cisplatině rezistenci.

Klíčová slova	cisplatina, iridium, osmium, cisplatinové deriváty, chemoterapie, A2780, A2780cis, apoptosa
Počet stran	59
Počet příloh	0
jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Sosolikova
Name of thesis	Effect of novel organometallic complexes on the proliferation of cancer cells
Type of thesis	bachelor
Supervisor	Mgr. Eva Reznickova, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

One of the best known antitumor cytostatics is cisplatin, which is used to treat a number of tumors. By interacting with DNA, cisplatin causes single-stranded and double-stranded crosslinks and breaks. This effect results in cell cycle arrest and subsequent induction of apoptosis. Cisplatin chemotherapy is accompanied by a number of significant side effects that need to be eliminated. Another limitation of this treatment is the occurrence of acquired or intrinsic resistance to cisplatin. Therefore, new organometallic complexes are currently being developed. The mechanism of effects of new organometallic compounds containing iridium and osmium was investigated in the experimental part of this work. Impact of these compounds on the cell cycle and apoptosis has been described and compared with the known mechanism of action of the conventionally used drug cisplatin. The effects were studied on the human ovarian carcinoma cell line A2780, which is sensitive to cisplatin, and the A2780cis line, which is resistant to cisplatin.

Key words	cisplatin, iridium, osmium, cisplatin derivatives, chemotherapy, A2780, A2780cis, apoptosis
Number of pages	59
Number of appendices	0
language	czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Tereza Šošolíková

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, cenné rady a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za ochotu a praktické rady.

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	8
1 Úvod.....	10
2 Cíle práce	12
3 Současný stav řešené problematiky	13
3.1 Cisplatina.....	13
3.1.1 Historie a struktura.....	13
3.1.2 Transport cisplatiny do buňky	13
3.1.3 Aktivace cisplatiny a interakce s DNA	14
3.1.4 Rozpoznání změn DNA a opravné mechanismy	15
3.1.5 Buněčná odpověď na účinky cisplatiny	16
3.1.6 Rezistence	19
3.1.7 Nežádoucí účinky	21
3.2 Platinové deriváty	22
3.2.1 Karboplatina.....	22
3.2.2 Oxaliplatina	23
4 Neplatinové organokovové deriváty	24
4.1.1 Ruthenium jako centrální atom.....	24
4.1.2 Osmium jako centrální atom.....	28
4.1.3 Iridium jako centrální atom	31
5 Praktická část	34
5.1 Materiál.....	34
5.1.1 Přístroje.....	34
5.1.2 Programy.....	35
5.1.3 Chemikálie	35
5.1.4 Roztoky	36
5.1.5 Biologický materiál.....	37
5.1.6 Testované látky	37
5.1.7 Použité protilátky	37

5.2	Metody.....	38
5.2.1	Kultivace.....	38
5.2.2	Cytotoxicita	39
5.2.3	Ovlivnění testovanými látkami	39
5.2.4	Příprava vzorků pro cytometrickou analýzou	39
5.2.5	Sklízení a lyzace před SDS-PAGE.....	39
5.2.6	Průtoková cytometrie	40
5.2.7	SDS-PAGE	41
5.2.8	Western-blotting a imunodetekce.....	41
6	Výsledky a diskuse	43
6.1	Stanovení antiproliferativní aktivity vybraných látek.....	43
6.2	Analýza buněčného cyklu	44
6.3	Analýza exprese vybraných proteinů.....	49
7	Závěr.....	53
8	Použitá literatura.....	54

Seznam použitých zkratek

AA	Acrylamide
ABC	ATP-binding protein
APS	Ammonium persulfate
ATF-2	Activating Transcription Factor 2
ATM	Ataxia-telangiectasia, mutated
ATP	Adenosin trifosfát
ATR	ATM and Rad3-related
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BER	Base excision repair
BIS	N,N'-methylenebisacrylamide
BSA	Bovine serum albumin
c-Abl	Tyrosine-protein kinase ABL1
c-Jun	c-Jun N-terminal kinases
CTR	High-affinity copper uptake transport protein
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic
ERCC-1	Excision repair cross-complementation group 1
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
GSH	Glutathion
H2AX	H2A histone family member X
hARE	Human antioxidant response element
HMG	High mobility group proteins
HMGB	High-mobility group box
hMSH2	Human MutS homolog
HO-1	Hemoxygenase 1
HSP70	Heat-shock protein
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHK2	Checkpoint kinase 2
IC ₅₀	50% inhibitory concentration

JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAOA	Monoamine oxidase A
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Mouse double minute 2
MDR	Multidrug resistance protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinases
MLH-1	MutL homolog 1
MMP	Matrix metalloproteinase
MMR	Mismatch repair
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NAMI-A	New Anti-tumour Metastasis Inhibitor
NER	Nucleotide Excision Repair
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OCT	Organic cation transporter
PARP	Poly-ADP-ribose polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SLC	Solute carrier transporter
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TBS	Tris-buffered saline
TME	Tumor microenvironment
TNF	Tumor necrosis factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UCP2	Uncoupling protein 2
XP	Xeroderma pigmentosum complementation group
XPF	Xeroderma pigmentosum complementation group F

1 Úvod

Příčinou vzniku maligních onemocnění je kumulace mutací způsobených vnějšími a vnitřními faktory. U transformovaných buněk dochází k deregulaci buněčného cyklu a ztrátě schopnosti podstoupit apoptosu, což má za následek nekontrolované dělení buněk. Nádorová onemocnění jsou dle Světové zdravotnické organizace (WHO - World Health Organization) druhou nejčastější příčinou úmrtí na světě. Pouze za rok 2018 má tento typ onemocnění na svědomí 9,6 milionu úmrtí.

Nádory plic, prostaty, žaludku, jater a kolorektální karcinomy převažují u mužů. U žen se nejčastěji jedná o nádorová onemocnění prsu, plic, děložního čípku a kolorektální karcinomy. Včasná diagnostika a volba vhodného postupu a typu terapie jsou klíčovými faktory pro úspěšnou léčbu.

V dnešní době jsou k léčbě používány jak samotné tradiční léčebné postupy (chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie, radioterapie), tak moderní metody, mezi které patří biologická léčba (imunoterapie), hormonální terapie a další.

V posledních dvou dekadách došlo ke značnému pokroku v oblasti imunologie a také k pochopení vztahu nádorů a imunity (Zhang, Chen, 2018). Prostudování buněčných a molekulárních mechanismů imunitní odpovědi umožnilo vývoj nových protinádorových terapií, jako je například využití monoklonálních protilátek, protinádorových vakcín a samotného imunitního systému pacienta.

Kromě konvenčních postupů léčby se řada studií zabývá také vlivem prostředí, ve kterém se nádor nachází. Teorie TME (tumor microenvironment) pracuje s možností funkce nenádorových buněk v okolí nádoru, jako kritického faktoru hrajícího roli v nádorové patofyziologii (Atiya *et al.*, 2020).

Dalším významným předmětem současného výzkumu jsou nové deriváty již známých léčiv, jako jsou například platinová chemoterapeutika (Siddik, 2003).

Cisplatina je jedním z nejúčinnějších klinicky používaných konvenčních antineoplastik. Bohužel je tato léčba provázena limitacemi, jako jsou závažné nežádoucí účinky a rezistence. S cílem zvýšit účinnost cisplatiny, je u řady nádorů používána kombinovaná terapie, při které se pro léčbu používají spolu s cisplatinou jiná protinádorová terapeutika, jako je například gemcitabin, taxol, etoposid nebo vitamin D a jeho analogy (Dasari, Tchounwou, 2014).

Za účelem eliminace vedlejších účinků a překlenutí rezistence následoval vývoj a testování řady derivátů odvozených od cisplatiny. Výsledkem bylo uvedení nových antineoplastik, jako je carboplatina a oxaliplatina, do klinické praxe. U těchto derivátů byly některé z vedlejších účinků eliminovány, avšak dále přetrvávající omezení plynoucí

z rezistence ať už primární (vrozené, vnitřní) nebo sekundární (získané, vnější) jsou základem pro vývoj další generace léčiv (Dasari, Tchounwou, 2014).

Cílem současného výzkumu je získání nových organokovových komplexů s obsahem přechodných kovů, které budou působit s vyšší selektivitou vůči maligním buňkám a současně umožní léčbu nádorů, které vykazují rezistenci. Za potenciální kandidáty nových chemoterapeutik jsou považovány deriváty s obsahem přechodných kovů osmia, iridia, ruthenia, rhodia a zlata (Ma *et al.*, 2019).

2 Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše týkající se protinádorového působení příbuzných organokovových komplexů
2. Osvojení si práce s buněčnými kulturami
3. Studium účinků testovaných látek na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie
4. Studium vlivu testovaných látek na aktivaci buněčné smrti
5. Analýza získaných výsledků
6. Sepsání bakalářské práce

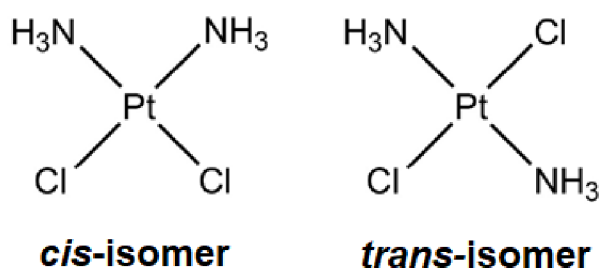
3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Cisplatina

3.1.1 Historie a struktura

Struktura *cis*-diamindichloroplatnatého komplexu byla popsána a komplex syntetizován M. Peyronem v roce 1844. Sloučenina byla známa pod názvem Peyronova sůl, později jako cisplatina. Antiproliferativní účinky byly objeveny při studiu působení elektrického pole na dělení buněk *Escherichia coli*. Při experimentu bylo použito platinových elektrod, které byly zavedeny do kultivační komory. Elektrolýzou vznikala řada produktů a jejich postupným testováním bylo identifikováno, která ze vznikajících sloučenin působí na bakteriální buňky antiproliferativně (Rosenberg *et al.*, 1965). Později byly popsány přímo protinádorové účinky v sérii experimentů, ve kterých bylo prokázáno, že *cis*-diamindichloroplatnatý komplex (dále jen cisplatina) blokuje proliferaci u buněčných linií L1210 (myší lymfocytární leukémie) a S180 (myší sarkom) a způsobuje regresi tumoru *in vivo* (Rosenberg *et al.*, 1969). V roce 1978 byla cisplatina schválena Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – U.S. Food and Drug Administration) jako protinádorová farmakoterapie a v dnešní době je používána pro léčbu řady solidních nádorů - především varlat, vaječníků a močového měchýře (Kelland, 2007).

Molekula cisplatiny je hydrofilní anorganický komplex sestávající z centrálního atomu platiny a dvou chloro- a dvou amino- ligandů. Může se vyskytovat ve formě isomerů *cis*- a *trans*- (obrázek1).



Obrázek 1: isomery cisplatiny

3.1.2 Transport cisplatiny do buňky

Transport léčiva do buňky probíhá pasivní difúzí a prostřednictvím transportních proteinů (Gately, Howell, 1993). Tato skutečnost napovídá tomu, že určitá míra selektivního působení je umožněna právě díky některým tkáňově specifickým přenašečům, které se

na příjmu cisplatinu podílejí a umožňují tak vyšší toxicitu pro některé z typů tkání (Ciarimboli, 2012).

Protinádorová platinová terapeutika jsou do buňky přijímána řadou transportérů, a to například rodinou přenašečů rozpustných složek - SLCs (solute carrier) proteinů (Burger *et al.*, 2011).

Do skupiny SLC22 patří uniportní transportéry přenášející především organické kationty - OCT (organic carrier transporter), které hrají roli v příjmu, distribuci i eliminaci léčiva. Tuto funkci zastávají především tři zástupci z této skupiny: OCT1, OCT2 a OCT3 (Koepsell *et al.*, 2007). K expresi OCT2, který se na transportu cisplatinu podílí nejvíce, dochází v proximálních tubulech ledvin a buňkách vlasových váčků, což jsou tkáně, na které působí cisplatin s nejvyšší mírou toxicity a vedlejších účinků. Proto jsou tyto transportéry spojovány se specifitou působení platinových chemoterapeutik (Burger *et al.*, 2011).

Dalším transportérem cisplatinu do buňky je protein CTR1 (high-affinity copper uptake transport protein), který je zástupcem skupiny SLC31, a za běžných podmínek je zodpovědný za příjem a distribuci měďnatých iontů (Holzer *et al.*, 2006).

Transportéry SLC a ABC (ATP-binding cassette) se naopak podílejí na detoxikaci kovů z buňky a mohou hrát roli v mechanismu rezistence vůči léčbě cisplatinou.

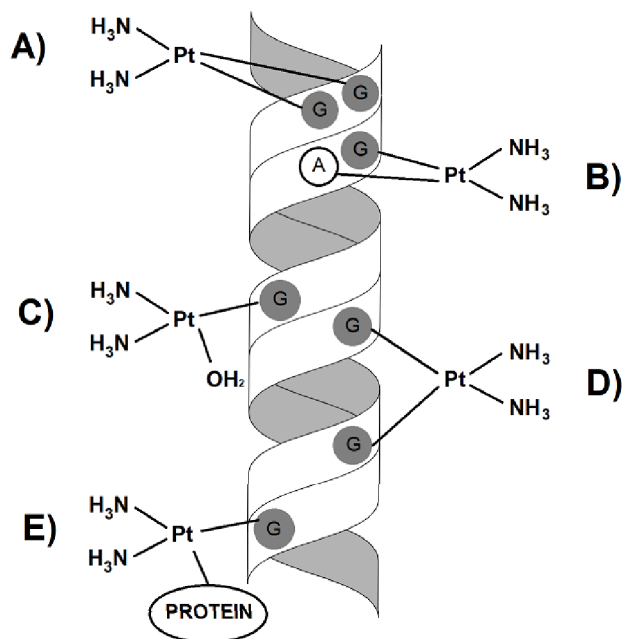
3.1.3 Aktivace cisplatinu a interakce s DNA

Po vstupu cisplatinu do buňky, dochází nejprve k aktivaci molekuly. Hydrolýzou vazeb mezi atomy chloru a centrálním atomem kovu vzniká elektrofil, u něhož jsou buď jeden, nebo oba atomy chloru nahrazeny hydroxidovými anionty (OH^-) nebo molekulami vody (H_2O) (Miller, House, 1989). Odštěpení chloro- ligandů je ovlivněno hodnotou pH a nízkou intracelulární koncentrací Cl^- , díky čemuž dochází k odštěpení chloridového ligandu až v buňce (Shermann, Lippard, 1987). Amino- ligandy zůstávají na centrálním atomu platiny navázány. Pozitivně nabitá molekula může následně interagovat nejen s DNA, ale také RNA a proteiny (Cohen, Lippard, 2001).

Aktivovaná molekula vytváří svou vazbou na DNA několik typů aduktů (Sherman, Lippard, 1987). Nejprve vzniká monofunkční adukt. Je vytvořena vazba mezi aktivovanou hydratovanou formou cisplatinu a imidazolovým jádrem purinových bází. Preferenčně dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi atomem platiny a N7 purinů – především guaninu a v menší míře adeninu. Následně vzniká bifunkční adukt a výsledkem je vznik nitrořetězcových můstků mezi dvěma guaniny 1,2-d(GpG), guaninem a adeninem 1,2-d(ApG) nebo 1,3-d(GpNpG). V menší míře vznikají meziřetězcové

můstky a monofunkční adukty, nebo adukty s vazbou na protein (Jamieson, Lippard, 1999) (Obr. 2).

Nitrořetězcové a meziřetězcové můstky způsobují řadu deformačních změn v nativní struktuře DNA, jako je rozvíjení (Bellon *et al.*, 2002) a ohýbání dvoušroubovice směrem k velkému žlábků (Rice *et al.*, 1988).



Obrázek 2: Hlavní adukty vytvořené vazbou cisplatiny k DNA. A) 1,2-d(GpG) nitrořetězcový adukt, B) 1,2-d(ApG) nitrořetězcový adukt, C) monofunkční adukt, D) 1,3-d(GpG) meziřetězcový adukt, E) protein-DNA můstek

Bylo potvrzeno, že diamindichlorplatnatý komplex interaguje s DNA již popsaným mechanismem a působí antiproliferativně. Tuto biologickou aktivitu vykazuje však v míře vhodné pro terapeutické použití pouze *cis*- forma (Rosenberg *et al.*, 1969). Antiproliferativní aktivita *trans*- isomeru je srovnatelná s *cis*- formou až při 10x vyšších koncentracích (Mansy *et al.*, 1973). Proces vzniku *trans*-isomeru je pomalý a tyto adukty jsou buňkou eliminovány efektivněji než adukty *cis*- isomeru (Shermann, Lippard 1987).

3.1.4 Rozpoznání změn DNA a opravné mechanismy

Rozpoznávání poškození DNA může být zprostředkováno čtyřmi různými mechanismy, mezi které patří nukleotidová excisní oprava (NER), bázová excisní oprava (BER), oprava dvouřetězcového zlomu a mismatch oprava (MMR). Při rozpoznávání cisplatinou vyvolaného poškození DNA je uplatňována nejvíce NER (Kelland, 2007). Při tomto mechanismu opravy je poškozené místo vystřiženo v podobě oligonukleotidu, dosyntetizováno polymerázou, a nový úsek připojen ligasou. Nejúčinněji jsou tímto

způsobem odstraňovány 1,3-adykty, a proto jsou hlavním zdrojem cytotoxicity především 1,2-adykty (Fuertes *et al.*, 2003). Tento typ aduktů je rozpoznáván chromatinovými nehistonovými HMG (High mobility group domain) proteiny, které jsou za běžných podmínek zodpovědné za organizaci chromatinu a podílejí se na řadě opravných mechanismů. Poškození cisplatinou je rozpoznáváno především HMGB1 (High mobility group box-1) (Reeves, 2005). Díky vazbě těchto proteinů je zabráněno rozpoznání 1,2-adyktů reparačními systémy. Dochází k inhibici NER a je tak umožněna kumulace poškození bez jejich včasných oprav (Pil, Lippard, 1992).

Poškození DNA je rozeznáváno řadou dalších proteinů, které se vážou na konkrétní místo a umožňují tak zahájení oprav (Donahue *et al.*, 1990; Kelland 2007). Mezi tyto poškození rozeznávající proteiny patří hMSH2 komponenta opravného mechanismu mismatch repair (MMR), lidská RNA polymeráza I, a řada transkripčních faktorů včetně TATA-vazebného proteinu.

Funkcí DNA-poškození rozpoznávajících proteinů je přenos signálu prostřednictvím signálních kaskád zahrnujících p53, p73 a MAPK (Mitogen activated protein kinase), čímž je zprostředkována následná buněčná odpověď (Tanida *et al.*, 2012).

3.1.5 Buněčná odpověď na účinky cisplatiny

Interakce cisplatiny s DNA vyvolává v buňce změny na úrovni transkripce, replikace a má vliv na aktivaci transdukčních drah vedoucích k zástavě buněčného cyklu, případně spuštění buněčné smrti, a to apoptosy nebo nekrosy (Cohen, Lippard, 2001). V buňkách dochází po expozici cisplatině ke vzniku dvouřetězcových zlomů a jedná se o první detekované změny u buněk podstupujících buněčnou smrt (Sorenson, Eastmann, 1988). Bylo dokázáno, že dochází ke štěpení DNA na pravidelné 180 bp dlouhé fragmenty, ke změnám na povrchu buněk a k jejich srašťování, což jsou hlavní morfologické změny provázející apoptosu (Cohen, Lippard, 2001).

3.1.5.1 Vliv na buněčný cyklus

Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že po krátkodobém působení cisplatiny dochází k zablokování buněčného cyklu v kontrolním bodě v G2 fázi, kde buňky setrvávají po dobu několika dnů a poté umírají (Sorenson *et al.*, 1990). Jelikož dochází k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi, zablokování cyklu a buněčná smrt nejsou následkem zpomalení DNA replikace, ke které dochází v S fázi (Sorenson, Eastman, 1988). Tyto informace jsou v souladu s dalšími experimenty, kterými bylo zjištěno, že k inhibici buněčného růstu je třeba nižších koncentrací cisplatiny než k inhibici replikace

DNA a že koncentrace cisplatiny má sice vliv na rychlost syntézy DNA, která je na působení cisplatiny velmi citlivá, nicméně nekoreluje s mírou toxicity (Cohen, Lippard, 2001).

Dále je tato hypotéza podpořena také skutečností, že buňky jsou při nízkých koncentracích schopny překonat zpomalení syntézy DNA, následkem čehož dochází k přechodnému zastavení v S fázi a poté k zastavení buněčného cyklu v G2 fázi (Sorenson *et al.*, 1990). Zde mohou buňky setrvat a následně podstoupit buněčnou smrt v přechodu G2/M, nebo přejít do M fáze. K obnovení syntézy DNA pak dochází po 3-5 dnech a buňka může absolvovat další buněčný cyklus. Zastavení v G2 fázi je s největší pravděpodobností způsobeno sníženou produkcí mRNA transkriptů nezbytných pro syntézu proteinů potřebných pro vstup do M fáze u ovlivněných buněk (Sorenson *et al.*, 1990).

Bylo zjištěno, že v buňkách, které jsou odsouzeny k buněčné smrti, dochází nejprve k inhibici transkripce a translace, následně k poklesu množství nikotinamidadenin dinukleotidu (NAD) a adenosin trifosfátu (ATP) a nakonec a ke ztrátě integrity buněčné membrány (Tanida *et al.*, 2012).

Jak již bylo zmíněno, DNA poškození-rozpoznávající proteiny hrají roli v přenosu signálu poškození DNA na signalizační kaskády zahrnující p53, p73 a ERK, JNK a p38 MAPK (Cepeda *et al.*, 2007).

3.1.5.2 p53

Protein p53 je nukleární fosfoprotein, který má funkci transkripčního faktoru regulujícího průběh buněčného cyklu, opravy DNA, programované buněčné smrti a je hlavním mediátorem odpovědi na genotoxické faktory (Brabec, Kašpárková, 2005). V buňkách je udržována nízká hladina tohoto proteinu prostřednictvím jeho negativního modulátoru – MDM2 (mouse double minute 2). Tento protein má funkci E3 ligasy, ubiquitínuje p53 a zprostředkovává jeho proteasomální degradaci (Honda *et al.*, 1997). Následkem poškození DNA cisplatinou dochází k fosforylaci a stabilizaci proteinu p53, který dále transaktivuje další geny ovlivňující průběh opravy DNA před replikací, proces buněčného dělení, zastavení buněčného cyklu a vyvolání apoptosy (Lambert, Sørensen, 2018). Fosforylace p53 je zprostředkována dvěma odlišnými kinázovými kaskádami ATM (Ataxia telangiectasia-mutated protein)-CHK2 (Checkpoint kinase 2) a ATR (ATM and Rad3-related protein)-CHK1 (Checkpoint kinase 1), jejichž aktivace je způsobena především dvouřetězcovými zlomy DNA (Efeyan, Serrano, 2014; Marechal, Zou, 2013).

Interakce mezi p53 a poškození-rozpoznávajícím HMGB1 může být základem p53-závislého spouštění apoptosy, jelikož v takovém případě nemůže p53 aktivovat opravu DNA (Cepeda *et al.*, 2007).

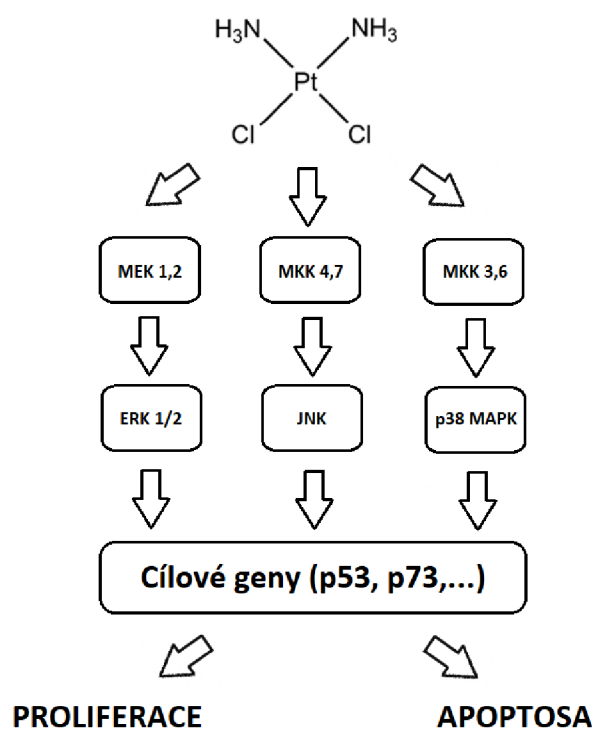
3.1.5.3 MAPK/JNK/ERK/p38

Jako další je s cytotoxicitou cisplatiny spojena MAPK (mitogen activated protein kinase) kaskáda zahrnující aktivaci ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2), JNK (c-Jun N-terminal kinase) a p38, z nichž je nejvýznamnější aktivace ERK 1/2 (Tanida *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že inhibice MEK-ERK dráhy způsobuje u buněk rezistenci, která je specifická pro působení cisplatiny (Yeh *et al.*, 2002). Na druhou stranu však bylo navrženo, že aktivace JNK a ERK působením cisplatiny může být částečně spojena se zastavením buněčného cyklu prostřednictvím p53, čímž vzniká prostor pro opravu poškozené DNA a vzniká tak určitý typ ochrany před toxicitou cisplatiny (Persons *et al.*, 1999).

Aktivace JNK a p38 MAPK umožňuje fosforylaci transkripčních faktorů c-Jun a ATF-2 (Activating transcription factor 2), které se vážou na promotory řady genů, což vede, mimo jiné, k expresi proapoptického FasL genu, čímž je následně indukována apoptosa (Tanida *et al.*, 2011).

3.1.5.4 p73

Na mechanismu indukce apoptosy se podílí také na p53 závislý p73 protein, k jehož kumulaci dochází v buňkách vystavených cisplatině (Gong *et al.*, 1999; Tanida *et al.*, 2011). Jeho aktivace je závislá na MMR proteinech MLH1 (MutL homolog 1) a od aktivace p53 se liší tím, že v této cestě není zahrnuta aktivace ATR. Cesta mezi rozpoznáním poškozené DNA v jádře a p73 je zprostředkována onkogenní tyrosinkinásou c-Abl (Tyrosine-protein kinase ABL1), která je regulována proteiny MMR. Obě z možností aktivace apoptotických drah – p53 i p73, vedou k uvolňování cytochromu C z mitochondriálních membrán zprostředkované proapoptotickými proteiny Bax (Bcl-2 associated X protein) a Bak (Bcl-2 homolous antagonist killer) s následnou aktivací kaspasy 9.



Obrázek 3: Význam a cíle MAPK drah v transdukcí signálu cisplatinového poškození DNA. Převzato a upraveno z Cepeda et al., 2007

3.1.6 Rezistence

Rezistence může být vnitřní (vrozená) nebo vnější (získaná), která vzniká v důsledku léčby (Kelland, 2007). Protinádorová léčba cisplatinou je primárně velmi účinná, avšak při recidivě onemocnění je častý výskyt rezistence vůči tomuto léčivu (Dasari, Tchounwou, 2014). U nádorů vaječníků dojde až u 70% pacientů podstupujících chemoterapii cisplatinou k prvotní regresi. Tento účinek není trvalý a období následujících 5 let přežívá pouze přibližně čtvrtina pacientů.

Jak již bylo uvedeno, cytotoxické vlastnosti cisplatinového komplexu jsou zprostředkovány kovalentní vazbou k DNA za vzniku Pt-DNA aduktů, které interferují s DNA replikací a transkripcí. Rezistence, která je primárně podmíněna nedostatečnou kumulací aduktů v buňce, může mít několik různých příčin (Lambert, Sørensen, 2018).

Hlavním mechanismem zodpovědným za rezistenci buněk k léčbě cisplatinou je oprava platinované DNA, a to především prostřednictvím NER (viz kapitola 3.1.4 Rozpoznání změn DNA a oprava). Poškození DNA rozpoznávající proteiny XP (xeroderma pigmentosum complementation group) jsou součástí systému NER. Protein XPF vytváří heterodimer s endonukleázovým proteinem ERCC1 (Excision repair cross complementing-1), který je také součástí systému NER a k aktivaci systému dochází v případě poškození DNA cisplatinou. Poté komplex vytváří incize v DNA (Kelland,

2007). Nadměrná exprese XPF proteinu vede ke zvýšení rezistence k cisplatině a naopak snížení jeho exprese (případně umlčení pomocí antisense RNA, má za následek zvýšení citlivosti (Brabec, Kašpárková, 2005). V klinické studii ovariálního karcinomu rezistentního k cisplatinové terapii bylo zjištěno, že jsou u pacientů významně zvýšené také hladiny mRNA ERCC1 (Dabholkar *et al.*, 1994). Při vyřazení ERCC1 prostřednictvím malých interferujících RNA (siRNA) dochází k utlumení NER a tím i ke zvýšení citlivosti nejen k cisplatině, ale také oxaliplatině a carboplatině. Z tohoto důvodu se jedná o velmi atraktivní cíl výzkumu (Chang *et al.*, 2005).

Snížená kumulace aduktů v buňce je také spojena s inaktivací léčiva po vstupu do buňky, a to především přímou vazbou na proteiny a glutathion (GSH) následným odstraněním z buňky přes ATP-dependentní glutathion-S-konjugát exportní pumpu (Eastman, 1987).

Dále může být omezeno hromadění aduktů v buňce sníženým příjmem léčiva či nadměrnou detoxifikací. Častěji se však jedná právě o nedostatečný příjem způsobený sníženou expresí transportních proteinů (Kelland, 2007). Tento způsob rezistence byl zkoumán v experimentu s buňkami, které nesly WT CTR1 transportér a byly schopny akumulovat přibližně 35 % aplikované cisplatinu (Holzer *et al.*, 2006). Buňky s odstraněnými oběma alelami genu pro CTR1 protein byly schopny akumulovat pouze 5-7 % cisplatinu a byly zhruba třikrát méně citlivé. Bylo dokázáno, že po expozici cisplatině dochází u lidských karcinomů vaječníku ke zpomalení exprese CTR1 a k redukci počtu těchto transportérů. Transporter CTR1 je zodpovědný za časné vychytávání cisplatinu.

Na základě těchto poznatků bylo zjištěno, že je možné zvýšit citlivost nádoru k léčbě prevencí jeho přirozené degradace (Al-Eisawi *et al.*, 2011). Kombinovanou aplikací cisplatinu s inhibitorem proteasomu bortezomibem došlo k 30násobnému zvýšení účinnosti proti linii A2780 a 180násobnému zvýšení účinnosti proti linii A2780 *cis*.

I přes to, že je rezistence k cisplatině z větší části způsobena sníženým příjmem léčiva do buňky, částečně se na ní podílí také nadměrná exprese efluxních proteinů, jako jsou měď-transportující ATPasy typu P, přenašeče skupiny ABC (MDR1 – multidrug resistance protein, MRP2 – multidrug resistance-associated protein) a skupina SLC47, do které jsou řazeny proteiny MATE (multidrug and toxin extrusion) (Burger *et al.*, 2011). Zde je nutno zmínit dva lidské proteiny spadající do této rodiny, a to SLC47A1 (MATE1) a hSLC47A2 (hMATE2-K). Tyto transportéry jsou převážně exprimovány v renálních tubulech a v hepatocytech, kde je jejich hlavní funkce detoxikace zprostředkovaná transportem organických kationtů přes membrány (Nies *et al.* 2016).

Mimo tyto mechanismy může být příčina rezistence k léčivu nadměrná sekvestrace cisplatinu do intracelulárních vesikul, které jsou následně exocytosou odstraňovány z buňky (Lambert, Sorenson 2018).

3.1.7 Nežádoucí účinky

Terapie cisplatinovými chemoterapeutiky je limitována řadou závažných vedlejších účinků, které jsou způsobeny nízkou selektivitou těchto léčiv (Oun *et al.*, 2018). Mezi tyto vedlejší účinky patří nefrotoxicita, ototoxicita, neurotoxicita, myelosuprese a zažívací obtíže způsobené gastrointestinální toxicitou (Moon, 2011). Porozumění mechanismům působení léčiv vedoucích k vedlejším účinkům může v budoucnu umožnit zavedení postupů eliminujících tyto účinky již v průběhu léčby, případně dát základ novým derivátům (Kanat *et al.*, 2017).

3.1.7.1 Nefrotoxicita

Nefrotoxicita je nejzávažnějším vedlejším účinkem. Terapeutická účinnost závisí na dávce, která je volena na základě typu, pokročilosti nádoru a odvíjí se také od obsahu povrchu pacientova těla. Zároveň je však současně limitována právě rostoucí nefrotoxicitou a případnými komorbiditami u pacientů (Oun *et al.*, 2018).

Přechodné poškození ledvin se po 1 týdnu pravidelné terapie objevuje u 25 % pacientů, přičemž k trvalému selhání ledvin s následnou nutností dialýzy dochází na základě výše dávky a opakování cyklů léčby (Moon, 2011).

Histopatologické studie ukázaly, že primárně dochází k poškození proximálního a distálního tubulu, Henleovy kličky i Bowmanova váčku (Tanaka *et al.*, 1986).

Existuje řada postupů pro eliminaci následků nefrotoxicity (Oun *et al.*, 2018). Mezi hlavní a nejčastější metody patří hyperhydratace fyziologickým roztokem. Ta je prováděna před zahájením léčby, v jejím průběhu i po ukončení. Bohužel i přes drastickou hyperhydrataci a podávání diuretik (mannitol, furosemid) není možné potlačit nefrotoxicité působení cisplatinu kompletně.

3.1.7.2 Ototoxicita

Dalším závažným vedlejším účinkem léčby terapeutiky s platinovým základem je ototoxicita (Oun *et al.*, 2018). Dochází k oboustranné ztrátě sluchu, a to nejprve ke ztrátě sluchu vyšších frekvencí. Dále je poškozen vestibulární aparát, vzniká tinnitus a otalgie. Ztráta sluchu je trvalá, tinnitus obvykle mizí po ukončení léčby. Míra ototoxicity je závislá na věku pacienta při první dávce a později roste s kumulativní dávkou.

Cílem působení cisplatiny je hlemýžď ve vnitřním uchu, což je komplexní orgán složený z několika typů buněk. Míra toxicity cisplatiny se u jednotlivých typů liší (Callejo *et al.*, 2015). Nejvíce jsou postiženy apoptotickou degenerací vlasové buňky Cortiho orgánu. Byly však také zjištěny léze a změny v jiných strukturách, včetně dehiscence myelinových obalů neuronů a lýzy buněk ve stria vascularis.

3.1.7.3 Neurotoxicita

Cisplatinou poškozuje také nervovou soustavu a způsobuje periferní senzickou neuropatii, která je závislá na dávce (Kanat *et al.*, 2017).

Projevuje se nejčastěji parestezií – necitlivostí a brněním v končetinách a v periorální oblasti, dysestézií – bolestivé symptomy parestazie a svalovou slabostí. Tyto účinky mohou být akutní nebo chronické s přetrváním až několik let po ukončení léčby. S vystavením pacienta chladu se mohou tyto příznaky zhoršovat (Oun *et al.*, 2018).

Neuropatie je způsobena apoptózou neuronů, ve kterých dochází ke kumulaci cisplatinových aduktů. Prostupnost léčiva do periferních neuronů je umožněna nepřítomností hematoencefalické bariéry, která se nachází v centrální nervové soustavě a zde brání vstupu cisplatinou (Kanat *et al.*, 2017).

Neurotoxicita je typickým nežádoucím účinkem pro léčbu oxaliplatinou a s největší pravděpodobností souvisí s inhibicí syntézy rRNA (Oun *et al.*, 2018)

3.2 Platinové deriváty

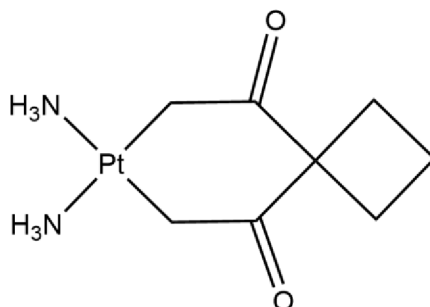
Pro vývoj přímých cisplatinových derivátů byly důvodem závažné vedlejší účinky, rezistence k léčbě a omezené spektrum typů nádorů s možností cisplatinové chemoterapie.

3.2.1 Karboplatina

Chemicky se jedná o *cis*-diamin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platnatý komplex (Obr.4). Bylo zjištěno, že toxicita léčiva je úměrná reaktivitě, resp. lability skupin, které jsou vázány na centrální atom a jsou při aktivaci léčiva nahrazeny vodou. Na základě této hypotézy byl cíleně vytvořen nový derivát - karboplatina (Wheate *et al.*, 2010).

Karboplatina vytváří adukty stejným mechanismem jako cisplatinou, ale je díky obsahu cyklobutandikarboxylového ligandu místo chloridových atomů stabilnější a nefrotoxicita je značně snížena. Na druhou stranu je léčba karboplatinou limitována myelosupresí, a to především trombocytopenií (Kelland, 2007). Nižší reaktivita této sloučeniny vede k nutnosti vyšších dávek k dosažení protinádorových účinků srovnatelných s cisplatinou (van der Vijgh, 1991).

Z důvodů velmi podobného mechanismu působení cisplatinu a karboplatinu, je možné použít karboplatinu k léčbě velmi podobného spektra nádorů jako původní cisplatinu (Wheate *et al.*, 2010). Mechanismus tvorby a typu aduktů vytvářených oběma léčivy je také příčinou, proč karboplatina nepůsobí antiproliferativně na cisplatinu-rezistentní buňky. Tento derivát poskytuje výhodu v léčbě pouze snížením vedlejších účinků (Weiss, Christian, 1993).



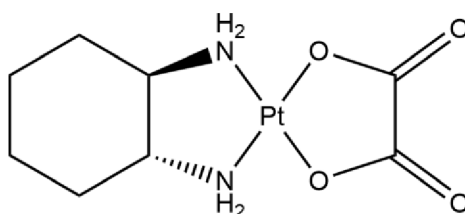
Obrázek 4: Chemická struktura karboplatinu

3.2.2 Oxaliplatina

Oxaliplatina je (1R,2R-diaminocyclohexane)oxalatoplatinový komplex (Obr. 5). Tento derivát umožnil jako první překonání rezistence k cisplatině a rozšíření spektra léčby o další typy nádorů. Oxaliplatina působí antiproliferativně na nádorové buňky leukemie, tlustého střeva a konečníku, vaječníků, prsou, melanomu, močového měchýře a dalších (Raymond *et al.*, 1998).

Tento derivát byl navržen tak, aby obsahoval odlišné nosné ligandy a při aktivaci hydrolyzou vznikal odlišný typ aduktů, než při hydrolyze cisplatinu a karboplatinu (Štarha, Trávníček, 2018). Ve vznikajících nitrořetězcových GpG aduktech míří nosné ligandy oxaliplatinu do velkého žlábků DNA a brání tak vazbě proteinů opravných mechanismů. Dále způsobují větší změny v DNA (rozvolňování a ohýbání) než cisplatinu (Kašpárková *et al.*, 2008).

Vedlejším účinkem, který provází léčbu oxaliplatinou je periferní neuropatie (viz kapitola 4.7 Nežádoucí účinky), jejíž míra je závislá na dávce (Raymond *et al.*, 1998).



Obrázek 5: Chemická struktura oxaliplatinu

4 Neplatinové organokovové deriváty

Po uvedení cisplatinu do klinické praxe a popsání mechanismů jejího působení následoval vývoj analogů za cílem redukovat vedlejší účinky původních sloučenin. Tato snaha vedla k zařazení dvou platinových analogů do klinického použití, a to karboplatiny a oxaliplatinu. Oba tyto deriváty však stále způsobují vážné nežádoucí účinky a navíc pouze oxaliplatin umožňuje léčbu nádorů vykazujících rezistenci k cisplatině. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny deriváty s jiným než platinovým základem, tzn. jiným centrálním atomem. Obecně se jedná o tzv. proléčiva, která musí, stejně jako cisplatin, podstoupit nejdříve ligandovou výměnu, nebo redoxní reakci, aby získala aktivní formu (Ballesta *et al.*, 2019).

Oproti organickým sloučeninám jsou komplexní sloučeniny strukturně více rozmanité (Ma *et al.*, 2019). Na základě schopnosti vytvářet různé typy koordinační geometrie a variability v rámci vazeb, včetně trojrozměrných konfigurací a typů ligandů, je možné kovový komplex optimalizovat a modifikovat tak, aby byla sloučenina cílená na konkrétní biomolekuly.

Komplexní sloučeniny obsahující centrální atom přechodného 5d kovu vykazují slibné vlastnosti pro budoucí použití v protinádorové léčbě, a to i v případech, kdy konvenční terapeutické cesty nejsou účinné, případně jejich použití znemožňuje rezistence (Ma *et al.*, 2019). V posledních letech se předmětem výzkumu staly především komplexy s rutheniem, osmiem a iridiem. Léčebný potenciál těmto látkám poskytují vlastnosti, jako jsou vysoká prostupnost do buněk, stabilita vně a uvnitř buňky a jejich biologická aktivita.

Polosendvičové analogy, na které je v posledních letech zaměřena pozornost, se liší v malých strukturních změnách. Bylo prokázáno, že tyto komplexy vykazují vyšší účinnost než konvenčně používaná cisplatin (Hearn *et al.*, 2015).

4.1.1 Ruthenium jako centrální atom

Komplexy s centrálním atomem ruthenia jsou doposud považovány za nejslibnější alternativu platnatých chemoterapeutik (Hartinger *et al.*, 2008). V posledních 30 letech byla podrobně studována jejich antiproliferativní aktivita, kterou vyazuje většina testovaných sloučenin, a to se slabou vedlejší toxicitou (Kostova, 2006).

Komplexy s rutheniem vykazují podobnou kinetiku výměny ligandů jako cisplatin (Süss-Fink, 2009; Allardyce, Dyson, 2016). K této výměně dochází ve vodném prostředí a pravděpodobně se jedná o hlavní faktor protinádorové aktivity. Některé chemické a fyzikální vlastnosti atomu ruthenia jsou podobné atomu železa, díky čemuž může

ruthenium vystupovat jako atom železa ve vazbě na plazmatické proteiny. Ruthenium může být díky tomu vázáno na transferrin, který je buňkou přijímán prostřednictvím transferrinových receptorů. Tyto receptory jsou u nádorových buněk nadměrně exprimovány z důvodů vyšších nároků na příjem železa. S touto vlastností také nejspíše souvisí selektivní toxicita těchto komplexních sloučenin vůči nádorovým buňkám.

Komplexy Ru(III) jsou v tomto oxidačním stavu centrálního atomu v neaktivní formě a pro aktivitu *in vivo* musí být aktivovány redukcí na oxidační stav Ru(II) (Mokesch *et al.*, 2019). Tato vlastnost také umožňuje jejich selektivní působení, protože pro úspěšnou redukční reakci se musí sloučenina vyskytovat ve vhodném prostředí s dostatečně nízkým pH a nízkým obsahem kyslíku. Takové vlastnosti jsou typické pro vnitřní prostředí nádorových buněk. Schopnost redukovat se je však také značně ovlivněna ligandy. Například lipofilita určená povahou ligandů je spojena se schopností akumulace látky v buňce, a to tak, že s rostoucí lipofilitou komplexu roste také míra akumulace. Jak již bylo zmíněno, vlivem nízkého pH, které je typické pro nádorové buňky, dochází k protonaci sloučenin, čímž se stávají reaktivními a mohou poté interagovat s cílovými molekulami.

Řada těchto sloučenin vstoupila do klinických testování. Mezi nejprostudovanější patří Ru(III) komplexy, a to NAMI-A („New Anti-tumour Metastasis Inhibitor“) a KP1019 (Kostova, 2006).

4.1.1.1 NAMI-A a KP1019

NAMI-A (Obr.6 vlevo) a KP1019 (Obr.6 vpravo) jsou dvě strukturně příbuzné komplexní Ru(III) sloučeniny, které jsou zkoumány z hlediska jejich potenciálního medicínského využití pro protinádorovou léčbu (Alessio, Messori, 2019). U těchto dvou derivátů je zajímavé to, že ani jeden z nich nebyl podroben tradičnímu předběžnému screeningu *in vitro*, ale byly přímo testovány na zvířecích modelech.

I přes příbuznost a strukturní podobnost se farmakologické vlastnosti obou komplexů velmi liší (Alessio, Messori, 2019). Komplex Ru(III) NAMI-A s imidazolovým cyklem ve struktuře vykazuje selektivní aktivitu proti solidním metastázujícím nádorům, a to i cisplatina-rezistentním typům. Jeho cytotoxicita vůči primárním nádorům je nízká. Sloučenina KP1019 Ru(III) obsahující indazol a její ve vodě rozpustný derivát KP1339 působí cytotoxicky především na kolorektální karcinomy, které jsou rezistentní vůči platinovým chemoterapeutikům.

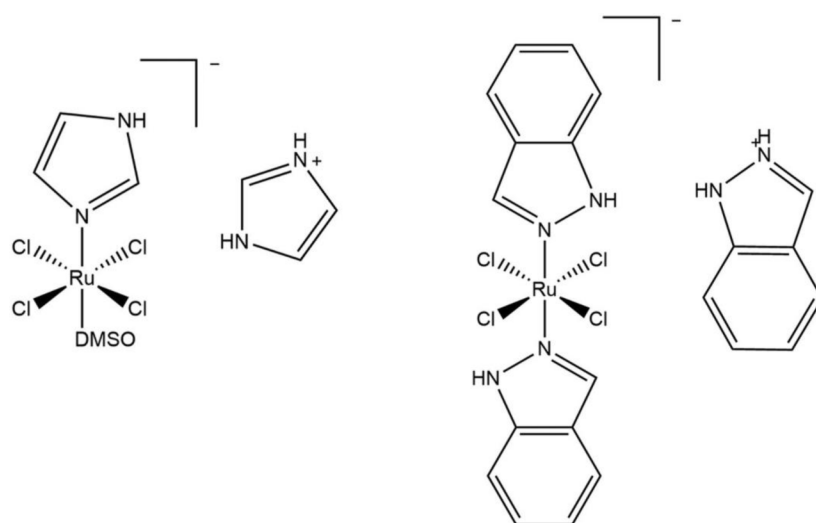
Obě tyto látky jsou schopny se vázat na DNA a modifikovat ji, nicméně mechanismus účinků Ru(II) komplexů je odlišný od mechanismu působení cisplatin (Alessio, Messori, 2019). Sloučenina NAMI-A se díky své kinetické reaktivitě váže na DNA *in vitro* rychleji než KP1019 a cisplatina a vytváří nitrořetězcové bifunkční adukty

s preferenční vazbou na guanin, stejně jako platinová léčiva. Přestože Ru(III) komplexy mají schopnost vytvářet konformační změny DNA, tyto změny jsou podstatně menší než v případech působení platinových léčiv.

Intracelulární působení NAMI-A při vysokých koncentracích (>100 μM) zahrnuje již zmíněnou vazbu na DNA, RNA, zablokování progresu buněčného cyklu v G2/M a inhibici matrixových metaloproteináz MMP-2 a MMP-9, které za fyziologických podmínek působí proti extracelulární matrix (Alessio, 2017). Při nižších koncentracích NAMI-A (1-10 μM) nedochází k prostupování látky do buněk a dochází k zablokování klíčových aspektů angiogeneze a migrace buněk, což jsou základní mechanismy vzniku metastáz.

Selektivní antimetastatické působení sloučeniny NAMI-A je umožněno vazbou na kolagen plicní extracelulární matrix a na kolagen typu IV bazální membrány ledvinových glomerulů (Vacca *et al.*, 2002). V místě působení dochází ke stimulaci růstu vaziva, vzniká pevné pouzdro nádorové masy a je tak znesnadněna vaskularizace nádoru. Tento komplex působí antimetastaticky nejen přímo na nádorové buňky, ale také preventivně.

Látka NAMI-A byla podrobena klinickému testování u pacientů se solidními nádory (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004). Sloučenina byla v rámci klinických testů použita v podobě monoterapie nebo kombinované terapie, např. s gemcitabinem (Rausch *et al.*, 2019). Bohužel, klinické studie této sloučeniny nedospěly do III. fáze. Byly ukončeny z důvodů nízké efektivity, toxicity a nežádoucích účinků, jako jsou nevolnosti, zvracení, průjem, přechodná nefrotoxicita, akumulace NAMI-A ve tkáních bohatých na kolagen a bolestivá tvorba puchýřů, která se stala limitující pro dávku. Účinek NAMI-A se zdá být nezávislý na typu primárního nádoru a stádiu vývoje metastázy.



Obrázek 6: Struktura komplexu NAMI-A (vlevo) a KP1019 (vpravo), převzato a upraveno (Nabiyeva *et al.*, 2020)

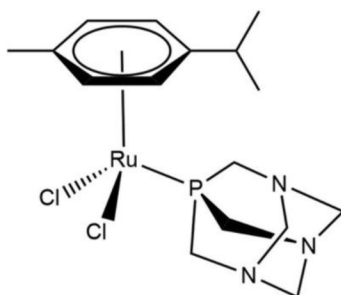
4.1.1.2 RAPTA-C

Označení RAPTA-C je odvozeno od chemické struktury, obecně $[\text{Ru}(\text{aren})\text{Cl}_2\text{PTA}]$ (Obr. 7), která obsahuje mimo centrální atom Ru(II) také stabilizující aren, amfifilní fosforadamantanový (PTA) ligand, a dva labilní chloridové ligandy (Rausch *et al.*, 2019).

Jedná se o látku vykazující nižší toxicitu než cisplatina. Působí antiproliferativně, antimetastaticky a antiangiogenně také na cisplatina-rezistentní buňky (Nabiyeva *et al.*, 2020).

Příjem RAPTA-C do buňky probíhá, podobně jako příjem NAMI-A a KP1019. Dochází k němu prostřednictvím transferrinových receptorů, které jsou nadměrně exprimovány nádorovými buňkami, což je pravděpodobně důvod, proč nenádorové buňky na ovlivnění látkou RAPTA-C nijak výrazně neodpovídají (Daniels *et al.*, 2012). Cílem působení *ex vivo* je DNA, ale *in vitro* dochází k vazbě především na histonové proteiny, čímž dochází k deformaci DNA a jejímu poškození (Rausch *et al.*, 2019).

Bylo zjištěno, že RAPTA-C indukuje apoptózu poškozením mitochondrií a aktivací p53/JNK dráhy (Chatterjee *et al.*, 2008). Dochází k zastavení buněčného cyklu v G2/M, což je spojeno se zvýšenou hladinou p21 a sníženou hladinou cyklinu E. Dále byla zjištěna snížená hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a zvýšená hladina proapoptotického Bax proteinu, což vypovídá o přesunutí rovnováhy mezi anti- a proapoptotickými proteiny směrem k apoptose. Dochází k uvolnění cytochromu C z mitochondriální membrány a prokaspasy 9 je štěpena na aktivní formu iniciační kaspasy 9.



Obrázek 7: Struktura komplexu RAPTA-C, převzato a upraveno (Nabiyeva *et al.*, 2020)

V kombinaci s dalšími chemoterapeutiky se jedná o vhodného kandidáta pro klinická testování. Spolu s použitím inhibitorů tyrosinkinasy (např. erlotinib) dochází ke zvýšení příjmu látky do buňky. Při použití této kombinace bylo zjištěno, že dochází k inhibici růstu A2780 i A2780*cis in vitro* a také byla pozorována protinádorová účinnost *in vivo* na modelu xenograftů A2780 u myši (Berndsen *et al.*, 2017).

4.1.2 Osmium jako centrální atom

Osmium je přechodný kov patřící do triády těžkých platinových kovů spolu s iridiem a platinou, proto můžeme u komplexů tohoto kovu očekávat cisplatině podobnou biologickou aktivitu a chemické vlastnosti (Nabiyeva *et al.*, 2020). Sloučeniny s obsahem osmia však byly prostudovány poměrně nedávno. Chemické vlastnosti poskytující léčebný potenciál těmto sloučeninám jsou zejména pomalá kinetika výměny ligandů a více možností oxidačních stavů. U řady struktur odvozených od analogů komplexů s obsahem ruthenia byla zjištěna podobná antiproliferativní aktivita, jako u původních sloučenin.

Mechanismus účinku je podmíněn chemickou strukturou sloučeniny a oxidačním stavem centrálního atomu. Vlastností trojrozměrných struktur s šesti ligandy a s centrálním atomem osmia je schopnost účastnit se bohaté škály specifických interakcí s biomolekulami, které vedou k indukci apoptosy (Zhang, Huang, 2018). Komplexy s obsahem osmia a arenového ligandu mohou opět interferovat s redoxními mechanismy v buňce a zvyšovat tak produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Romero-Canelón *et al.*, 2015). Tato vlastnost umožňuje selektivní působení, jelikož mitochondrie nádorových buněk mají často omezenou nebo poškozenou funkci a neumožňují tak kontrolovanou regulaci hladin ROS, které působení organokovových komplexů zvyšuje.

Některé polosendvičové komplexy s obsahem osmia vykazují také vlastnosti vhodné pro použití jako fotosenzitivní látky a po bližším prozkoumání by mohly být v budoucnu používány právě pro protinádorovou fotodynamickou léčbu (Zhang, Huang, 2018).

4.1.2.1 Os(II)

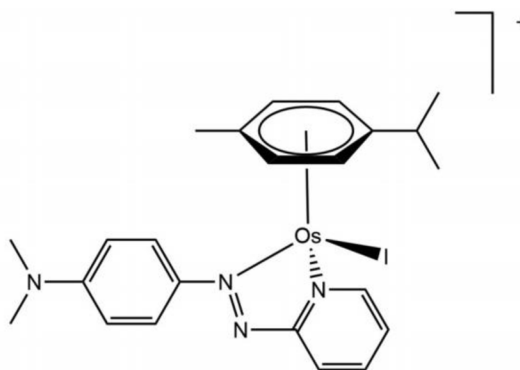
V mechanismu působení komplexů Os(II) je opět rozhodující chemická stabilita, která definuje reaktivitu komplexu. Bylo dokázáno, že u polosendvičových Os(II), jejichž struktura obsahuje aren (např. *p*-kumen, bifenyl), je možno změnou ligandů dosáhnout cytotoxicity srovnatelné s karboplatinou (Peacock *et al.*, 2007).

Publikovaný komplex FY26 Os(II) (Obr.8) je poměrně nereaktivní sloučenina, která po vstupu do buňky podléhá aktivaci. K té však nedochází prostřednictvím hydrolyzy, jak tomu je např. u platnatých chemoterapeutik, ale uvolněním iodidového ligandu, které je způsobeno atakem intracelulárního GSH (Zhang *et al.*, 2020).

Tato sloučenina působí s vysokou antiproliferativní aktivitou. Na cisplatinu-rezistentní buňky působí tato látka až s 49x vyšší účinností než cisplatinu (Ballesta *et al.*, 2019). Komplex indukuje produkci ROS, a to především superoxidů. Tato vlastnost je využita pro selektivní cytotoxicitu, jelikož nedostatečně funkční mitochondrie

nádorových buněk nejsou schopny kompenzovat hladiny reaktivních forem kyslíku. Bylo zjištěno, že tato sloučenina způsobuje narušení mitochondriální membrány a také se podílí na regulaci genové exprese, a to konkrétně v jádře kódovaných mitochondriálních genů (např. MAOA – monoaminoxidasa, UCP2 - mitochondriální rozpojovací protein 2), což má za následek zvýšenou produkci ROS.

V kombinaci s dalšími redoxními modulátory dochází ke zvýšení selektivního působení FY26 vůči buňkám lidského ovariálního karcinomu (Romero-Canelón *et al.*, 2015).



Obrázek 8: Struktura komplexu FY26, převzato a upraveno (Nabiyeva *et al.*, 2020)

Jako strategií do budoucna je možno využít výměnu halogenidového ligandu u polosendvičových komplexů za disociovatelný biologicky aktivní ligand, např. inhibitor histon-deacetylasy, nebo glutathion-S-transferasy čímž může být zvýšena efektivita a selektivita léčby (Štarha *et al.*, 2018). Bylo dokázáno, že přítomností inhibitoru histon-deacetylázy ve struktuře polosendvičových komplexů s obsahem osmia skutečně dochází ke zvýšení cytotoxicity a selektivity vůči buňkám lidského ovariálního karcinomu (A2780) oproti hepatocytům.

Řada komplexů s obsahem osmia byla syntetizována na základě známých Ru komplexů a některé Os(II) analogy Ru(II) komplexů působí u řady nádorů cytotoxicky již v nanomolárních koncentracích, a to s vyšší účinností než příbuzné Ru(II) sloučeniny (Fu *et al.*, 2010). Nižší toxicita byla potvrzena na základě testů na modelech xenograftů nádorů tlustého střeva. Jedná se tedy o vhodné kandidáty pro další výzkum.

4.1.2.2 Os(III)

Do skupiny Os(III) komplexů s antiproliferativní aktivitou patří především analogy popsanych rutheniových komplexů a to již zmíněných sloučenin Ru(III) NAMI-A a KP1019 (Hanif *et al.*, 2014). Osmiové analogy jsou inertnější než rutheniové, což samozřejmě souvisí také s odlišnými biologickými vlastnostmi. Je popsáno, že NAMI-A

je rychle hydrolyzující sloučenina. Proto je poměrně překvapivé, že cytotoxicita jejích Os(III) analogů je vyšší. Z toho můžeme usuzovat, že hydrolyza těchto sloučenin není hlavním faktorem pro cytotoxicitu. Účinnost Os(III) a Os(IV) analogů KP1019 je podobná účinnosti původní sloučeniny. Bylo však zjištěno, že rozpustné sodné soli těchto analogů jsou účinnější, tudíž je pravděpodobné, že aktivita souvisí spíše s buněčným příjmem těchto sloučenin.

4.1.2.3 Os (VI)

Bylo zjištěno, že i drobné modifikace ligandů mění zásadně mechanismus účinku u některých typů Os(VI) komplexů (Johnstone *et al.*, 2015; Suntharalingam *et al.*, 2013). Výměnou těchto ligandů může být dosaženo biologické aktivity s cílením na DNA. Působením takových komplexů dochází poškození DNA, je aktivován p53, zablokován buněčný cyklus v G2/M a následně je indukována kaspasami řízená apoptosa. Jiné komplexy s obsahem jiného typu ligandu mohou naopak způsobit v buňkách stres endoplazmatického retikula, což vede k indukci p53-nezávislé apoptosy. Bylo také zjištěno, že některé z komplexů indukují fosforylaci histonového proteinu H2AX (H2A histone family member X) jako součást buněčné odpovědi na dvouřetězcové zlomy. Dále dochází k fosforylaci CHK1, CHK2 a p53, což vypovídá o poškození DNA. Aktivace p53 a fosforylace CHK1 zastaví buněčný cyklus v G2/M.

Dále bylo také potvrzeno, že účinky řady analogů zahrnují nejen poškození DNA s následným zablokováním buněčného cyklu v G2/M a indukci p53-závislé apoptosy, ale také narušení membránového mitochondriálního potenciálu a s tím související produkci ROS, což je důležitý aspekt mechanismu působení těchto látek (Huang *et al.*, 2020; Novohradský *et al.*, 2014). Nejvyšší hladiny ze skupiny ROS dosahuje superoxid a jeho množství koreluje s pozorovanou antiproliferativní aktivitou. Tato skutečnost potvrzuje, že jsou cílem působení komplexů skutečně mitochondrie, jelikož ty jsou hlavním zdrojem superoxidů v buňce (Hearn *et al.*, 2015).

Reakcí na oxidační stres způsobený účinky Os(II) je aktivace Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), který je zodpovědný za antioxidační reakci (Hearn *et al.*, 2015; Venugopal, Jaiswal, 1996). V přítomnosti ROS disociuje Nrf2 z aktinu a translokuje se do jádra, kde dochází k interakci s kofaktory, váže se na cis- komponentu hARE (Human antioxidant response element) a transaktivuje antioxidační geny, mezi které patří například HO-1 (Hemoxygenasa 1) nebo GST (glutathion-S-transferasa).

4.1.3 Iridium jako centrální atom

Iridium, jakožto přechodný kov, náleží spolu s osmiem do triády těžkých platinových kovů. Proto můžeme u komplexů iridia očekávat cisplatině podobnou biologickou aktivitu a chemické vlastnosti (Nabiyeva *et al.*, 2020). Organoiridiové sloučeniny jsou v biologii používány v dnešní době jako luminiscenční biologické značky a sondy, inhibitory proteinů a protinádorové látky.

4.1.3.1 Čtvercově planární Ir(I) komplexy

Jako první iridiové organokovové sloučeniny byly z hlediska antiproliferativních účinků studovány čtvercově planární komplexy Ir v oxidačním stavu I (Liu, Sadler, 2014). Na základě očekávání platině podobných vlastností byly navrženy komplexy odvozené od struktury cisplatin. Byla prokázána 100% účinnost při léčbě Ehrlichova ascitu a antimetastatické působení na subkutánní Lewisův karcinom plic u myší. V současné době se od studia protinádorového působení těchto sloučenin postupně upouští a pozornost je věnována spíše jejich katalytickým vlastnostem.

4.1.3.2 Polosendvičové Ir(III) komplexy

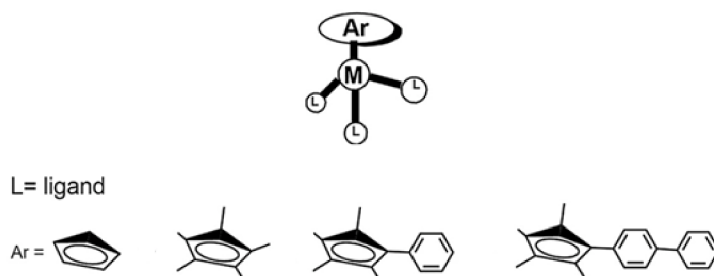
Následující výzkum byl zaměřen na trojrozměrné komplexy s centrálním atomem Ir(III). Tento oxidační stav je stabilnější než Ir(I) (Liu, Sadler, 2014). Řada testovaných iridiových komplexů selektivně usmrcuje nádorové buňky leukémie, melanomu a karcinomů tlustého střeva, prsu a prostaty, a to s vyšší účinností než cisplatina.

Byla prezentována řada polosendvičových analogů s různými typy obsažených ligandů, jež zodpovídají za mírné odlišnosti v působení jednotlivých sloučenin, jelikož hrají důležitou roli v rozpoznávání cílového místa (Liu, Sadler, 2014).

Na rozdíl od Ru nebo Os komplexů nedochází přítomností neutrálního arenového ligandu ke stabilizaci sloučenin, nýbrž zastávají tuto funkci v Ir(III) sloučeninách obvykle cyklopentadienylové ligandy (Liu *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2019) (Obr. 9). Substituenty na cyklopentadienylovém ligandu mohou ovlivnit jak biochemické a biofyzikální vlastnosti, tak biologickou aktivitu. Určují vlastnosti jako je rychlost hydrolyzy, kyselost hydratovaných forem, hydrofobicita, akumulace a distribuce látky v buňce, interakce s DNA a cytotoxicita. Kombinace těchto vlastností podmiňuje účinnost celé sloučeniny. Například počtem přítomných fenylových substituentů na cyklopentadienylu roste hydrofobicita, která je podmínkou pro snadnější příjem buňkou. Dále je aktivita podmíněna typem chelatujícího ligandu a odstupujícího – nejčastěji chloridového – ligandu.

Bylo dokázáno, že komplexy tohoto typu mají dvojí cílení v indukcii buněčné smrti nádorových buněk (Novohradský *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Prvním je poškození jaderné DNA a druhým vyvolání mitochondriální dysfunkce s následnou produkcí ROS. Nejprve dochází ke specifické změně potenciálu na mitochondriální membráně, je zvýšena produkce ROS a následuje kompletní ztráta membránového potenciálu.

Dále mohou mít organo-iridiové komplexy prooxidační aktivitu, která se projevuje přenosem hydridu na kyslík za vzniku peroxidu vodíku, který poté poškozuje další buněčné struktury (Liu, Sadler, 2014). Protinádorové účinky mohou být dále zprostředkovány cílením na lysosomový komplex, což způsobí permeabilizaci lysosomálních membrán, následné zvýšení hladiny ROS a spuštění apoptotických signálních drah (Kong *et al.*, 2019).



Obrázek 9: Obecná struktura polosandvičových komplexů. Ar = fixovaný stabilizační cyklopentadienylový ligand, L = monodentátový/bidentátový ligand, M = centrální atom kovu, převzato a upraveno (Gichumbi, Friedrich *et al.* 2018).

Polosandvičové sloučeniny s iridiem mají vyšší účinnost než klinicky využívaná cisplatina, a to i u buněk se slabou odpovědí, nebo přímo rezistencí k cisplatině (Novohradský *et al.*, 2014). Bylo dokázáno, že Ir-komplexy s cyklopentadienylem se vážou na DNA koordinační vazbou a dochází k interkalaci cyklopentadienyly, čímž je účinně omezena syntéza DNA. Dochází k přibližně 13x efektivnější vazbě iridia k DNA, než v jaké míře k ní dochází u cisplatině. Za hlavní cíl působení cisplatině je přitom považována právě jaderná DNA. Byl také prokázán rozdíl v dynamice a typu účinků na buněčný cyklus mezi působením platinového komplexu a iridiového komplexu. Cisplatina a další platinové sloučeniny přednostně inhibují buněčný cyklus při kratších expozicích v S fázi. Při delších dochází k přechodnému zastavení progresu buněčného cyklu v S fázi a následně v G2/M fázi.

Bylo pozorováno, že iridiové komplexy způsobují nárůst populace v G0/G1 nebo S fázi (Zhang *et al.*, 2019).

Řada iridiových komplexů vyvolává ranou apoptózu již po 24 h, jsou tedy velmi účinné především v brzkých stádiích působení (Novohradský *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Míra těchto účinků se může lišit na základě obsažených ligandů.

Inertní Ir(III) komplexy byly navrženy jako inhibitory kináz, inhibitory TNF- α a katalyzátory produkce singletového kyslíku při fotoaktivaci, což může být využito pro fotodynamickou terapii (Liu, Sadler, 2014). Organoiridiová chemie je prozatím relativně neprozkoumaná, nicméně nabízí unikátní vlastnosti, které mohou být v budoucnosti využity jako výchozí parametry vývoje terapeutik a diagnostických prostředků.

5 Praktická část

5.1 Materiál

5.1.1 Přístroje

- laminární box (Alpina, Polsko)
- CO2 inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)
- centrifuga ROTINA 420 / 420 R (HETTICH, Německo)
- centrifuga Thermo megafuge 16-R (ThermoFisher, USA)
- centrifuga BR4i (Jouan, USA)
- minicentrifuga 5702R (Eppendorf, Německo)
- minicentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko),
- aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA),
- aparatura pro western- blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- CCD kamera LAS4000 (FujiFilm, Japonsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- magnetická míchačka s ohřevem Arex 6 (Velp Scientifics, Itálie)
- odsávací pumpa FTA2i (Biosan, Lotyšsko)
- optický mikroskop TMS (Nikon, Japonsko)
- pipetor (BrandTech Scientific, USA)
- pH metr se skleněnou elektrodou (XS instruments, Itálie)
- průtokový cytometr BD FACS VERSETM (Becton-Dickinson Company, USA)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- mraznička Innova (Fagor, Thajsko)
- pH metr pH 50 (XS Instruments, Itálie) a skleněná pH elektroda (Sentek, Velká Británie)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- systém na úpravu vody SIMS600CP Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (EMD Millipore, Německo)

- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ultrazvuková vana VWR Ultrasonic Cleaner (VWR, USA)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems, Finsko)

5.1.2 Programy

- BD FACSuite™ Software (Becton-Dickinson Company, USA)
- ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA)
- Multigauge software (FujiFilm, Japonsko)

5.1.3 Chemikálie

- 2-merkptoethanol 97% (Serva, Německo)
- akrylamid: AA (VWR, USA)
- aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin: BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- cisplatina (Teva, ČR)
- Coomasie-brilliant blue (Sigma–Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid: DMSO (PanReach AppliChem, Německo)
- dithiothreitol: DTT (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný: SDS (Lach-Ner, ČR)
- ECL substrát (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ethanol 96% (Lach-Ner, ČR)
- fenylmethylsulfonylfluorid: PMSF (Sigma–Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum: FBS (Biowest, Francie)
- fluorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- glycin (Sigma–Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný (Penta, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, ČR)
- chlorid draselný (Lachema, ČR)
- chlorid sodný (Penta, ČR)
- kultivační médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma–Aldrich, Čína)

- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA (Sigma–Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta, ČR)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- L-glutamin (Sigma–Aldrich, USA)
- leupeptin (Sigma–Aldrich, USA)
- n-butanol (Lach-Ner, ČR)
- N',N',N',N'-tetramethylethyldiamin: TEMED (BioRad, USA)
- N',N'-metylenbisakrylamid (Sigma–Aldrich, Čína)
- nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma–Aldrich, USA)
- penicilin (Sigma–Aldrich, USA)
- peroxidisíran amonný (BioRad, USA)
- propidium jodid (Sigma–Aldrich, USA)
- proteinový detekční marker molekulové hmotnosti: Spectra Multicolor Broad PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- resazurin: (Sigma-Aldrich, USA)
- streptomycin (Sigma–Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS (Serva, Německo)
- tween-20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.4 Roztoky

- blokovací pufr: 5% BSA, 0,1% Tween 20 v TBS
- blotovací pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin v dH₂O
- Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomasie-Brilliant blue, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v dH₂O
- ECL (Enhanced chemiluminiscence) roztok: 1:1 luminol a H₂O₂
- elektroforetický pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS v dH₂O
- lyzační pufr RIPA: 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 7,4), 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 5 mmol·l⁻¹ EDTA, 2 mmol·l⁻¹ EGTA, 2 mmol·l⁻¹ NaF, 0,2% nonidet P 40 (pH 7,4) 1 mmol·l⁻¹ PMSF, 1 mmol·l⁻¹ DTT, 10 µg·ml⁻¹ leupeptin, 10 µg·ml⁻¹ aprotinin, 1 mmol·l⁻¹ vanadičnan sodný v dH₂O

- promývací roztok PBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol·l⁻¹ KCl, 10 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄, 2 mmol·l⁻¹ KHPO₄ (pH 7,4) v dH₂O
- Ponceau S: 0,2% Ponceau S, 1% kyselina octová v dH₂O
- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-merkptoethanol, 0,05% bromfenolová modř v dH₂O
- TBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8) v dH₂O
- TBS-T 20: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS, 0,1% Tween 20 v dH₂O
- Roztok resazurinu (6,25 mg/100 ml PBS)

5.1.5 Biologický materiál

A2780 (European Collection of Authenticated Cell Cultures)

- buněčná linie odvozena od lidského ovariálního karcinomu neléčeného pacienta, katalogové číslo: ECACC 93112519

A2780cis (European Collection of Authenticated Cell Cultures)

- buněčná linie připravena z parentální linie A2780, která byla vystavována zvyšujícím se koncentracím cisplatiny, katalogové číslo: ECACC 93112517

5.1.6 Testované látky

V experimentální části této bakalářské práce byly testovány biologické účinky dvou nových organokovových komplexů s obsahem iridia (7457) a osmia (7917) a jako referenční látka byla použita cisplatina. Sloučeniny 7457 a 7917 byly připraveny doc. Pavlem Štarhou, dr. Ivanem Němcem a Mgr. Lukášem Masarykem z Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vlastnosti sloučenin byly charakterizovány pomocí běžných fyzikálně-chemických metod, které potvrdily jejich čistotu a chemickou strukturu. Sloučeniny 7457 a 7917 byly rozpuštěny v DMSO, cisplatina byla používána ve formě vodného roztoku. Dle potřeby byly testované látky ředěny do kultivačního média RPMI, přičemž koncentrace DMSO nikdy nepřesáhla koncentraci 0,1%.

5.1.7 Použité protilátky

Tabulka 1: Přehled použitých primárních protilátek

Detekovaný protein	Typ protilátky	Ředění	Zdroj protilátky
PARP	králíčí	1000x	Cell signaling (USA)
γH2AX	myší	500x	Merck Millipore (Německo)

p53	myší	10x	RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., (Masarykův onkologický ústav)
kaspasa 9	králíčí	500x	Cell signaling (USA)
HO-1	králíčí	1000x	Enzo (USA)
HSP70	králíčí	500x	Cell signaling (USA)

Tabulka 2: Přehled použitých sekundárních protilátek

Sekundární protilátka	Ředění	Zdroj
SWAR (swine anti-rabbit Ig) značena křenovou peroxidasou	1000x	Cell signaling (USA)
RAM (rat anti-mouse Ig) značena křenovou peroxidasou	1000x	Cell signaling (USA)

5.2 Metody

5.2.1 Kultivace

Před samotnou kultivací byly buňky rozmrazeny a rozsuspendovány v kultivačním médiu RPMI-1640 s 10% fetálním sérem a doplněné o penicilin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) a glutamin (2 mM). Poté byly ve větším množství média rozesazeny na Petriho misky (Ø 10 cm). Následně byly ponechány buňky v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Podle míry konfluence byly každý 2. nebo 3. den buňky pasážovány. Při pasážování bylo nejprve odsáto původní médium. Poté byly buňky opatrně omyty roztokem EDTA a následně trypsinizovány. Poté bylo do misky přidáno kultivační médium pro zastavení působení trypsinu. Suspenze byla přenesena do sterilní centrifugační zkumavky, která byla poté centrifugována v nechlazené centrifuze po dobu 8 minut při 1000 g. Supernatant byl odsát a buňky byly resuspendovány v přesném objemu a spočítány. Poté byly buňky rozesazeny podle množství a potřeby na další Petriho misky a bylo doplněno čerstvé médium.

Pro analýzu buněčného cyklu bylo nasazeno na Petriho misku (Ø 5 cm) 1 milion buněk do 5 ml média. Na Petriho misky (Ø 10 cm) byly pro analýzu proteinů nasazeny 3 miliony buněk do 8 ml média.

Veškerá manipulace s buňkami a roztoky byla prováděna v laminárním boxu za sterilních podmínek.

5.2.2 Cytotoxicita

Pro měření cytotoxicity byly buňky nasazeny do 96-jamkové destičky v počtu 5000 buněk na jamku. Po dobu 24 h byly buňky ponechány v inkubátoru, aby došlo k adhezii buněk v jamkách. Poté byla aplikována testovaná látka. Pro každou testovanou látku byl experiment proveden pro 6 koncentrací vždy v triplicátu. Působení látek trvalo 72 hodin. Po tomto intervalu byl aplikován roztok resazurinu. Po 4 hodinách byla měřena fluorescence při 544 nm / 590 nm (excitační λ / emisní λ) pomocí mikrodestičkového readeru Ascent. Hodnota IC_{50} odpovídající koncentraci látky, která je pro 50 % buněk letální, byla vypočítána z křivky závislosti fluorescenčního signálu živých buněk na koncentraci aplikované látky.

5.2.3 Ovlivnění testovanými látkami

Po 24 hodinách bylo původní médium odsáto a na buňky bylo nanášeno médium s obsahem testované látky (7457, 7917, cisplatina) o dané koncentraci. Do média bylo přidáno ke kontrolním buňkám pouze čisté DMSO. Koncentrace DMSO ve vzorcích nepřesáhla 0,1 %. Po daném časovém intervalu (24 h a 72 h) působení testovaných látek, byly buňky sklizeny.

5.2.4 Příprava vzorků pro cytometrickou analýzou

Do vychlazených zkumavek na ledu bylo převedeno médium z Petriho misky a celý objem EDTA po omývání. Poté byla do zkumavek převedena také suspenze buněk po trypsinizaci. Zkumavky byly centrifugovány v chlazené centrifuze po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Za těchto podmínek byly provedeny všechny centrifugace postupu sklizení pro analýzu buněčného cyklu. Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován v 1 ml vychlazeného PBS. Zkumavky byly opět centrifugovány. Supernatant byl odsát, pelet byl resuspendován ve 100 μ l PBS. Fixace byla provedena pomalým přikapáváním 1 ml vymraženého 70% ethanolu. Po celou dobu fixace byl obsah zkumavky promícháván na vířivé třepačce. Po fixaci byly zkumavky před analýzou umístěny do -20 °C.

5.2.5 Sklizení a lyzace před SDS-PAGE

Pomocí plastových škrabek byly buňky ze dna Petriho misek uvolněny do média. Takto připravená suspenze byla převedena do vychlazených centrifugačních zkumavek na ledu. Poté byla miska opláchnuta 2 ml PBS, které byly poté převedeny také do zkumavky k suspenzi. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C.

Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS. Zkumavky byly stočeny za stejných podmínek, jako při prvním kroku a supernatant byl opět odsát. Pelet byl resuspendován v 1,5 ml PBS a převeden do mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly centrifugovány opět 8 minut při 1000 g a 4 °C. Poté byl supernatant odsát a pelet byl zamražen v -80 °C.

Pelety v mikrozkuvkách byly rozsuspendovány v lyzačním pufru. V následujících 30 minutách byl obsah všech mikrozkuvek minimálně třikrát promícháván. Dalším krokem byla sonikace pomocí sonického homogenizátoru. Poté byly zkumavky centrifugovány po dobu 30 minut při 14 000 g a 4 °C. Supernatant byl převeden do mikrozkuvek a následně byla stanovena koncentrace proteinů u jednotlivých vzorků Bradfordovou metodou (Bradford, 1976). Do skleněných zkuvek byl do 1 ml Bradfordova činidla přidán 1 µl lyzátu. Obsah zkuvek byl promíchán a následovala inkubace po dobu 10 minut za laboratorních podmínek. Poté byla u každého vzorku spektrofotometricky měřena absorbance. Každý vzorek byl měřen v duplikátu, jako výsledek byl použit průměr absorbancí, resp. koncentrací. Podle vzorku s nejnižší koncentrací proteinů, byly i ostatní vzorky naředěny potřebným množstvím lyzačního pufru na stejnou koncentraci. Poté byl přidán 5x SDS vzorkovací pufr). Vzorky byly promíchány a na 5 minut umístěny do termobloku vyhřátého na 95 °C. Poté byly vzorky uloženy do mrazícího boxu o teplotě -20 °C.

5.2.6 Průtoková cytometrie

Po fixaci byly zkumavky centrifugovány opět v chlazené centrifuze po dobu 8 minut při 1000 g a 4 °C. Supernatant byl odsát a pelet rozsuspendován v 1 ml PBS. Poté byly zkumavky znova centrifugovány a supernatant odsát. Pelet byl rozsuspendován v 50 µl PBS. Za stálého míchání na zkumavkové míchačce byl pomalu přikapán 1 ml 2N HCl/Triton X-100 0,5%. Suspenze byla řádně promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut s častým promícháváním. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky centrifugovány a supernatant odsát. Pelet byl rozsuspendován v 1 ml 0,1M dekahydrátu tetraboritanu sodného (pH 8). Následovala centrifugace a odsátí supernatantu. Pelet byl rozsuspendován v 600 µl filtrovaného PBS a poté bylo přidáno 6 µl propidiumjodidu. Zkumavky byly inkubovány po dobu 30 minut ve tmě za občasného promíchání. Po uplynutí inkubační doby byla provedena analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií. Naměřená data byla zpracována pomocí programu Mod Fit LT 5.0 a bylo vyhodnoceno zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

5.2.7 SDS-PAGE

Separace proteinů probíhala v polyakrylamidovém gelu, a to v 10% a 15% dělicím s 5% zaostřovacím o tloušťce 1 mm. Diskontinuální elektroforézou došlo k oddělení jednotlivých proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Příprava SDS-PAGE byla provedena následovně. Po smíchání všech složek dělicího gelu byla směs rychle přelita mezi skla ve stojánku a převrstvena butanolem. Takto byla soustava ponechána přibližně 45 minut. Butanol byl slit a povrch gelu opláchnut destilovanou vodou. Po připravení a rychlém promíchání byla směs zaostřovacího gelu nalita na ztuhlý dělicí gel a opatrně byl vsunut mezi skla hřebínek. Gel takto tuhl dalších 30 minut. Objemy jednotlivých složek pro přípravu akrylamidového gelu je uvedeno Tabulka 2.

Tabulka 3: složení polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE

složka	dělicí 10%	dělicí 15%	zaostřovací 5%
AA/BIS	3.125 ml	4.69 ml	0.84 ml
dest. H ₂ O	2.67 ml	1.11 ml	3.51 ml
Tris pH 8,8	3.5 ml	3.5 ml	-
Tris pH 6,8	-	-	0.63 ml
SDS 10%	94 µl	94 µl	50 µl
TEMED	6.25 µl	6.25 µl	5 µl
APS 10%	37.5 µl	37.5 µl	30 µl

Po ztuhnutí obou gelů byla skla vyjmuta ze stojánku a vsunuta do elektroforetické komory. Elektroforetická vana i komůrka byly naplněny elektrodoým puřrem. Hřebínek byl z gelu opatrně vytažen tak, aby nedošlo k poškození jamek v gelu. Zmražené vzorky s SDS vzorkovacím puřrem byly v termobloku ohřáty na 95 °C a poté promíchány na zkumavkové míchačce. Do jednotlivých jamek bylo naneseo takové množství vzorku odpovídající 30 µg proteinů.

Poté byla soustava připojena ke zdroji. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V a po vstupu vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy čelo vzorků domigrovalo gelem na konec skleněných desek.

5.2.8 Western-blotting a imunodetekce

Po ukončení SDS-PAGE byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí western-blottingu.

Gel byl opatrně sejmuto ze skleněných destiček a vložen mezi porézní destičky a filtrační papíry, na gel byla položena membrána. Blotovací komora byla naplněna vychlazeným blotovací puřrem. Blotting probíhal po dobu 3 hodin při konstantním proudu 270 mA a za stálého míchání a chlazení ledovou kazetou.

Po ukončení blottingu byla membrána vyjmuta z kazety a obarvena v roztoku Ponceau S. Poté byla membrána vyjmuta a omyta destilovanou vodou. Z membrány byly vyřezány proučky oblastí s molekulovou hmotností odpovídající požadovaným proteinům. Vyřiznuté membrány byly odbarveny v TBS na kývačce. Poté byly po dobu 1 hodiny ponechány na kývačce v roztoku BSA v TBS pro zablokování nespecifických vazeb. Následně byly membrány inkubovány s primárními protilátkami přes noc v lednici.

Po inkubaci probíhalo promývání v TBS a TBS+Tween podle Tabulka 3. Poté byly nanoseny odpovídající sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou, které byly opět naředěny do BSA do množství odpovídajícímu velikosti membrány. Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a poté promývání v TBS a TBS+Tween uvedené v Tabulka 3.

Tabulka 4: Promývání po primární a po sekundární protilátce

	po primární Ab	po sekundární Ab
TBS	5 min	10 min
TBS + Tween	5 min	5 min
TBS	5 min	5 min
TBS	10 min	10 min

Poté byla na membrány nanasena chemiluminiscenční směs luminol:peroxid vodíku (1:1). Detekované proteiny byly poté vyfoceny pomocí CCD kamery LAS4000 a vyfoceny signál zpracován v programu Multi Gauge Software.

6 Výsledky a diskuse

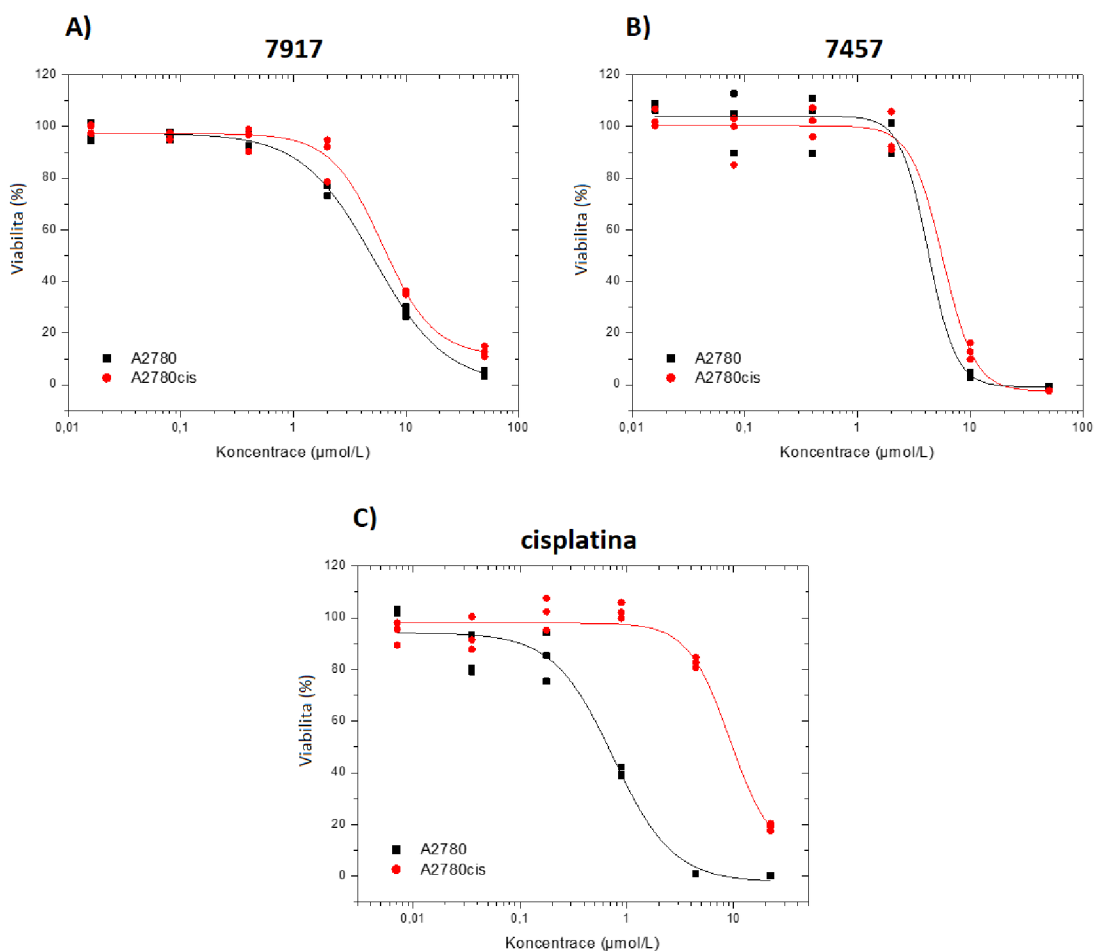
6.1 Stanovení antiproliferativní aktivity vybraných látek

V experimentální části této bakalářské práce byly testovány antiproliferativní účinky dvou nových organokovových komplexů s obsahem iridia (7457) a osmia (7917). Působení těchto látek bylo testováno na buněčných liniích A2780 (lidský ovariální karcinom) a na cisplatina-rezistentní linii A2780*cis* odvozené od A2780.

Antiproliferativní aktivita jednotlivých látek byla nejprve stanovena na základě testu cytotoxicity. Hodnoty IC₅₀ testovaných látek byly měřeny fluorescenčně pomocí resazurinu u obou buněčných linií. Nejprve byly buňky ovlivněny po dobu 72 hodin postupně rostoucími koncentracemi látek v triplicátech. Poté byl k buňkám přidán resazurin, který je živými buňkami metabolizován na produkt resorufin, jehož fluorescence byla po 4 hodinách změřena. Experiment prokázal, že vybrané látky 7917 a 7457 mají antiproliferativní účinky na A2780 i A2780*cis*. Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny jako průměr dvou nezávislých opakování (Obr. 10). Pro linii A2780 byla určena inhibiční koncentrace $5.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ u látky 7457, $4.7 \pm 1.9 \mu\text{M}$ pro látku 7917 a $0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ pro cisplatinu (Tab. 5). Na rezistentní linii A2780*cis* působily testované látky také antiproliferativně, $6.0 \pm 1.2 \mu\text{M}$ pro látku 7917, $6.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ pro látku 7457 a $8.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$ pro cisplatinu (Tab. 5). Zatímco u nových organokovových komplexů nedošlo k výraznému zhoršení antiproliferativní aktivity u cisplatina-rezistentních buněk a hodnoty IC₅₀ byly u obou testovaných linií zhruba srovnatelné, antiproliferativní aktivita látek 7917 a 7457 byla 1.2x a 1.4x nižší u rezistentní linie A2780*cis*. Cisplatina působila na A2780*cis* oproti A2780 s přibližně 16x nižší antiproliferativní aktivitou. Naměřené inhibiční koncentrace pro cisplatinu u A2780 korespondují s daty publikovanými Pichler et al., 2015 a Novohradský et al., 2014.

Inhibiční koncentrace stanovené pro komplex 7917 s obsahem osmia jsou srovnatelné s publikovanými daty van Rijt et al., 2009 a Suntharalingam et al., 2013, kteří prezentovali výsledky působení příbuzných organokovových sloučenin také na linii A2780 a její rezistentní variantu. Inhibiční koncentrace jimi prezentovaných analogů se pohybovaly řádově v jednotkách μM hodnot a výsledky prezentované van Rijt et al., 2009 byly velmi podobné s výsledky v této práci. Antiproliferativní aktivita komplexů testovaných Suntharalingam et al., 2013 byla vyšší, než u komplexu testovaného v této práci.

Výsledky publikované Novohradským *et al.*, 2014 ukázaly zhruba 10x vyšší antiproliferativní účinnost iridiového komplexu proti A2780 i A2780cis, než jakou vykazuje námi testovaná látka.



Obrázek 10: Srovnání závislosti viability buněk linie A2780 a A2780cis na koncentraci látek A) 7917, B) 7457, C) cisplatin

Tabulka 5: Hodnoty IC_{50} látek 7917, 7457 a cisplatiny (\pm SD)

	IC_{50} (μ M)	
	A2780	A2780cis
7917	5.0 ± 0.1	6.0 ± 1.2
7457	4.7 ± 1.9	6.8 ± 1.1
cisplatin	0.5 ± 0.2	8.7 ± 1.4

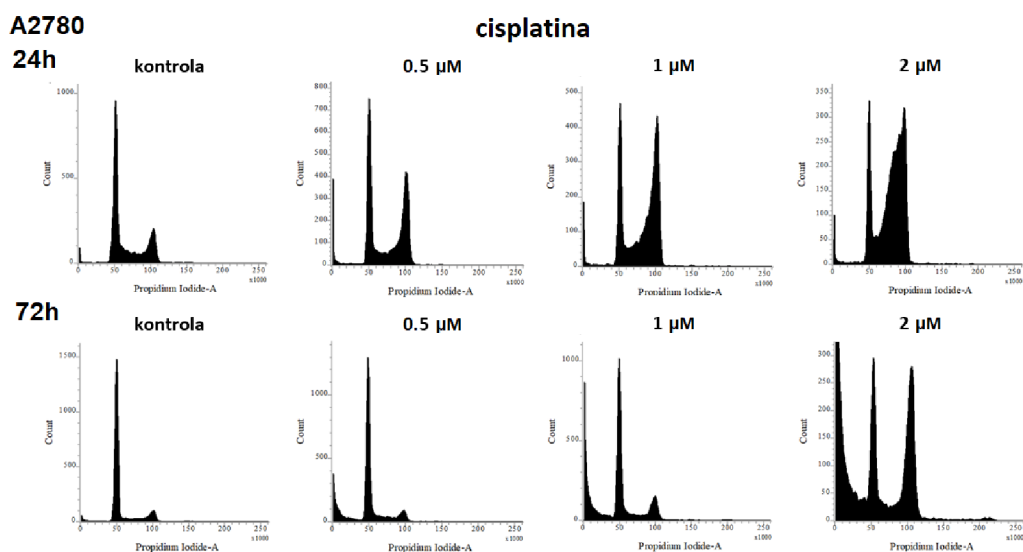
6.2 Analýza buněčného cyklu

Na základě naměřených hodnot IC_{50} jednotlivých látek byly zvoleny koncentrace pro testování účinků na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie. Koncentrace látek byly aplikovány v hodnotách odpovídajícím naměřeným IC_{50} , konkrétně v násobcích 1x,

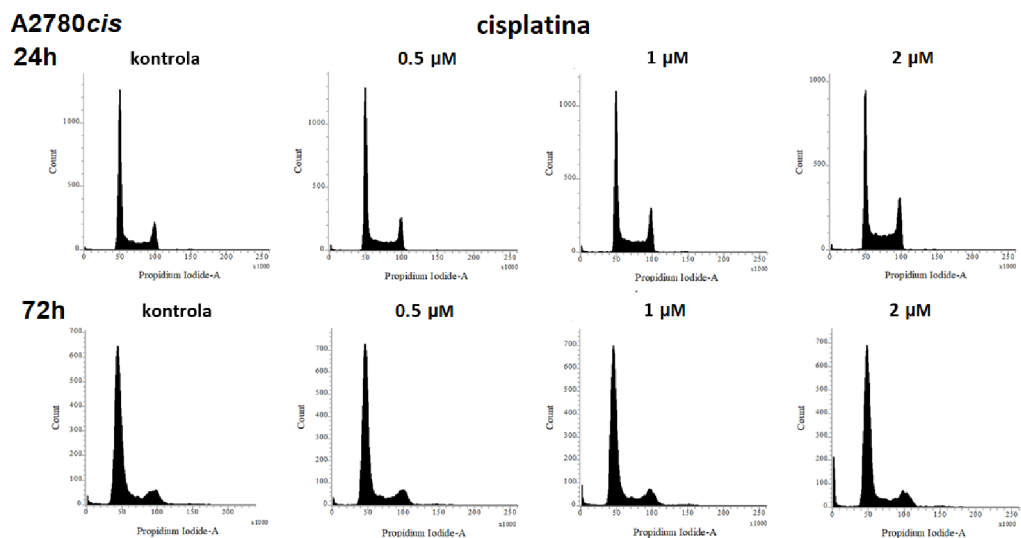
2x a 4x hodnot IC_{50} pro A2780. Látky 7917 a 7457 byly aplikovány v koncentracích 5, 10 a 20 μM , cisplatinu v koncentracích 0.5, 1 a 2 μM . Vliv na buněčný cyklus byl vyhodnocen po 24 a 72h expozici. Pomocí průtokové cytometrie bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Po sklizení buněk byla provedena fixace ethanolem, permeabilizace a poté byly buňky inkubovány s fluorescenčním barvivem. Použitým fluorescenčním barvivem je propidium jodid. Jedná se o interkalační činidlo, které se váže na DNA bez báze či sekvenční preference. K fluorescenci dochází po ozáření laserem o λ 488 nm. Signál je zaznamenán do histogramu. Intenzita fluorescence představuje množství DNA v buňce, na základě čehož je možné určit fázi buněčného cyklu.

Pomocí průtokové cytometrie byly pozorovány rozdíly mezi působením jednotlivých látek na buněčný cyklus. Jako referenční látka se známým mechanismem účinku na buněčný cyklus byla použita cisplatinu. Tato látka indukuje nejprve přechodné zablokování buněčného cyklu v S fázi a později dochází k progresi buněčného cyklu dále do G2, kde dochází k zablokování cyklu v G2/M a následuje buněčná smrt (Sorenson *et al.*, 1990). Tento mechanismus účinku byl experimentem potvrzen (Obr. 11). S rostoucí koncentrací cisplatinu docházelo po 24 h k nárůstu populace buněk v pozdní S fázi a byl pozorován mírný nárůst subG1 populace, která představuje apoptotické a nekrotické buňky, případně buněčné fragmenty. Po 72 h docházelo ke kumulaci buněk v G2 fázi a se zvyšující se koncentrací také k rapidnímu nárůstu apoptotických buněk. Buněčný cyklus rezistentních buněk (A2780*cis*) nebyl cisplatinou nijak ovlivněn a ani po 72 h nedošlo u těchto buněk k žádným významným změnám v distribuci fází buněčného cyklu ve srovnání s neovlivněnou kontrolou (Obr. 12).

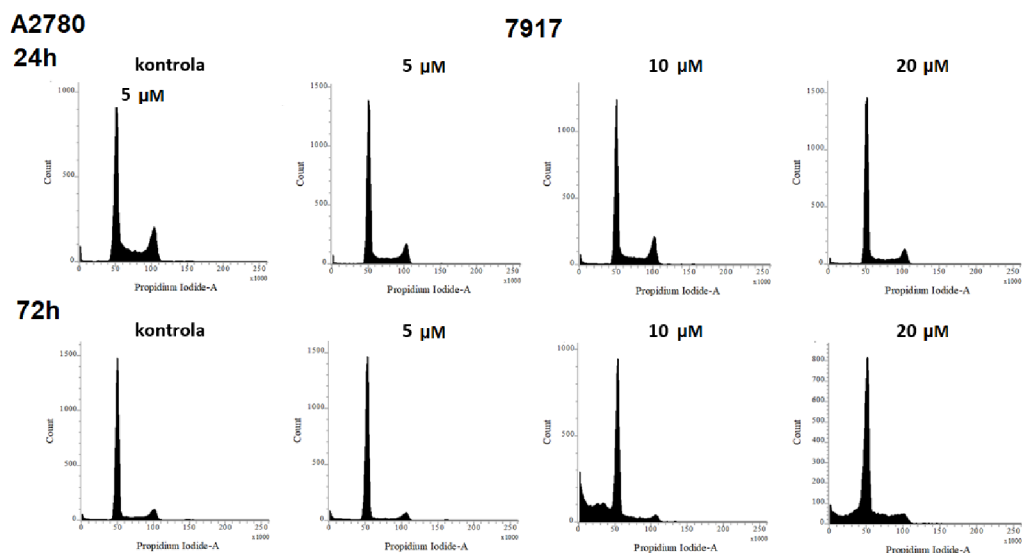


Obrázek 11: Účinek cisplatinu na buněčný cyklus linie A2780 po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium jodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence (množství DNA).

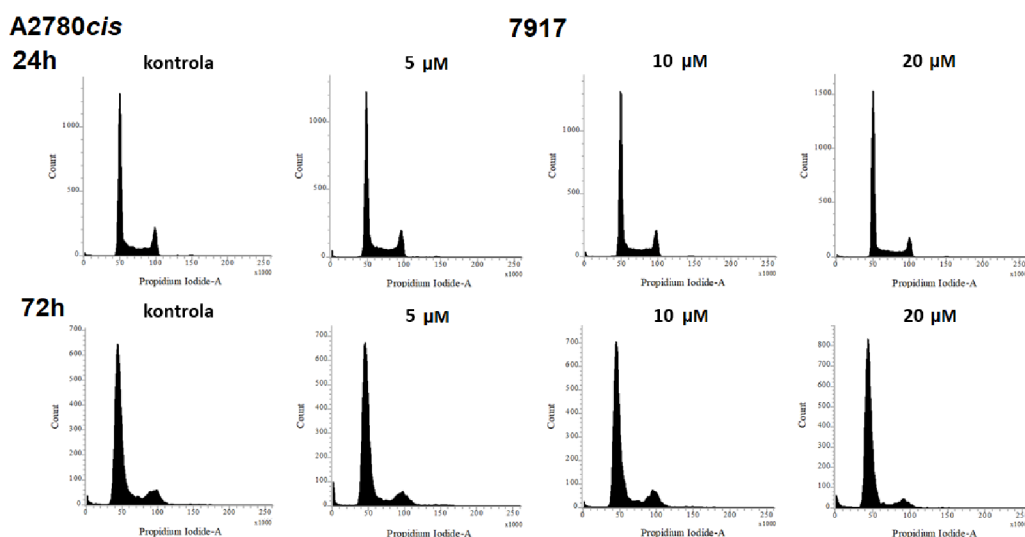


Obrázek 12: Účinek cisplatinu na buněčný cyklus linie A2780cis po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium iodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence (množství DNA).

Látka **7917** po 24 h působení neovlivnila buněčný cyklus téměř vůbec ani u jedné z testovaných linií (Obr. 13 a 14). Můžeme tedy usuzovat, že antiproliferativní působení látky 7917 má při kratších časech působení spíše cytostatický než cytotoxický charakter. Po 72 hodinách došlo u linie A2780 k mírnému nárůstu populace subG1 odpovídající apoptotickým buňkám (Obr. 13), zatímco u linie A2780cis subG1 populace nebyla pozorována (Obr. 14). Tato skutečnost je zajímavá, protože na základě stanovené IC_{50} látky 7917 vůči liniím A2780 a A2780cis je citlivost obou linií víceméně srovnatelná (5 μ M a 6 μ M) (Tab. 5). Tento výsledek naznačuje odlišný mechanismus dlouhodobého působení látky 7917 na vybrané nádorové linie, který bude předmětem dalšího testování v budoucnu.



Obrázek 13: Účinek látky 7917 na buněčný cyklus linie A2780 po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium iodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence (množství DNA).



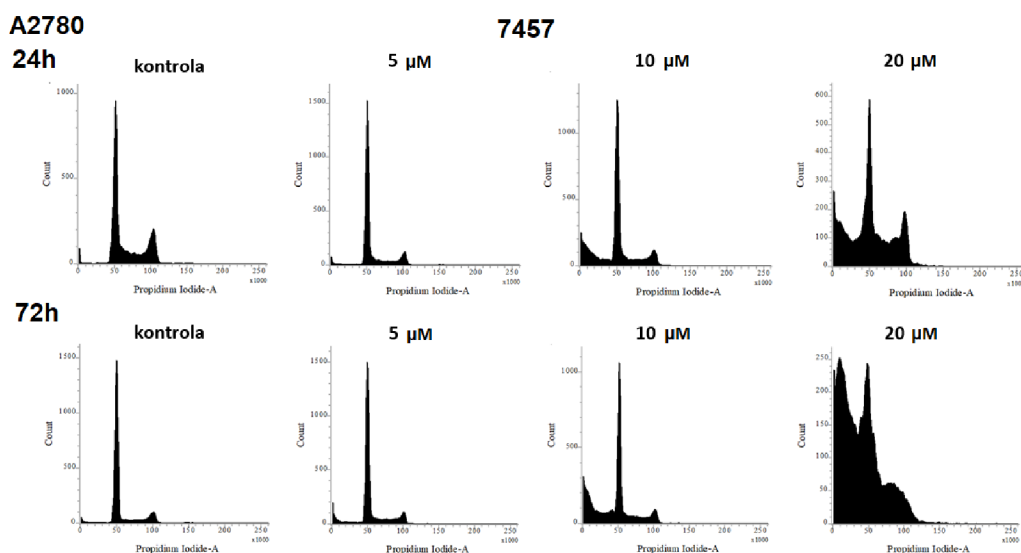
Obrázek 14: Účinek 7917 na buněčný cyklus linie A2780cis po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium iodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence (množství DNA).

Sloučenina **7457** způsobila u buněk A2780 již po 24h nárůst populace S fáze, mírně také G2 fáze a výrazné zvětšení populace subG1 (Obr. 15). Po 72h expozici látky 7457 došlo k nárůstu populace G2 fáze a především k prudkému zvýšení množství apoptotických buněk. Tyto účinky se zvyšovaly s narůstající koncentrací látky. Cisplatina vyvolá nárůst subG1 populace, tedy indukci apoptosy až při ovlivnění po dobu 72 h (Obr. 11). Novohradský *et al.* 2014 prezentovali vliv komplexu s obsahem iridia na buněčný cyklus linie A2780 v čase. Bylo zjištěno, že jimi testovaný komplex v koncentraci odpovídající hodnotě IC_{50} , narozdíl od cisplatiny, nepůsobí významné změny buněčného

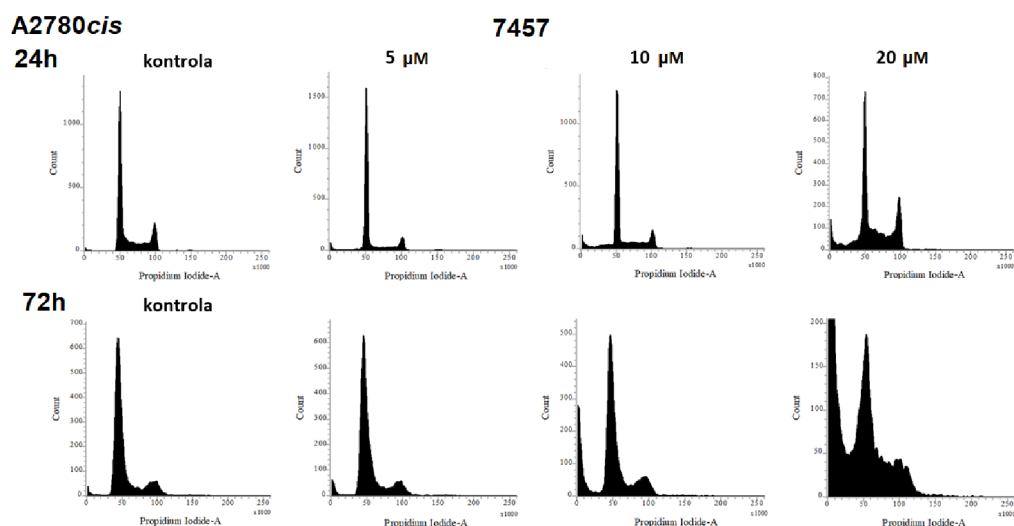
cyklu oproti neovlivněným kontrolním buňkám. Na působení iridiového komplexu reagovala jak linie A2780, tak i rezistentní linie A2780cis (Obr. 16).

K indukci apoptosy látkou 7457 dochází v rezistentních buňkách již při 24h ovlivnění (Obr. 17). Tento výsledek může představovat výhodu, protože cisplatina aktivuje apoptosu až po 72h působení a rezistentní buňky na její účinky podle předpokladu, narozdíl od 7457, neodpovídají. Látka 7457 byla podrobena dalším experimentům pro pochopení mechanismu aktivace apoptosy testovanými látkami.

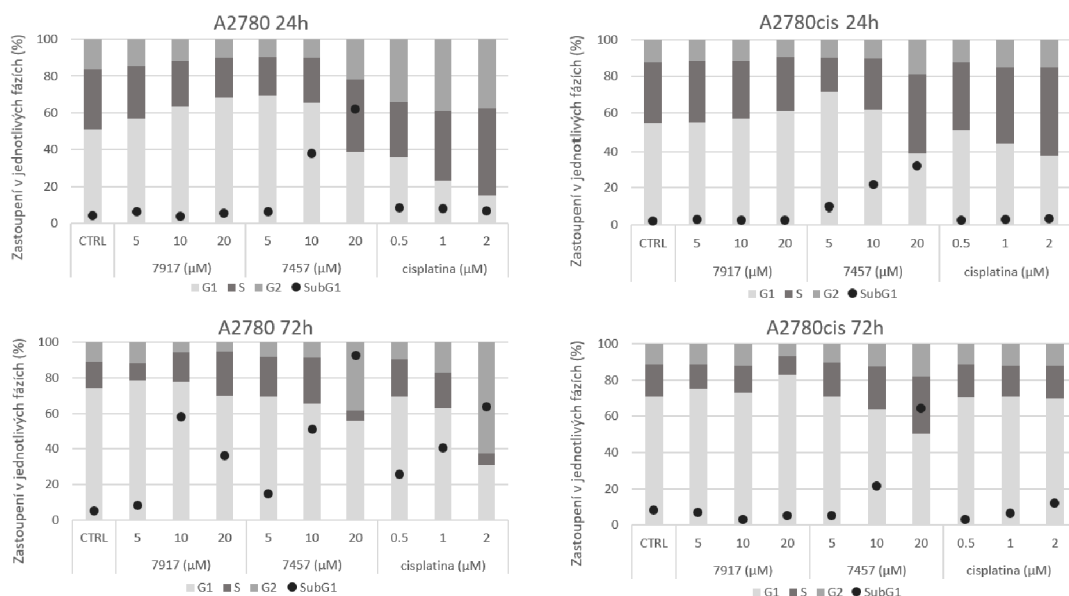
Je třeba zmínit, že bylo publikováno porovnání vlivu komplexů s obsahem osmia a iridia na buněčný cyklus (Hearn *et al.*, 2017). Ovlivnění buněčného cyklu komplexem s obsahem osmia se projevilo při porovnání s kontrolními buňkami spíše nárůstem populace G1 fáze. Naopak organo-iridiový komplex způsobil nárůst populace S nebo G2 fáze, což koresponduje se zde uvedenými výsledky po 24 h působení (Obr. 17). Látka 7457 po 72 h působení vyvolala prudký nárůst apoptosy a snížení populace S fáze (Obr. 17.).



Obrázek 15: Účinek látky 7457 na buněčný cyklus linie A2780 po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium jodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence, (množství DNA).



Obrázek 16: Účinek látky 7457 na buněčný cyklus linie A2780cis po 24 a 72 hodinách. Buňky byly značeny fluorescenčně propidium jodidem. Osa y představuje počet buněk, osa x představuje intenzitu fluorescence (množství DNA).



Obrázek 17: Grafy znázorňující zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu obou testovaných linií po 24 a 72 h.

6.3 Analýza exprese vybraných proteinů

Pro přesnější potvrzení rozdílů mezi proapoptotickým působením cisplatinou a látek 7917 a 7457 byla provedena imunodetekce vybraných proteinů po 24h ovlivnění (Obr. 18 a 19). Dále byla analýza provedena také po 72h ovlivnění buněk A2780 cisplatinou (obr. 20).

Prvním studovaným proteinem byla kaspasa 9, která je iniciačním enzymem vnitřní dráhy apoptosy. Byl sledován 35 kDa fragment vznikající štěpením 46 kDa

prokaspasy 9, což je forma, která se nachází u buněk nepodstupujících apoptosu. Fragment byl detekován pouze v buňkách ovlivněných nejvyšší koncentrací látky 7457, a to u obou linií (Obr. 18 a 19). Je potvrzeno, že kaspasa 9 je hlavní iniciační kaspasou zprostředkovávající cisplatinou vyvolanou apoptosu (Kuwahara *et al.*, 2000). V tomto experimentu způsobila cisplatinu aktivaci kaspasy 9 již v nejnižší testované koncentraci, avšak až po 72h působení (Obr. 20). Po 24 h působení nebyla kaspasa detekována ani při působení nejvyšší použité koncentrace cisplatinu (Obr. 18 a 19). Možno tedy říci, že látka 7457 indukuje aktivaci vnitřní apoptotické dráhy dříve, než cisplatinu.

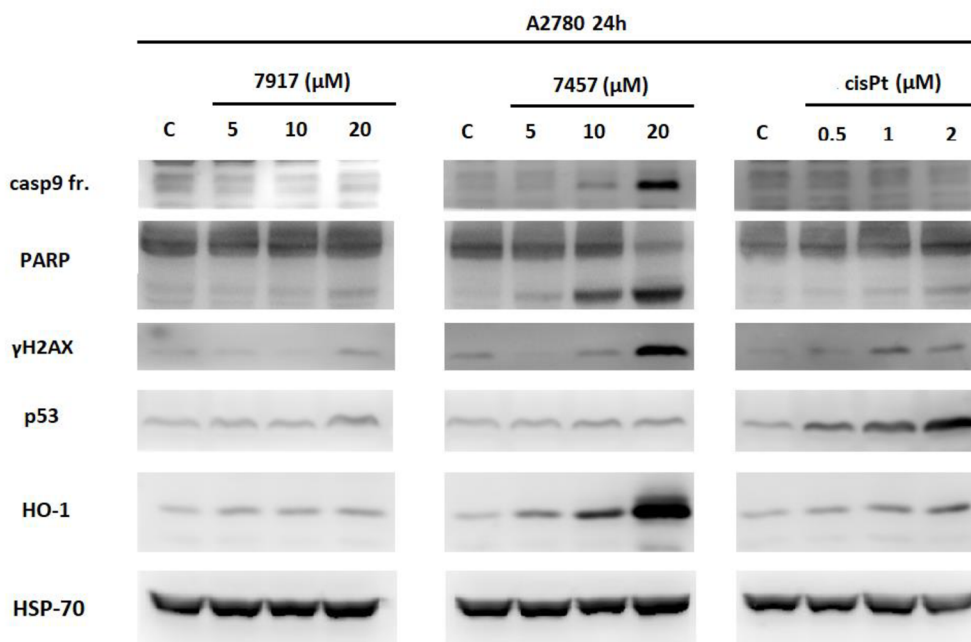
Dalším sledovaným proteinem byl protein PARP (Poly-ADP-ribose polymerasa). Tento protein o velikosti přibližně 116 kDa je substrátem aktivovaných kaspas. Po jejich aktivaci dochází ke štěpení PARP a vzniku 89kDa fragmentu., který je využíván jako apoptotický marker. Zvyšující se hladina 89 kDa fragmentů proteinu PARP byla pozorována u buněk po 24h expozici koncentracím 5-20 μM látky 7457. K nárůstu docházelo spolu se zvyšující se koncentrací látky. Ke štěpení tohoto proteinu dochází při působení látky 7457 již po 24 hodinách a to u citlivé i rezistentní linie. Je tedy pravděpodobné, že mechanismus kaspasami zprostředkované apoptosy indukované látkou 7457 je odlišný od mechanismu cisplatinu. Látka 7917 neovlivnila aktivitu kaspas štěpících PARP ani u jedné buněčné linie, a to ani nejvyšší koncentrací. Průtokovou cytometrií však bylo zjištěno, že po 72h ovlivnění (Obr. 17) dochází k nárůstu populace subG1. Je tudíž pravděpodobné, že by byla po 72h působení detekována zvýšená hladina aktivované kaspasy 9 a fragmentů proteinu PARP stejně, jako tomu je u buněk ovlivněných cisplatinou po dobu 72 h. Tato hypotéza by mohla být správná na základě publikovaných dat. Suntharalingam *et al.*, 2013 popsali účinky organokovového komplexu s centrálním atomem osmia, který v mikromolárních koncentracích po 72 hodinách působení aktivoval kaspasy a inicioval u linie A2780 štěpení proteinu PARP.

Dalším studovaným proteinem je fosforylovaný histonový protein H2AX - γH2AX . Tento protein je ukazatelem poškození DNA, konkrétněji dvouvláknových zlomů. Některé z organokovových komplexů s obsahem osmia způsobují dvouřetězcové zlomy a dochází, mimo jiné, k fosforylaci histonového proteinu H2AX (Johnstone *et al.*, 2015; Suntharalingam *et al.*, 2013). Látka 7917 tento efekt nevyvolala. Jeho hladina však byla zvýšena účinky látky 7457 v nejvyšší koncentraci. Cisplatinu v testovaných koncentracích způsobuje dvouvláknové narušení DNA až při delší expozici - fosforylovaná forma proteinu byla detekována v buňkách ovlivňovaných 72 h (Obr. 20).

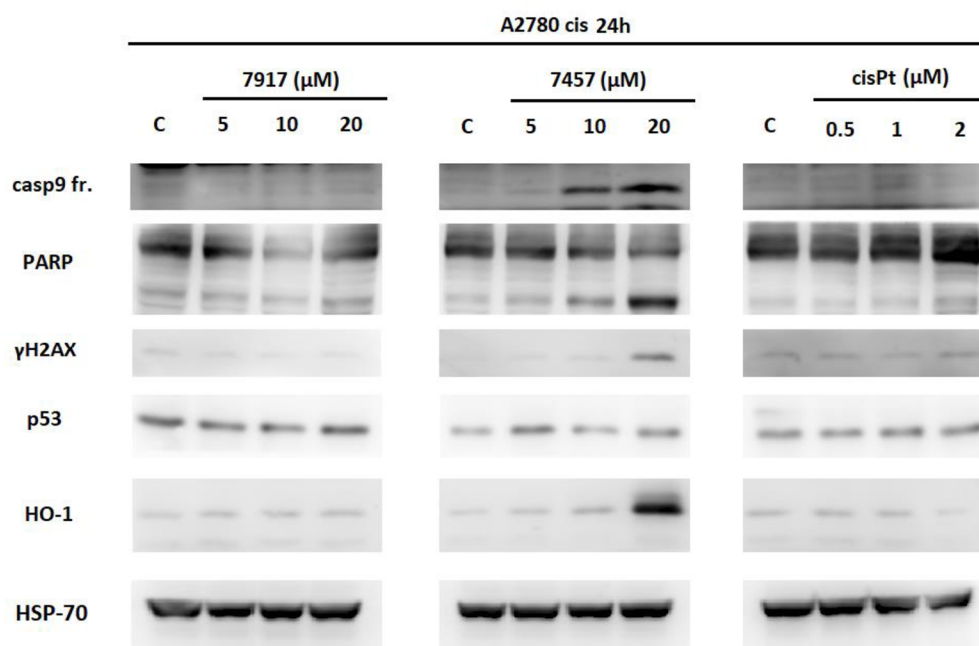
Vzhledem k tomu, že cisplatinu způsobuje poškození DNA a následkem toho dochází k fosforylaci a stabilizaci proteinu p53, což má dále vliv na opravné mechanismy, replikaci, buněčný cyklus a indukci apoptosy (Lambert, Sørensen, 2018), byl pro zjištění mechanismu působení testovaných organokovových komplexů a jejich případné

podobnosti s působením cisplatiny jako další protein detekován právě p53. Bylo dokázáno, že zatímco ke zvýšení hladiny p53 dochází již po 24h působení cisplatiny v závislosti na koncentraci, ani jedna z nových látek neměla na aktivaci p53 vliv. Apoptosa vyvolaná látkou 7457 je tedy v těchto raných fázích indukována nezávisle na p53.

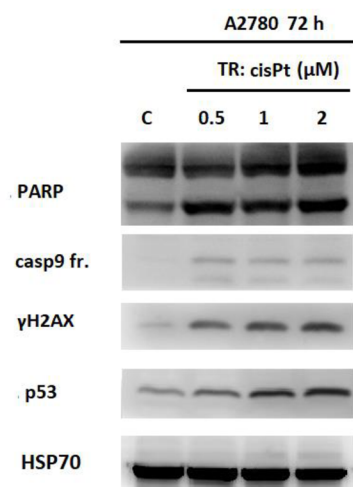
Řada organokovových sloučenin s obsahem osmia a iridia jsou spojeny se zvýšenou produkcí ROS vedoucí k oxidativnímu stresu (Romero-Canelón *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014). Na zvýšenou hladinu reaktivních forem kyslíku reaguje buňka řadou antioxidačních mechanismů. Jedním z nich je aktivace Nrf2, který je regulátorem exprese řady genů včetně HO-1 – enzymu s antioxidačními vlastnostmi. Mírně zvýšená hladina HO-1 enzymu byla detekována u buněk A2780 již od nejnižší testované koncentrace látky 7457 a se zvyšující se koncentrací dále narůstala (Obr. 18). U A2780cis buněk došlo také k reakci na oxidativní stres způsobený touto sloučeninou u buněk ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací (Obr. 19). Tyto výsledky jsou v souladu s daty publikovanými Liu *et al.* 2014, kterými bylo prokázáno, že strukturně příbuzný iridiový komplex v nádorové linii A2780 indukoval oxidativní stres a výrazný nárůst hladiny reaktivních forem kyslíku. Látka 7917 nevyvolala po 24 h působení oxidativní stres ani u jedné linie (Obr. 18 a 19). Cisplatin vyvolává zvýšenou produkci HO-1 u citlivých buněk velmi mírně, což naznačuje, že se nejedná o hlavní mechanismus jejího cytotoxického účinku. Z tohoto důvodu již nebyl tento protein analyzován po 72 h působení.



Obrázek 18: Imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii A2780 po ovlivnění testovanými látkami po dobu 24 h. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce HSP70 (Heat-shock protein 70).



Obrázek 19: Imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii A2780cis, doba ovlivnění 24h. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce HSP70 (Heat-shock protein 70).



Obrázek 20: Imunodetekce vybraných proteinů pro bližší popsání a porovnání mechanismu působení cisplatin. Buněčná linie A2780, doba ovlivnění 72h. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce HSP70 (heat-shock protein 70)

7 Závěr

Konvenčně využívaná cisplatinová chemoterapie je provázena závažnými vedlejšími účinky a její použití je často znemožněno získanou či vrozenou rezistencí k léčbě. Na základě těchto limitujících faktorů probíhá v současné době vývoj nových protinádorových organokovových derivátů.

V této práci byly zkoumány biologické účinky dvou nových organokovových komplexů s obsahem osmia (7917) a iridia (7457) na lidské nádorové buňky odvozené od ovariálního karcinomu A2780 a zároveň na buňky linie A2780*cis* vykazující rezistenci k cisplatině.

Bylo zjištěno, že obě testované látky dosahují v mikromolárních koncentracích antiproliferativních účinků na linii A2780. Na rozdíl od cisplatin vykazují testované látky srovnatelnou účinnost také v případě linie A2780*cis*. Mechanismus působení těchto látek byl dále zkoumán pomocí cytometrické analýzy buněčného cyklu a analýzy exprese vybraných proteinů.

U látky 7457 bylo popsáno proapoptotické působení u obou testovaných linií. Apoptosa byla prokázána nárůstem počtu buněk v subG1 fázi buněčného cyklu a také analýzou exprese vybraných proteinových markerů (aktivace kaspasy 9 a štěpení proteinu PARP). K aktivaci apoptosy docházelo již po 24h expozici látky 7457, což je dříve než při expozici cisplatině. Tento efekt vyvolá až po 72 h, a pouze u linie A2780. Rozdíl je také v aktivaci p53, ke které působením látky 7457, na rozdíl od cisplatin, nedochází. Dále je podstatné, že tato látka vyvolává v buňce oxidativní stres, který je typický pro působení organo-iridiových komplexních sloučenin.

Oproti látce 7457 nevykazuje látka 7917 při krátkých časech působení proapoptotické účinky, ale působí převážně cytostaticky. Pomocí cytometrické analýzy nebyl po 24h působení zaznamenán nárůst počtu buněk v subG1 fázi a ani analýza proteinových apoptotických markerů neodhalila nárůst jejich hladin po působení látky 7917. Nárůst subG1 populace byl zaznamenán až po 72h působení, ale pouze u linie A2780.

Obě látky působí na testované buňky antiproliferativně. Stanovené hodnoty IC₅₀ jsou srovnatelné, ale mechanismus jejich účinků je odlišný. Z tohoto důvodu se jedná o vhodné kandidáty pro bližší prostudování a objasnění rozdílů účinků komplexů s obsahem osmia a iridia.

8 Použitá literatura

1. Alessio, E. (2017). Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(12), 1549-1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>
2. Alessio, E., & Messori, L. (2019). NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>
3. Al-Eisawi, Z., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q., & Huq, F. (2011). Modulation of cisplatin cytotoxicity due to its combination with bortezomib and the nature of its administration. *Anticancer research*, 31(9), 2757–2762.
4. Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C., & Coffman, L. (2020). Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. In A. Birbrair (Ed.), *Tumor Microenvironment* (pp. 31-42). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_3
5. Ballesta, A., Billy, F., Coverdale, J. P. C., Song, J. -I., Sanchez-Cano, C., Romero-Canelón, I., & Sadler, P. J. (2019). Kinetic analysis of the accumulation of a half-sandwich organo-osmium pro-drug in cancer cells. *Metallomics*, 11(10), 1648-1656. <https://doi.org/10.1039/C9MT00173E>
6. Bellon, S. F., Coleman, J. H., & Lippard, S. J. (2002). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand crosslinks of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, 30(32), 8026-8035. <https://doi.org/10.1021/bi00246a021>
7. Berndsen, R. H., Weiss, A., Abdul, U. K., Wong, T. J., Meraldi, P., Griffioen, A. W., Dyson, P. J., & Nowak-Sliwinska, P. (2017). Combination of ruthenium(II)-arene complex [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta)] (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep43005>
8. Brabec, V., & Kasparkova, J. (2005). Modifications of DNA by platinum complexes. *Drug Resistance Updates*, 8(3), 131-146. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2005.04.006>
9. Burger, H., Loos, W. J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R. H. J., & Wiemer, E. A. C. (2011). Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.12.002>
10. Callejo, A., Sedó-Cabezón, L., Juan, I., & Llorens, J. (2015). Cisplatin-Induced Ototoxicity: Effects, Mechanisms and Protection Strategies. *Toxics*, 3(3), 268-293. <https://doi.org/10.3390/toxics3030268>
11. Cepeda, V., Fuentres, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., & Perez, J. M. (2007). Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(1), 3-18. <https://doi.org/10.2174/187152007779314044>
12. Ciarimboli, G. (2012). Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects. *Scientifica*, 2012, 1-18. <https://doi.org/10.6064/2012/473829>
13. Cohen, S. M., & Lippard, S. J. (2001). Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. In (pp. 93-130). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)67026-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)67026-0)
14. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J., & Reed, E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, 94(2), 703-708. <https://doi.org/10.1172/JCI117388>
15. Daniels, T. R., Bernabeu, E., Rodríguez, J. A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D. A., Holler, E., Ljubimova, J. Y., Helguera, G., & Penichet, M. L. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 291-317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>
16. Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

17. Donahue, B. A., Augot, M., Bellon, S. F., Treiber, D. K., Toney, J. H., Lippard, S. J., & Essigmann, J. M. (1990). Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*, *29*(24), 5872-5880. <https://doi.org/10.1021/bi00476a032>
18. Eastman, A. (1987). Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chemico-Biological Interactions*, *61*(3), 241-248. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(87\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0009-2797(87)90004-4)
19. Efeyan, A., & Serrano, M. (2014). P53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. *Cell Cycle*, *6*(9), 1006-1010. <https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4211>
20. Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C., & Pérez, J. (2003). Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(3), 257-266. <https://doi.org/10.2174/0929867033368484>
21. Fu, Y., Habtemariam, A., Pizarro, A. M., van Rijt, S. H., Healey, D. J., Cooper, P. A., Shnyder, S. D., Clarkson, G. J., & Sadler, P. J. (2010). Organometallic Osmium Arene Complexes with Potent Cancer Cell Cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *53*(22), 8192-8196. <https://doi.org/10.1021/jm100560f>
22. Gately, D. P., & Howell, S. B. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *British Journal of Cancer*, *67*(6), 1171-1176. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.221>
23. Gichumbi, J. M., & Friedrich, H. B. (2018). Half-sandwich complexes of platinum group metals (Ir, Rh, Ru and Os) and some recent biological and catalytic applications. *Journal of Organometallic Chemistry*, *866*, 123-143. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.04.021>
24. Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. -Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M., & Wang, J. Y. J. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, *399*(6738), 806-809. <https://doi.org/10.1038/21690>
25. Hanif, M., Babak, M. V., & Hartinger, C. G. (2014). Development of anticancer agents: wizardry with osmium. *Drug Discovery Today*, *19*(10), 1640-1648. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.016>
26. Hartinger, C. G., Jakupec, M. A., Zorbas-Seifried, S., Groessel, M., Egger, A., Berger, W., Zorbas, H., Dyson, P. J., & Keppler, B. K. (2008). KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent - Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chemistry & Biodiversity*, *5*(10), 2140-2155. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890195>
27. Hearn, J. M., Hughes, G. M., Romero-Canelón, I., Munro, A. F., Rubio-Ruiz, B., Liu, Z., Carragher, N. O., & Sadler, P. J. (2017). Pharmaco-genomic investigations of organo-iridium anticancer complexes reveal novel mechanism of action. *Metallomics*, *10*(1), 93-107. <https://doi.org/10.1039/C7MT00242D>
28. Hearn, J. M., Romero-Canelón, I., Munro, A. F., Fu, Y., Pizarro, A. M., Garnett, M. J., McDermott, U., Carragher, N. O., & Sadler, P. J. (2015). Potent organo-osmium compound shifts metabolism in epithelial ovarian cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(29), E3800-E3805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500925112>
29. Holzer, A. K., Manorek, G. H., & Howell, S. B. (2006). Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Molecular Pharmacology*, *70*(4), 1390-1394. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022624>
30. Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, *420*(1), 25-27. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01480-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01480-4)
31. Huang, W. -Q., Wang, C. -X., Liu, T., Li, Z. -X., Pan, C., Chen, Y. -Z., Lian, X., Man, W. -L., & Ni, W. -X. (2020). A cytotoxic nitrido-osmium(vi) complex induces caspase-mediated apoptosis in HepG2 cancer cells. *Dalton Transactions*, *49*(47), 17173-17182. <https://doi.org/10.1039/D0DT02715D>

32. Chang, I. -Y., Kim, M. -H., Kim, H. B., Lee, D. Y., Kim, S. -H., Kim, H. -Y., & You, H. J. (2005). Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1), 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.008>
33. Chatterjee, S., Kundu, S., Bhattacharyya, A., Hartinger, C. G., & Dyson, P. J. (2008). The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(7), 1149-1155. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0400-9>
34. Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), 2467-2498. <https://doi.org/10.1021/cr980421n>
35. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., & Lippard, S. J. (2015). Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 373(2037). <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0185>
36. Kanat, O., Ertas, H., & Caner, B. (2017). Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(4). <https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i4.329>
37. Kašpárková, J., Vojtišková, M., Natile, G., & Brabec, V. (2008). Unique Properties of DNA Interstrand Cross-Links of Antitumor Oxaliplatin and the Effect of Chirality of the Carrier Ligand. *Chemistry - A European Journal*, 14(4), 1330-1341. <https://doi.org/10.1002/chem.200701352>
38. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
39. Koepsell, H., Lips, K., & Volk, C. (2007). Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research*, 24(7), 1227-1251. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9254-z>
40. Kong, D., Guo, L., Tian, M., Zhang, S., Tian, Z., Yang, H., Tian, Y., & Liu, Z. (2019). Lysosome-targeted potent half-sandwich iridium(III) α -diimine antitumor complexes. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/aoc.4633>
41. Kostova, I. (2006). Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 13(9), 1085-1107. <https://doi.org/10.2174/092986706776360941>
42. Kuwahara, D. (2000). Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters*, 148(1), 65-71. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00315-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00315-8)
43. Lambert, I., & Sørensen, B. (2018). Facilitating the Cellular Accumulation of Pt-Based Chemotherapeutic Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082249>
44. Liu, Z., Habtemariam, A., Pizarro, A. M., Fletcher, S. A., Kisova, A., Vrana, O., Salassa, L., Bruijninx, P. C. A., Clarkson, G. J., Brabec, V., & Sadler, P. J. (2011). Organometallic Half-Sandwich Iridium Anticancer Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(8), 3011-3026. <https://doi.org/10.1021/jm2000932>
45. Liu, Z., & Sadler, P. J. (2014). Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 47(4), 1174-1185. <https://doi.org/10.1021/ar400266c>
46. Ma, D. -L., Wu, C., Wu, K. -J., & Leung, C. -H. (2019). Iridium(III) Complexes Targeting Apoptotic Cell Death in Cancer Cells. *Molecules*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152739>
47. Mansy, S., Rosenberg, B., & Thomson, A. J. (1973). Binding of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to nucleosides.i. Location of the binding sites. *Journal of the American Chemical Society*, 95(5), 1633-1640. <https://doi.org/10.1021/ja00786a045>
48. Marechal, A., & Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a012716-a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>

49. Miller, S. E., & House, D. A. (1989). The hydrolysis products of cis-diamminedichloroplatinum(II). I. The kinetics of formation and anation of the cis-diammine(aqua)chloroplatinum(II) cation in acidic aqueous solution. *Inorganica Chimica Acta*, 161(1), 131-137. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)90125-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)90125-7)
50. Mokesch, S., Schwarz, D., Hejl, M., Klose, M. H. M., Roller, A., Jakupec, M. A., Kandioller, W., & Keppler, B. K. (2019). Fine-Tuning the Activation Mode of an 1,3-Indandione-Based Ruthenium(II)-Cymene Half-Sandwich Complex by Variation of Its Leaving Group. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/molecules24132373>
51. Moon, H. H. (2011). Prediction of nephrotoxicity induced by cisplatin combination chemotherapy in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*, 17(30). <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i30.3510>
52. Nabiyeva, T., Marschner, C., & Blom, B. (2020). Synthesis, structure and anti-cancer activity of osmium complexes bearing π -bound arene substituents and phosphane Co-Ligands: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112483>
53. Nies, A. T., Damme, K., Kruck, S., Schaeffeler, E., & Schwab, M. (2016). Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. *Archives of Toxicology*, 90(7), 1555-1584. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1728-5>
54. Novohradsky, V., Zerzankova, L., Stepankova, J., Kisova, A., Kosthunova, H., Liu, Z., Sadler, P. J., Kasparkova, J., & Brabec, V. (2014). A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. *Metallomics*, 6(8), 1491-1501. <https://doi.org/10.1039/C4MT00112E>
55. Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19), 6645-6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>
56. Peacock, A. F. A., Parsons, S., & Sadler, P. J. (2007). Tuning the Hydrolytic Aqueous Chemistry of Osmium Arene Complexes with N,O-Chelating Ligands to Achieve Cancer Cell Cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society*, 129(11), 3348-3357. <https://doi.org/10.1021/ja068335p>
57. Pichler, V., Göschl, S., Schreiber-Brynzak, E., Jakupec, M. A., Galanski, M., & Keppler, B. K. (2015). Influence of reducing agents on the cytotoxic activity of platinum(IV) complexes: induction of G2/M arrest, apoptosis and oxidative stress in A2780 and cisplatin resistant A2780cis cell lines. *Metallomics*, 7(7), 1078-1090. <https://doi.org/10.1039/C5MT00116>
58. Persons D. L., Yazlovitskaya E. M., Cui W., Pelling J. C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5, 1007–1014
59. Pil, P., & Lippard, S. (1992). Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science*, 256(5054), 234-237. <https://doi.org/10.1126/science.1566071>
60. Rademaker-Lakhai, J. M., van den Bongard, D., Pluim, D., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2004). A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium- trans- DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3717-3727. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>
61. Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, 9(10), 1053-1071. <https://doi.org/10.1023/A:1008213732429>
62. Rausch, M., Dyson, P. J., & Nowak-Sliwinska, P. (2019). Recent Considerations in the Application of RAPTA-C for Cancer Treatment and Perspectives for Its Combination with Immunotherapies. *Advanced Therapeutics*, 2(9). <https://doi.org/10.1002/adtp.201900042>
63. Reeves, R., & Adair, J. E. (2005). Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair*, 4(8), 926-938. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.010>

64. Rice, J. A., Crothers, D. M., Pinto, A. L., & Lippard, S. J. (1988). The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by approximately equal to 40 degrees toward the major groove. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(12), 4158-4161. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4158>
65. Romero-Canelón, I., Mos, M., & Sadler, P. J. (2015). Enhancement of Selectivity of an Organometallic Anticancer Agent by Redox Modulation. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(19), 7874-7880. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00655>
66. Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, *205*(4972), 698-699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
67. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. E., & Mansour, V. H. (1969). Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, *222*(5191), 385-386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>
68. Sherman, S. E., & Lippard, S. J. (1987). Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chemical Reviews*, *87*(5), 1153-1181. <https://doi.org/10.1021/cr00081a013>
69. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, *22*(47), 7265-7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>
70. Sorenson, C. M., Barry, M. A., & Eastman, A. (1990). Analysis of Events Associated With Cell Cycle Arrest at G2 Phase and Cell Death Induced by Cisplatin. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *82*(9), 749-755. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.9.749>
71. Sorenson, C. M., & Eastman, A. (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer research*, *48*(16), 4484-4488.
72. Suntharalingam, K., Johnstone, T. C., Bruno, P. M., Lin, W., Hemann, M. T., & Lippard, S. J. (2013). Bidentate Ligands on Osmium(VI) Nitrido Complexes Control Intracellular Targeting and Cell Death Pathways. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(38), 14060-14063. <https://doi.org/10.1021/ja4075375>
73. Süß-Fink, G. (2009). Areneruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans*, *39*(7), 1673-1688. <https://doi.org/10.1039/B916860P>
74. Štarha, P., Trávníček, Z., Herchel, R., Jewula, P., & Dvořák, Z. (2018). A potential method to improve the in vitro cytotoxicity of half-sandwich Os(II) complexes against A2780 cells. *Dalton Transactions*, *47*(16), 5714-5724. <https://doi.org/10.1039/C8DT00193F>
75. Tanaka, H., Ishikawa, E., Teshima, S., & Shimizu, E. (1986). Histopathological Study of Human Cisplatin Nephropathy. *Toxicologic Pathology*, *14*(2), 247-257. <https://doi.org/10.1177/019262338601400215>
76. Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Kamiya, T., Kataoka, H., Sakamuro, D., & Joh, T. (2012). Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *International Journal of Surgical Oncology*, *2012*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/862879>
77. Vacca, A., Bruno, M., Boccarelli, A., Coluccia, M., Ribatti, D., Bergamo, A., Garbisa, S., Sartor, L., & Sava, G. (2002). Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *British Journal of Cancer*, *86*(6), 993-998. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600176>
78. van der Vijgh, W. J. F. (1991). Clinical Pharmacokinetics of Carboplatin. *Clinical Pharmacokinetics*, *21*(4), 242-261. <https://doi.org/10.2165/00003088-199121040-00002>
79. van Rijt, S. H., Peacock, A. F. A., Johnstone, R. D. L., Parsons, S., & Sadler, P. J. (2009). Organometallic Osmium(II) Arene Anticancer Complexes Containing Picolinate Derivatives. *Inorganic Chemistry*, *48*(4), 1753-1762. <https://doi.org/10.1021/ic8020222>
80. Venugopal, R., & Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(25), 14960-14965. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14960>
81. Weiss, R. B., & Christian, M. C. (1993). New Cisplatin Analogues in Development. *Drugs*, *46*(3), 360-377. <https://doi.org/10.2165/00003495-199346030-00003>

82. Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35). <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>
83. Yeh, P. Y., Chuang, S. -E., Yeh, K. -H., Song, Y. C., Ea, C. -K., & Cheng, A. -L. (2002). Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NFκB activation. *Biochemical Pharmacology*, 63(8), 1423-1430. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)00908-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)00908-5)
84. Zhang, H., & Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9(10), 1773-1781. <https://doi.org/10.7150/jca.24577>
85. Zhang, L. -X., Gu, Y. -Y., Wang, Y. -J., Bai, L., Du, F., Zhang, W. -Y., He, M., Liu, Y. -J., & Chen, Y. -Z. (2019). Design, Synthesis, and Anticancer Effect Studies of Iridium(III) Polypyridyl Complexes against SGC-7901 Cells. *Molecules*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/molecules24173129>
86. Zhang, P., & Huang, H. (2018). Future potential of osmium complexes as anticancer drug candidates, photosensitizers and organelle-targeted probes. *Dalton Transactions*, 47(42), 14841-14854. <https://doi.org/10.1039/C8DT03432J>
87. Zhang, W. -Y., Banerjee, S., Hughes, G. M., Bridgewater, H. E., Song, J. -I., Breeze, B. G., Clarkson, G. J., Coverdale, J. P. C., Sanchez-Cano, C., Ponte, F., Sicilia, E., & Sadler, P. J. (2020). Ligand-centred redox activation of inert organoiridium anticancer catalysts. *Chemical Science*, 11(21), 5466-5480. <https://doi.org/10.1039/D0SC00897D>