

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Cytotoxicita nových palladiových a platinových  
komplexů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Viktorie Růžičková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Viktorie Růžičková
Název práce	Cytotoxicita nových palladiových a platinových komplexů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Poláková Ph.D.
Rok obhajoby	2022

### Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá testováním cytotoxicity nových potencionálních léčiv proti rakovině. Konkrétně byly testovány nové komplexy palladia a platiny ( $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$  a  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ ), které nám byly poskytnuty panem Dr. Stamatatosem z Univerzity Patras v Řecku.

Teoretická část práce představuje poznatky o vzniku a rozvoji nádorových onemocnění, jejich léčbu platinovými sloučeninami – zejména cisplatinou. Dále je popsána problematika léčby cisplatinou, konkrétně nežádoucí účinky tohoto léčiva na organismus a také rezistence buněk vůči cisplatině. Jsou také uvedeny další možné alternativy léčiv založených na bázi kovu podle aktuálních vědeckých poznatků.

V experimentální části jsou nejdříve popsány chemické vlastnosti testovaných komplexů platiny a palladia a také tři buněčné linie, se kterými byly látky inkubovány (Cal27, HaCat, HeLa). Následně byla měřena viabilita buněk po inkubaci s různými koncentracemi komplexu palladia, komplexu platiny, ligandu obou komplexů a běžně používaným cytostatikem cisplatinou.

Viabilita buněk byla studována pomocí MTT testu. U třech buněčných linií byla pozorována různá odpověď na dané látky. Z výsledků vyplývá, že cytotoxicita testovaných sloučenin byla úměrná použité koncentraci dané látky a byla zaznamenána mírně odlišná citlivost buněk na dané látky v závislosti na typu buněčné linie. Dále byla pozorována viabilita na fluorescenčním optickém mikroskopu, a to použitím kalceinu a propidium jodidu. Na závěr experimentální části byla provedena analýza buněčného cyklu všech tří typů buněk.

Tato práce přináší nové poznatky v podobě testování nových nadějných léčiv na bázi palladia a platiny, jejichž účinnost na zdravé a nádorové linie je přímo porovnávána s komerčním cytostatikem cisplatinou.

Klíčová slova	cisplatina, rakovina, palladiové a platinové komplexy, cytotoxicita
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's name and surname	Viktorie Růžičková
Title of thesis	Cytotoxicity of new palladium a platinum complexes
Type of thesis	Bachelor
Department	Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
Supervisor	Mgr. Kateřina Poláková Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

The bachelor thesis deals with cytotoxicity testing of new potential anticancer drugs. Specifically, the new palladium and platinum complexes ( $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$  and  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ ), provided to us by Dr. Stamatatos from the University of Patras in Greece were tested.

Theoretical part of the work presents knowledge about the origin and development of cancer diseases, their treatment with platinum compounds – especially cisplatin. Furthermore, problems of cisplatin treatment are described, specifically the side effects of this drug on the organism and also resistance of cells to cisplatin. Other possible alternatives to metal-based drugs based on current scientific knowledge are also mentioned.

Experimental part describes chemical properties of tested platinum and palladium complexes as well as three cell lines the cytostatic substances were incubated (Cal27, HaCat, HeLa) with. Subsequently, cell viability was measured after incubation with various concentrations of palladium complex, platinum complex, ligand of both complexes and the commonly used cytostatic cisplatin.

Cell viability was studied using the MTT assay. Different responses to the given substances were observed in all three cell lines. The results show that the cytotoxicity of tested compounds were proportional to their concentration. Each cell line revealed a slight different sensitivity to studied substances. Furthermore, viability was also observed on fluorescence optical microscope using fluorescent dyes. Cell cycle analysis of all cell types was also performed.

This work brings new findings in the form of testing new promising drugs based on palladium and platinum, whose effectiveness on healthy and tumor cell lines is directly compared with the commercial cytostatic cisplatin.

Keywords	cisplatin, cancer, palladium and palladium complexes, cytotoxicity
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce Mgr. Kateřině Polákové Ph.D za odborné vedení bakalářské práce, za čas a pomoc při zpracování práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janu Belzovi za rady a pomoc v experimentální části bakalářské práce.

Na dálku bych také ráda poděkovala panu Dr. Theocharisovi Stamatatosovi za spolupráci a zaslání nově syntetizovaných vzorků, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Teoretická část.....	14
2.1	Rakovina.....	14
2.1.1	Karcinogeneze.....	14
2.1.2	Znaky nádorových buněk .....	15
2.1.3	Klasifikace nádorů.....	16
2.1.4	Buněčný cyklus buňky a rakovina .....	16
2.2	Cisplatina .....	17
2.2.1	Objev cisplatiny.....	17
2.2.2	Syntéza cisplatiny .....	18
2.2.3	Vlastnosti cisplatiny.....	18
2.2.4	Další platinová cytostatika.....	18
2.2.5	Mechanismus účinku cisplatiny .....	19
2.2.6	Léčba karcinomu plic cisplatinou.....	20
2.2.7	Léčba karcinomu vaječníků cisplatinou .....	21
2.2.8	Léčba karcinomu varlat cisplatinou .....	21
2.2.9	Léčba dalších nádorových onemocnění cisplatinou.....	21
2.3	Problémy léků na bázi cisplatiny .....	21
2.3.1	Nežádoucí účinky cisplatiny .....	21
2.3.2	Nefrotoxicita.....	22
2.3.3	Ototoxicita.....	22
2.3.4	Neurotoxicita.....	22
2.3.5	Nevolnosti.....	22
2.3.6	Rezistence k cisplatině.....	23
2.4	Výzkum nových léčiv pro léčbu nádorových onemocnění.....	24
2.4.1	Camplatina.....	24
2.4.2	Fotosenzitivní sloučeniny .....	25
2.4.3	Distribuce léčiv pomocí nanočástic .....	25

2.4.4	Doručování léčiv pomocí lipozomů .....	26
2.4.5	Nové sloučeniny na bázi kovu .....	26
2.5	Motivace práce .....	27
3	Materiál a metody .....	29
3.1	Materiály .....	29
3.1.1	Přístrojové vybavení .....	29
3.1.2	Chemikálie a použité kity .....	29
3.1.3	Použitá média .....	29
3.1.4	Příprava použitých rotoků .....	29
3.1.5	Testované sloučeniny .....	29
3.1.6	Biologický materiál .....	32
3.2	Metody .....	35
3.2.1	Atomová absorpční spektroskopie .....	35
3.2.2	Optická mikroskopie .....	36
3.2.3	MTT test .....	36
3.2.4	Průtoková cytometrie v analýze buněčného cyklu .....	40
3.2.5	Barvení buněk kalceinem a propidium jodidem .....	42
4	Výsledky a diskuze .....	44
4.1	Měření viability buněk HaCat .....	44
4.2	Značení buněk HaCat fluorescenčními barvivy .....	45
4.3	Měření viability buněk Cal27 .....	48
4.4	Značení buněk Cal27 fluorescenčními barvivy .....	49
4.5	Měření viability buněk HeLa .....	51
4.6	Značení buněk HeLa fluorescenčními barvivy .....	52
4.7	Zhodnocení výsledků měření viability buněk .....	53
4.8	Měření buněčného cyklu kontrolních buněk .....	54
5	Závěr .....	55
6	Použitá literatura .....	56

## Seznam zkratek

MTT – 3 - [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyl tetrazolium bromid  
DNA - Deoxyribonukleová kyselina  
Rb - Retinoblastomový gen  
TP53 - Tumor protein p53  
ROS - Reaktivní formy kyslíku  
Cisplatina - Cis-diamminchloroplatnatý komplex  
FDA - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)  
Karboplatina - cis-diammin[1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)-O,O']platnatý komplex  
Oxaliplatina - 1,2 diammincyklohexan - (oxaláto)platnatý komplex  
CTR1 – Protein pro transport mědi  
GSH - Glutathion ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin)  
GTP - Guanosintrifosfát  
RNA - Ribonukleová kyselina  
SCLC – Malobuněčný bronchogenní karcinom  
NSCLC – Nemalobuněčný bronchogenní karcinom  
TMEM205 - Transmembránový protein 205  
MRP - Proteiny asociované s multirezistencí  
NER - Nukleotidová excisní oprava  
MMR - Proteiny mismatch repair systému  
UVA - Ultrafialové záření A  
CT DNA - DNA telecího brzlíku  
EDTA - Kyselina ethylendiamintetraoctová ( $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$ )  
PBS - Fosfátový pufr  
DMSO - Dimethylsulfoxid  
DMF - Dimethylformamid  
DMEM - Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium  
FBS – Fetální bovinní sérum  
PEN/STR – penicilín/streptomycin  
Komplex Pd -  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$   
Komplex Pt -  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$   
(qaoH) - ligand chinolin 2-aldoxim  
IČ - infračervená spektrometrie  
NMR - Nukleární magnetická rezonance  
UV/VIS - Ultrafialovo-viditelná spektroskopie  
ESI – MS - Elektrosprejová ionizace  
Raman - Ramanova spektroskopie



HPV - Lidský papilomavirus

AAS - Atomová absorpční spektroskopie

Kalcein AM - kalcein acetoxymethyl ester

PI – propidium jodid

# 1 Úvod

Rakovina je nemocí, na kterou umírají každoročně miliony lidí po celém světě. Po kardiovaskulárních onemocněních je to celosvětově druhá nejčastější příčina úmrtí. (Massoud a kol. 2021) Počátky tohoto onemocnění se velmi složitě rozpoznávají, u mnoha typů rakoviny neexistují spolehlivé symptomy, podle kterých by se dala rozeznat od jiných onemocnění, proto spousta pacientů zjistí svou diagnózu často pozdě, až při výskytu metastáz a v pokročilejším stádiu nádoru. V pozdějších stádiích se nádorová onemocnění velmi složitě léčí a mnohdy jde pacientovi „pouze“ prodloužit život o pár měsíců či, při větším štěstí, let.

Ve zdravém těle se buňky dělí podle potřeb těla, organismus je díky tomuto principu v rovnováze. V případě vzniku rakovinné buňky je tato rovnováha narušena, buňky se začnou nekontrolovatelně dělit a následně dochází ke tvorbě nádorů. (Weinberg 1996)

Pro léčbu rakoviny se v současnosti nejčastěji používají cytostatika v rámci chemoterapie, kdy je cílem potlačit další růst nádoru. Chemoterapeutika cílí na buněčné struktury, po jejichž destrukci již buňka nemůže dále fungovat. Chemoterapeutika potlačují růst nádorových buněk a zastavují jejich dělení, různé typy chemoterapeutik působí na buňky na základě různých mechanismů účinku. U některých léčivých preparátů není ještě mechanismus ani detailně prozkoumán. (Scattolin a kol. 2021)

Ačkoliv existují léčivé přípravky pro léčbu rakoviny, tak mnoho z nich způsobuje širokou škálu nežádoucích účinků a na některé druhy nádorů léky nepůsobí. Velkou překážkou v léčbě může být rezistence buněk k některým cytostatikům, například k cisplatině (obr. 1). Ačkoliv je cisplatina nejpoužívanějším cytostatikem pro léčbu nádorů, tak nás v jejím použití limituje jednak rezistence buněk ke sloučenině a také některé vážné nežádoucí účinky, mezi které patří například nefrotoxicita, vypadávání vlasů či silné nevolnosti.

Vědci se snaží testovat nové chemické sloučeniny s potencionálním protinádorovým účinkem. Jednou z nejdůležitějších vlastností potencionálních léků na nádorová onemocnění je, aby sloučenina působila co nejvíce toxicky na rakovinné buňky a zdravé buňky přežily s co nejmenším poškozením. Cílem je, aby lék působil pouze na nádor a ostatní tělesné orgány zůstaly po léčbě bez poškození. Tento cíl je pro vědce jednou z největších výzev, protože je známa široká škála přípravků a látek toxických pro buňky, ale je velmi těžké najít sloučeninu, která selektivně působila pouze na nádorové buňky. Mnoho chemoterapeutik používaných v současnosti k léčbě způsobuje u pacientů další závažné nežádoucí účinky, které snižují kvalitu jejich života. Nové preparáty by měly způsobovat co nejméně nežádoucích účinků.

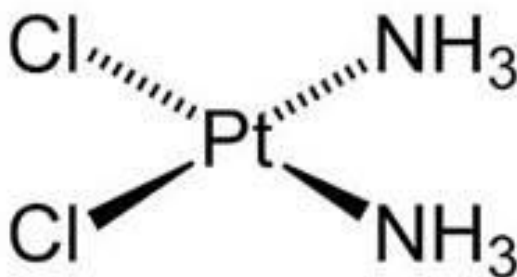
V současnosti zkouší vědecké skupiny z celého světa testovat mnoho nových sloučenin, mezi nimi i sloučeniny palladia. Testují se struktury podobné léku cisplatině, ale centrální atom platiny je nahrazen jiným kovem, například mědí, zlatem či palladiem.

V této bakalářské práci byly testovány nové komplexy palladia a platiny na zdravých (normálních) buněčných liniích a také na několika nádorových buněčných liniích. Sloučeniny palladia a platiny  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  (obr. 2),  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  (obr. 3) získala naše laboratoř od vědecké skupiny pana Dr. Theocharise C. Stamatatose z Univerzity Patras v Řecku. Kolegové z Řecka tyto nové sloučeniny připravili, charakterizovali jejich chemické a fyzikální vlastnosti a následně je zaslali do České republiky, kde byla v laboratoři v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů v Olomouci otestována jejich cytotoxicita na vybraných buněčných liniích. Sloučeniny byly rozpuštěny ve vodě a následně byly připraveny koncentrační řady roztoků, které se přidávaly k testovaným buňkám. Účinek nově testované sloučeniny byl porovnán s běžně používaným cytostatikem cisplatinou.

Zároveň Dr. Stamatatos poskytl pro tuto práci také chemické struktury sloučenin a jejich fyzikální a chemické charakteristiky.

Účinek testovaných chemických sloučenin na buňky byl testován pomocí MTT testu, podle kterého lze rozpoznat aktivitu mitochondriálních enzymů po aplikaci dané látky a lze tedy vypočítat, jaké procento buněk působení zkoumané látky o dané koncentraci přežilo. Tato data byla následně vyhodnocena a zpracována do formy grafů, kde byly porovnány různé koncentrace testovaných sloučenin.

Dále byla sledována viabilita buněk fluorescenčním značením kalceinem a propidium jodidem pomocí fluorescenčního optického mikroskopu. A na závěr byla provedena analýza buněčného cyklu kontrolních neznačených buněk.

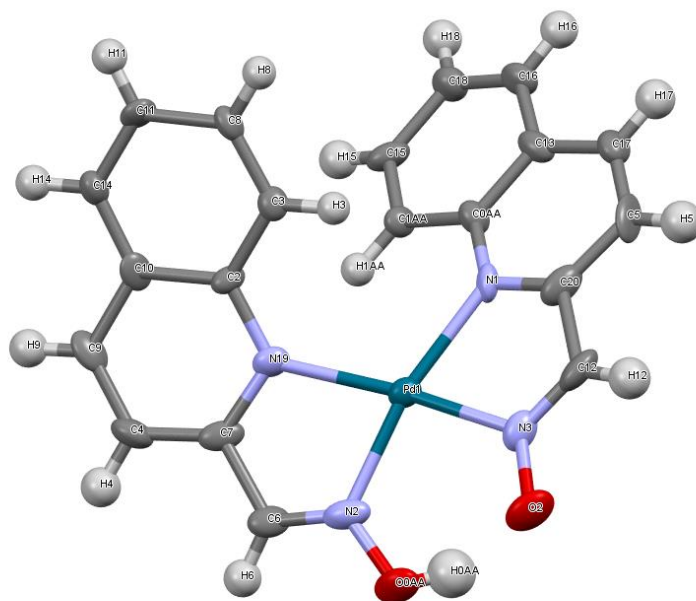


Obr. 1 – Chemický vzorec cisplatiny  $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$

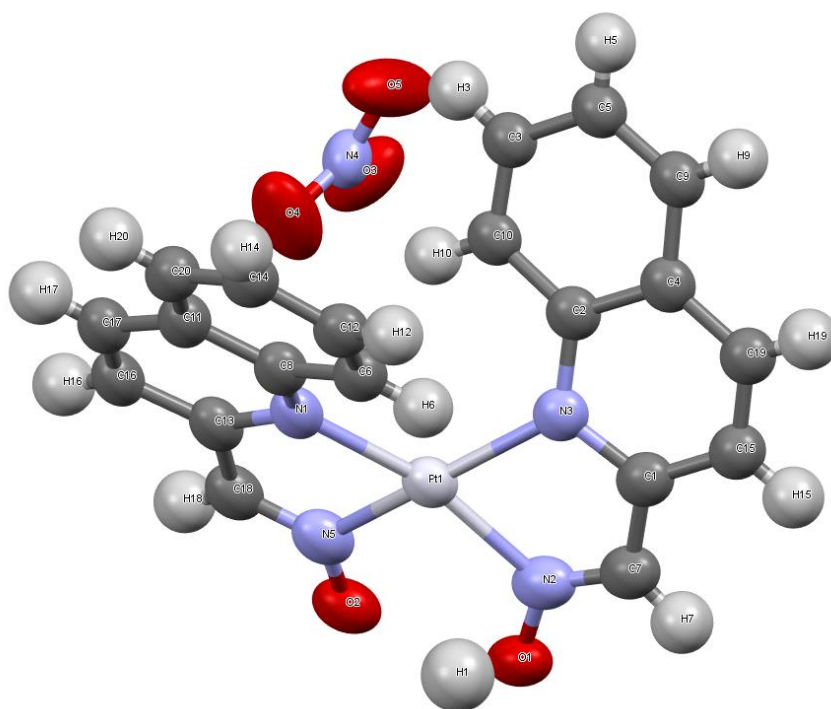
Cíle bakalářské práce:

- Zpracování literární rešerše na téma palladiové a platinové komplexy a jejich protinádorové účinky a srovnání se standardní chemoterapeutickou léčbou pomocí cisplatiny a dále využití MTT testu pro studium cytotoxicity protinádorových léčiv

- Stanovení cytotoxicity nových potencionálně účinných komplexů palladia a platiny na nádorové a normální (zdravé) buněčné linie pomocí MTT testu
  - Srovnání cytotoxicity nových sloučenin palladia a platiny na buněčné linie s běžně používaným lékem na rakovinu cisplatinou
  - Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie na buňkách vystavených působení testované látky



Obr. 2 – Nově syntetizovaná sloučenina  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ . Šedou barvou je zvýrazněna struktura ligandu. Ve středu je tyrkysově zvýrazněn atom palladia.



Obr. 3 – Nově syntetizovaná sloučenina  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ . Šedou barvou je zvýrazněna struktura ligandu. Ve středu je stříbrně zvýrazněn atom platiny.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Rakovina

Nádorová onemocnění jsou považována za druhou nejčastější příčinu úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách. (Massoud a kol. 2021) Způsobí až 10 milionů úmrtí ročně po celém světě. Asi polovina pacientů s nádorovým onemocněním je léčena pomocí cytostatik, z nichž je většina založena na sloučeninách platiny. (Scattolin a kol., 2021)

Podle dat převzatých z článku „Cancer incidence in Czech republic“ od L. Pehalové a kol. je v České republice rakovina druhou nejčastější příčinou úmrtí po kardiovaskulárních onemocněních. Jenom v České republice v roce 2018 přibýlo 87 361 nových případů rakoviny, 27 699 lidí v témže roce rakovině v Česku podlehl. Česká republika patří k zemím s největší zátěží rakoviny v Evropě i ve světě. Výskyt rakoviny ledvin je v Česku druhý nejvyšší na světě a výskyt rakoviny slinivky břišní je pátý nejvyšší na světě.

U mužů byly v roce 2018 nejčastějším zhoubným nádorem kolorektální karcinom a rakovina plic. U žen byly ve stejném roce nejčastějšími zhoubnými nádory rakovina prsu, kolorektální karcinom a rakovina plic. (Pehalova a kol. 2021)

Rakovina je definována jako nekontrolovatelný růst abnormálních buněk kdekoli v těle. Obecně se přijímá teorie, podle které se rakovina může rozvinout, pokud přirozený mechanismus těla přestane fungovat. (Ghosh 2019)

#### 2.1.1 Karcinogeneze

Podle Světové zdravotnické organizace se rakovina může rozvinout v důsledku interakce mezi genetickými faktory člověka a třemi kategoriemi vnějších činitelů, řadí se sem fyzikální karcinogeny (ultrafialové a ionizující záření), chemické karcinogeny (azbest, arsen a další) a biologické karcinogeny (infekce způsobená určitými viry, bakteriemi nebo parazity). (Ghosh 2019)

Nádorem, tumorem, neoplazmou či novotvarem nazýváme abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která v tomto organismu nemá fyziologickou funkci a roste nekontrolovatelným způsobem. (Weinberg 1996)

Naše tělo je složeno zhruba z 30 bilionů buněk, které za normálních okolností fungují na principu kodominance a vzájemně kontrolují svoje dělení. Normální buňky se dělí pouze tehdy, když k tomu dostanou pokyn od buněk ve svém okolí. Tato neustálá spolupráce mezi buňkami zajišťuje, že si každá tkáň udržuje přiměřenou velikost vůči zbytku těla. Rakovinné buňky však mají toto schéma narušené a vyvinuly si vlastní systém reprodukce. (Weinberg 1996)

Rozvoj nádorového onemocnění lze rozdělit do tří fází – iniciace, promoce a progrese. (Petruželka a Konopásek 2003, 25)

První fází je iniciace. (Petruželka a Konopásek 2003, 25) Nádorové buňky pocházejí ze společné buňky, která, již většinou desítky let před vytvořením nádoru, zahájí chybnou reprodukci. Maligní transformace buňky nastává akumulací více mutací a epigenetických změn ve specifických genech v DNA buňky. (Weinberg 1996)

Nádor se začne tvořit z jedné zmutované buňky nacházející se mezi normálními buňkami. Tato zmutovaná buňka se dělí, i když by za normálních okolností měla zůstat v klidové fázi. Pozměněná buňka a její dceřiné buňky vypadají jako normální buňky, ale nekontrolovatelně se dělí. Toto velké zmožení buněk se nazývá hyperplazie. Po nějaké době se u jedné z buněk může vyskytnout další mutace, díky které buňka dále ztrácí kontrolu nad dělením. Kromě nadměrného dělení se potomci zmutované buňky liší i tvarem, o takové tkáni pak lze říci, že vykazuje dysplazii a rozvoj rakoviny se dostal do fáze promoce. (Weinberg 1996; Petruželka a Konopásek 2003, 25)

Ve třetí fázi rozvoje nádorového onemocnění (progrese), přibývá v buňkách stále více mutací, které přispívají k zhoubnému neregulovatelnému chování transformovaných buněk. (Petruželka a Konopásek 2003, 25) Nové fenotypy buněk do populace vnáší nižší rychlost apoptózy, vyšší rychlost dělení buněk, nižší metabolické požadavky a další vlastnosti podporující růst nádoru. (He a kol. 2007)

Abnormální buňky stále více vykazují nekontrolovatelný růst a pozměněný vzhled. Pokud nádor neprorostl hranicí mezi dvěma tkáněmi, pak je nazýván *in situ*. V tomto stavu může nádor nadále setrávat nepozměněn, avšak opět se zde můžou vyskytnout další mutace v buňkách. Pokud mutace v buňkách dovolí nádoru proniknout do okolní tkáně a nádorové buňky pronikají do krve, pak je nádor považován za zhoubný. Migrující nádorové buňky mohou vytvořit novotvary (metastázy) na dalších místech v těle. (Weinberg 1996)

### **2.1.2 Znaky nádorových buněk**

U nádorových buněk pozorujeme soubor typických vlastností. Typickými znaky jsou ztráta diferenciace, buňky tedy nedozrávají do diferenciovaného stavu. Autonomní chování nádorových buněk se projevuje neregulovaným dělením. Typickým znakem je rovněž invazivita nádorové populace, ztráta inhibice kontaktem buňka-buňka a také tvorba metastáz. Procesy v buňce vedoucí k senescenci a apoptóze jsou též narušeny. (Petruželka a Konopásek 2003, 23-24; He a kol. 2007)

U nádorových buněk pozorujeme Warburgův efekt. Nádorové buňky přijímají více glukózy než zdravé buňky. (Maccio a Madeddu 2013) Produktem metabolismu glukózy

je laktát, který je produkován i za přítomnosti kyslíku a funkčních mitochondrií. Důvodem tohoto mechanismu je zřejmě nižší produkce ROS a tím pádem ochrana buňky před apoptózou. (Liberti a Locasale 2016)

### **2.1.3 Klasifikace nádorů**

Nádory dělíme podle schopnosti infiltrace do jiné tkáně na benigní a maligní. Benigní (nezhoubné nádory) zůstávají v místě svého vzniku. Maligní (zhoubné) nádory naopak pronikají do jiných tkání a mohou tvořit metastázy i ve vzdálených částech lidského těla. (Petruželka a Konopásek 2003, 9-10)

Podle původu se nádory dělí na karcinomy, které vznikají z epiteliálních buněk a jsou nejčastějším typem nádoru. Dále rozpoznáváme sarkomy vznikající z pojivových tkání a leukemie vznikající z hematopoetických buněk. (Petruželka a Konopásek 2003, 9-10)

### **2.1.4 Buněčný cyklus buňky a rakovina**

Buňky prochází pravidelným cyklem růstu a dělení, který nazýváme buněčný cyklus.

Buněčné dělení je proces regulovaný evolučně konzervovanými mechanismy pro zajištění produkce dvou identických buněk se shodnou genetickou informací. Kontrolní body buněčného cyklu („checkpoints“) jsou mechanismy, které zabraňují šíření genetických mutací a chyb z buňky na buňku při buněčném dělení. Kontrolní body mohou buď pozastavit buněčný cyklus, nebo při velkém poškození vyvolají buněčnou smrt. Některé mutace spojené s rakovinou, které narušují kontrolu buněčného cyklu, umožňují další dělení buněk především narušením schopnosti buněk opustit buněčný cyklus, proto se mutace nadále šíří do dalších generací buněk. (Matthews, Bertoli a Bruin 2022)

Buněčné dělení lze rozdělit na dvě hlavní části. Nejprve se musí replikovat genomická DNA buňky a následně je tento materiál rovnoměrně rozdělen mezi dvě nové buňky. Předpokládá se, že při buněčném cyklu u rakovinných buněk musí být většina, ne-li všechny, kontrolní body vadné, aby se rakovinné buňky mohly dělit dál. (Matthews, Bertoli a Bruin 2022)

Mitotické dělení je rozděleno do dvou odlišných fází – interfáze a M fáze. V rámci interfáze buněčného cyklu probíhá S fáze, při které dochází k zahájení replikace DNA, jejímž výsledkem je zdvojená genetická informace buňky. Při M fázi dochází k dělení jádra a buňky. Po dokončení mitózy se buňka přesune do G1 fáze. V této fázi buňka roste a připravuje se na další dělení. Probíhají kontroly a opravy DNA. (Matthews, Bertoli a Bruin 2022)



Před S fází se rozhodují buňky o tom, zda vstoupí do buněčného cyklu nebo setrvají ve fázi G1. Během G1 fáze mohou buňky také vstoupit do G0, neboli klidové fáze. Většina buněk v těle dospělého člověka se již dále nedělí a jsou v klidové fázi. Po dokončení replikace DNA v interfázi, následuje další kontrolní uzel v G2 fázi, kde se rozhoduje o tom, zda buňka vstoupí do procesu mitotického dělení. Po G2 fázi nastává mitóza, která plní dvě hlavní úlohy. Jednak se při ní segreguje duplikovaná DNA do dceřiných buněk a také dochází k rovnoměrnému rozdělení celkového buněčného obsahu na dvě dceřiné buňky (cytokineze). (Matthews, Bertoli a Bruin 2022)

## 2.2 Cisplatina

V dnešní době se určitá nádorová onemocnění (například leukémie, rakovina vaječníků, rakovina varlat, rakovina krku) léčí anorganickými sloučeninami založenými na sloučeninách platiny. (Massoud a kol. 2021; Dasari a Tchounwou 2014)

Nejpoužívanějšími platinovými cytostatiky jsou cisplatina, karboplatina a oxaliplatina. (Massoud a kol. 2021) První generaci léků představuje cisplatina, druhou generaci karboplatina a třetí generaci oxaliplatina. Nejvíce využívaným lékem z výše zmíněných je cisplatina. (Ryvolova a kol. 2013)

Cisplatina (cis-diamminchloroplatnatý komplex) je jednoduchou anorganickou molekulou skládající se pouze z 11 atomů, 6 z nich jsou vodíky. (Brabec a kol. 1990) Centrálním atomem je atom platiny, ke kterému se vážou dva chloridové ligandy a dvě skupiny  $\text{NH}_3$ . (Maccio a Madeddu 2013) Chloridové ligandy cisplatin jsou v krevním řečišti stabilní díky přítomnosti vysoké koncentrace chloridových iontů v krvi, jakmile se sloučenina cisplatin dostane do cytoplasmy buňky s nižší koncentrací chloridů, tak jsou chloridové ligandy nahrazeny molekulou vody nebo hydroxylovými ionty a z cisplatin se stává reaktivní sloučenina. (Maccio a Madeddu 2013; Makovec 2019)

Cisplatina je podávána ve formě nitrožilní infuze Platinol® nebo Platinol®AQ. Podávané roztoky obsahují 3,3 mM cisplatinu (1 mg/ml) a 154 mM chlorid sodný. (Makovec 2019)

Cisplatina je jedním z nejúčinnějších cytostatik na bázi kovu. Celosvětově je cisplatinou léčeno téměř 50 % všech pacientů s rakovinou. (Ghosh 2019)

### 2.2.1 Objev cisplatin

Cisplatinu objevil v roce 1845 Michele Peyrone, ale biologická aktivita této látky nebyla známá až do roku 1965, kdy byla Dr. Barnettem Rosenbergem objevena schopnost této látky inhibovat dělení buněk *Escherichia coli*. (Ghosh 2019; Dasari a Tchounwou 2014)

Sloučenina cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] byla poprvé připravena Michele Peyronem, proto byla po dlouhou dobu nazývána Peyronova sůl. Vlastnost inhibice dělení buněk byla cisplatině připsána až Dr. Barnettem Rosenbergem, který provedl experiment, při němž studoval účinek elektrického pole na růst bakterie *E. coli* za použití platiny jako elektrody a chloridu amonného jako pufru. Během experimentu zjistil, že při působení elektrického pole na *E. coli* tato bakterie dorůstá až 300krát větší velikosti, současně však nedocházelo k dělení buňky. (Ghosh 2019)

Při absenci elektrického pole se buňky začaly opět normálně dělit. Ačkoliv prvotní předpoklad byl, že důvodem blokace buněčného dělení byla přítomnost elektrického pole, nakonec se ukázalo, že buněčné dělení bylo blokováno uvolněnou sloučeninou platiny z elektrody. V roce 1969 Rosenberg dokázal v experimentu na myších, že cisplatina má schopnost inhibovat Sarkom 180 a leukémii L1210. Další testy prokázaly vysokou účinnost léku i na dalších zvířecích nádorech. (Ghosh 2019; Makovec 2019)

V roce 1973 byl prokázán protinádorový účinek cisplatin. (Shen a kol. 2012)

V roce 1978 byla cisplatina schválena americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu rakoviny varlat a vaječníků. (Ghosh 2019; Makovec 2019)

### 2.2.2 Syntéza cisplatin

Nejefektivnější metodu pro syntézu cisplatin poskytl Dhara, v roce 1970 publikoval „Rychlou metodu pro syntézu cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]“. (Ghosh 2019)

### 2.2.3 Vlastnosti cisplatin

Cisplatina je při pokojové teplotě bílá nebo sytě žlutooranžová krystalická látka, lehce rozpustná ve vodě. Molární hmotnost sloučeniny činí 301,1 g/mol. (Dasari a Tchounwou 2014)

### 2.2.4 Další platinová cytostatika

Lékem druhé generace pro léčbu nádorových onemocnění je nazývána karboplatina (cis-diammin[1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)-O,O']platnatý komplex), oproti jejímu předchůdci cisplatině, ubylo při léčbě karboplatinou nežádoucích vedlejších účinků, například pozorujeme sníženou nefrotoxicitu. (Ryvolova a kol. 2013; Dasari a Tchounwou 2014)

Cisplatina i karboplatina mají na organismus toxický a mutagenní efekt. Problémem cisplatin a karboplatin je rezistence některých buněčných linií k těmto látkám. (Ryvolova a kol. 2013)

Třetí generací léků založených na sloučenině platiny je oxaliplatina (1,2-diamminocyclohexan - (oxaláto)platnatý komplex). Na rozdíl od cisplatiny a carboplatiny nebyl tento lék rezistentní k tolika buněčným liniím, také působil méně mutagenně než předchozí dvě generace léků. (Ryvolova a kol. 2013)

Oxaliplatina i carboplatina sice vykazují nižší nefrotoxicitu i ototoxicitu ve srovnání s cisplatinou, avšak jejich účinnost je nižší než u cisplatiny. (Makovec 2019)

## 2.2.5 Mechanismus účinku cisplatiny

Cisplatinu se pacientům podává intravenózně jako sterilní fyziologický roztok. V krevním řečišti je koncentrace chloridu relativně vysoká (přibližně 100 mM). A proto cisplatinu putuje v nezměněné a neutrální podobě celým tělem. Proteiny obsažené v plazmě jako jsou albumin, transferin nebo cystein se mohou vázat k cisplatině, což způsobuje deaktivaci velkého množství cisplatiny. Zbývající cisplatinu může být do buněk transportována pasivní difúzí přes plazmatickou membránu buňky. (Ghosh 2019) Nové studie ukazují, že transportní protein mědi CTR1 by mohl být zodpovědný za příjem cisplatinu buňkou. Do transportu cisplatinu jsou zapojeny také transportéry organických kationtů (OCT, SLC22A). (Makovec 2019)

Oxidační stres je jedním z mechanismů cytotoxicity cisplatinu. Cisplatinu indukují tvorbu oxidačního stresu tím, že vytváří reaktivní formy kyslíku (ROS), například hydroxylové radikály. (Ghosh 2019) Cisplatinu indukují produkci ROS a způsobuje snížení hladiny antioxidantů jako GSH, superoxid dismutáza, kataláza nebo glutathion peroxidáza. (Maccio a Madeddu 2013)

ROS jsou zodpovědné za různé změny v buňce, jako jsou například peroxidace lipidů nebo změny v buněčné signalizaci, tyto změny mohou způsobit poškození DNA a následnou apoptózu buňky. Jedním z hlavních cílů oxidačního stresu a ROS jsou mitochondrie, v nichž může být poškozena funkce dýchacího řetězce buňky. (Ghosh 2019) ROS jsou také důvodem nefrotoxicity a neurotoxicity v důsledku přerušení syntézy antioxidantu GSH. (Maccio a Madeddu 2013)

Dále cisplatinu cílí na mnoho dalších molekul v buňce. V důsledku vazby cisplatinu na guanin je způsoben nedostatek GTP a v buňce je potlačena tvorba mikrotubulů. Další molekulou, na kterou se může vázat cisplatinu, je RNA. (Makovec 2019)

Dalším důvodem cytotoxicity cisplatinu je její působení na plazmatickou membránu buněk. Cisplatinu interaguje s membránovými proteiny, snižuje aktivitu kanálů a transportérů, zvyšuje fluiditu membrány, tyto změny vedou až k aktivaci vnější dráhy apoptózy. (Maccio a Madeddu 2013)

Hlavním cílem cisplatinu je genomická DNA, i když jen velmi malé množství (1 %) cisplatinu v buňce se nakonec váže ke genomické DNA. (Ghosh 2019)

I přes dobré výsledky v léčbě nádorů není zcela znám přesný mechanismus účinku cisplatiny. (Ryvolova a kol. 2013) Mnoho experimentálních výsledků naznačuje, že za cytotoxickým účinkem tohoto léčiva je zodpovědná reakce cisplatiny s bázemi v DNA. Protinádorové sloučeniny platiny vyvolávají v řetězci DNA místní konformační změny, tyto změny nadále znemožňují další replikaci DNA a dělení buňky. (Brabec a kol. 1990; Ghosh 2019)

Hlavním mechanismem protinádorového účinku cisplatiny je interakce léku s purinovými bázemi v DNA buněk a následnou tvorbou DNA aduktů. V případě, že rozsah poškození DNA je příliš velký a není možné ho opravit reparačními mechanismy, dochází k aktivaci několika signálních drah, které vedou až k apoptóze buňky. (Ghosh 2019; Shen a kol. 2012; Galluzzi a kol. 2012) DNA adukty mohou způsobit také zastavení replikace DNA, inhibici transkripce či opravu DNA. (Maccio a Madeddu 2013)

Adukty se tvoří při kovalentní vazbě reaktivních chemických látek s purinovými a pyrimidinovými bázemi v molekulách DNA. (Linhart a Novák 2002) Přesný mechanismus vzniku aduktů však stále není zcela objasněn. (Ryvolova a kol. 2013)

Bylo zjištěno, že 60 - 65 % aduktů se tvoří uvnitř řetězce DNA mezi sousedními bázemi guaninu, 25 - 30 % aduktů se tvoří mezi sousedními bázemi adeninu a guaninu, 5 - 10 % aduktů je typu PTGNG, kde N představuje jakoukoliv ze čtyř DNA bází, 1 - 3 % jsou adukty tvořené mezi dvěma a více vlákny DNA. (Ryvolova a kol. 2013)

Adukty jsou studovány různými metodami. DNA modifikovaná cisplatinou je rozštěpána pomocí enzymů (deoxyribonukleáza I, nukleáza P<sub>1</sub> a alkalická fosfatáza). Produkty jsou dále odděleny pomocí chromatografie a adukty jsou identifikovány různými metodami: např. nukleární magnetickou rezonancí, atomovou absorpční spektrometrií, hmotnostní spektrometrií, nebo atomovou silovou mikroskopií. (Ryvolova a kol. 2013)

### **2.2.6 Léčba karcinomu plic cisplatinou**

Rakovina plic se dělí na dva typy: malobuněčný (SCLC – Small cell lung cancers) a nemalobuněčný bronchogenní karcinom (NSCLC – non-small cell lung cancers). Tyto dva typy se od sebe rozeznávají na základě odlišností v růstu a šíření nádoru. SCLC je nejagresivnější z plicních nádorů a chemoterapie je zde nejúčinnější léčbou. Pacientům je podávána cisplatina a karboplatina. (Ghosh 2019) Pro léčbu NSCLC se v I. a II. stádiu nemoci využívá chirurgického odstranění nádoru a následné chemoterapie. U pacientů ve III. a IV. stádiu rakoviny plic se aplikuje léčba ozařováním v kombinaci s chemoterapií. (Ghosh 2019; Dasari a Tchounwou 2014)

### **2.2.7 Léčba karcinomu vaječníků cisplatinou**

Rakovina vaječníků je léčena nejdříve chirurgickým odstraněním nádoru a následně chemoterapeutickou léčbou. Léčí se kombinovanou chemoterapií platinovým derivátem a taxany. (Dasari a Tchounwou 2014) Rizikem v léčbě rakoviny vaječníků je opakovaný návrat nemoci po ukončení léčby, rezistence k cisplatině se pak výrazně zvyšuje. (Ghosh 2019)

### **2.2.8 Léčba karcinomu varlat cisplatinou**

Existují dva typy nádorů varlat – seminomy a neseminomy. Seminomy se vyskytují u všech věkových kategorií a rostou pomaleji než neseminomy. Cisplatinou se používá při léčbě seminomů. Neseminomy se převážně objevují u mladších mužů a cisplatinou se zde používá v kombinaci s dalšími léky. (Ghosh 2019)

### **2.2.9 Léčba dalších nádorových onemocnění cisplatinou**

Cisplatinou jsou také léčeny nádory žaludku, konečníku, leukémie a další. Cisplatinou je také přínosná v léčbě rakoviny prsu. (Ghosh 2019; Dasari a Tchounwou 2014)

V závislosti na typu a stádiu rakoviny jsou pacienti léčeni různými léčebnými postupy. Pacienti mohou být léčeni buď tradičními terapiemi (jako je chirurgie, chemoterapie nebo radioterapie), další možností je léčba modernějšími metodami jako jsou imunoterapie, hormonální terapie nebo genová terapie. (Ghosh 2019)

## **2.3 Problémy léků na bázi cisplatin**

Hlavními výzvami při léčbě cisplatinou mohou být negativní vedlejší účinky léku a také rezistence organismu k této látce. Důvody rezistence k cisplatině mohou být snížená akumulace léčiva uvnitř rakovinných buněk, inaktivace léčiva glutathionem a metallothioneiny a nebo rychlejší oprava DNA aduktů. (Ghosh 2019; Dasari a Tchounwou 2014)

K minimalizaci vedlejších účinků a rezistence k cisplatině se používá kombinovaná léčba. (Ghosh 2019) Kombinovaná léčba kombinuje v léčbě pacienta s rakovinou dvě a více účinných látek, které spolu působí synergicky. (Mokhtari a kol. 2017)

### **2.3.1 Nežádoucí účinky cisplatin**

Při léčbě cisplatinou se vyskytuje mnoho nežádoucích účinků, mezi které se řadí například anafylaktický šok. Mezi další nežádoucí účinky patří cytopenie, což je pokles počtu určitých buněk pod fyziologickou mez (trombopenie, leukopenie, anémie). (McLendon a Sternard 2021; Massoud a kol. 2021; Makovec 2019)

Cisplatina může být také toxická pro játra, uši, srdce, způsobuje zvracení, průjem, zánět sliznice, plešatost. Lék způsobuje také trvalé poškození DNA, kdy dochází k pozměňování nukleosidů, tyto chyby nejsou v buňce opraveny, a to vede k buněčné smrti. (Massoud a kol. 2021; Makovec 2019)

Při standardním dávkování cisplatiny intravenózně, je 25 % cisplatiny eliminováno za prvních 24 hodin, 50 % je eliminováno do pěti dnů od podání, kdy je 90 % cisplatiny odstraněno renální exkrecí. Nefrotoxicita je tedy způsobena hromaděním cisplatiny v ledvinách. (Ghosh 2019)

Hydratací (3-6 l denně) se může snížit riziko nefrotoxicity u pacienta. Ke snížení nefrotoxicity je také vhodné podávání thiosíranu sodného, který se silně váže s platinovým komplexem, inaktivuje ho a následně je vyloučen močí. (Ghosh 2019)

### **2.3.2 Nefrotoxicita**

Cisplatina ničí buněčnou membránu buněk a vyvolává tubulární dysfunkci. Poškození buněk způsobuje snížení glomerulární filtrace, a to vede k akutní nefrotoxicitě. Cisplatina se v ledvinách akumuluje více než v jiných orgánech. (Ghosh 2019)

### **2.3.3 Ototoxicita**

Ototoxicita je pozorována u 10-90 % pacientů, více postiženými bývají děti. Nadbytek ROS ve vláskových buňkách ucha způsobuje ztrátu sluchu. Ztráta sluchu způsobená toxickým účinkem cisplatiny je obvykle ve vysokofrekvenčním rozsahu a je trvalá. Existuje několik přístupů k léčbě ototoxicity, mezi něž se řadí podávání antioxidantů a protizánětlivých látek. (Ghosh 2019)

### **2.3.4 Neurotoxicita**

Jako vedlejší účinek u pacientů léčených cisplatinou se může objevit také neuropatie. Příznaky se projevují brněním v různých částech těla, necitlivostí či zhoršením pohybu končetin. (Maccio a Madeddu 2013)

### **2.3.5 Nevolnosti**

Gastrointestinální poškození se u pacientů léčených cisplatinou projevují nevolnostmi a zvracením, navzdory současnému podávání antiemetik. Dalšími projevy jsou i průjem, ztráta chuti nebo pankreatitida. (Ghosh 2019) Předpokládá se, že serotonin je hlavním neurotransmiterem zodpovědným za zvracení vyvolané cisplatinou. (Maccio a Madeddu 2013)

### 2.3.6 Rezistence k cisplatině

Největší nevýhodou v léčbě rakoviny cisplatinou je častá rezistence nádorových buněk k cisplatině. Například nádory varlat, vaječníků či nádory hlavy jsou velmi citlivé k cisplatině, zatímco kolorektální karcinom je k cisplatině rezistentní. (Ghosh 2019)

Rezistence k cisplatině může být způsobena několika faktory jako jsou snížený příjem léčiva buňkou, snížená akumulace léčiva v buňce, inaktivace léčiva vazbou na různé proteiny nebo změna proteinů signalizujících apoptózu buňky. (Ghosh 2019; Shen a kol. 2012)

Existují dvě formy rezistence k cisplatině: vnitřní rezistence a získaná rezistence. Vnitřní rezistence se projevuje již od počátku léčby cisplatinou, zatímco získaná rezistence se začne projevovat až v průběhu léčby. Často se stává, že na počátku léčby je pacient k cisplatině senzitivní, ale následně po několika cyklech chemoterapie dochází k relapsu, v důsledku vzniku rezistence k cisplatině. (Ghosh 2019; Shen a kol. 2012)

Rezistence buněk k cisplatině může vzniknout různými mechanismy, nejčastějšími jsou snížený průnik cisplatinu do buněk, detoxikace cisplatinu buněčnými thioley nebo oprava DNA. (Ghosh 2019)

První způsob, kterým se utváří rezistence, může být během cirkulace léčiva v krevním oběhu. Cisplatinu je pacientům podávána intravenózně a před vstupem do rakovinných buněk cirkuluje krevním oběhem. Proteiny přítomné v krevním oběhu (zejména proteiny s thiolovou skupinou – sérový albumin a cystein) se vážou na cisplatinu. Vazba proteinu k cisplatině způsobí její deaktivaci. 65-95 % cisplatinu se váže k sérovým proteinům již jeden den od podání léku. (Ghosh 2019)

K rezistenci na cisplatinu dochází také při transportu látky buněčnou membránou. Snížená průchodnost membrány při vstupu léčiva do buňky nebo naopak zvýšená průchodnost membrány při odlivu léčiva z buňky, způsobuje celkově sníženou akumulaci cisplatinu v buňce. (Ghosh 2019; Shen a kol. 2012)

Protein CTR1 je zodpovědný za příjem cisplatinu buňkou, cisplatinu však zároveň také způsobuje jeho degradaci, což má za následek snížení příjmu cisplatinu buňkou a následně zvýšení rezistence. Buňky se zvýšenou expresí CTR1 vykazují vyšší míru akumulace cisplatinu a vyšší citlivost k cisplatině. (Ghosh 2019; Shen a kol. 2012)

Ve snížené akumulaci cisplatinu může hrát roli také membránový protein TMEM205, u kterého se předpokládá, že je zodpovědný za zvýšenou sekreci léčiva z buňky. (Calo a kol. 2022) Podobný mechanismus je pozorován i u proteinů ze skupiny MRP, zejména u MRP2. (Galluzzi a kol. 2012)

Rezistence také může vzniknout v cytoplazmě buňky. V cytoplazmě je cisplatinu inaktivována vazbou s glutathionem a metalothioneiny. Komplex GSH a cisplatinu je

následně vyloučen z buňky GS – spřaženou exportní pumpou. (Ghosh 2019; Makovec 2019; Galluzzi a kol. 2012)

Systém opravy DNA NER (nucleotid excision repair) se podílí na odstraňování DNA aduktů vzniklých vazbou cisplatinu na báze DNA. Tím, že NER léze odstraňuje dochází k rezistenci na léčivo. NER odstraňuje poškozené úseky DNA pomocí DNA nukleázy a následně je mezera ve vláknech dosyntetizována DNA polymerázou, jako templát zde slouží nepoškozený řetězec. (Ghosh 2019; Duan a kol. 2020) Buňky s vyšší expresí NER vykazují vyšší rezistenci k cisplatině. MMR protein zodpovídá za opravu DNA-cisplatinu lézí, pokud protein nedokáže lézi odstranit, pak dojde k apoptóze buňky. Pokud je oprava léze úspěšná, tak buňka může nadále fungovat. (Ghosh 2019; Galluzzi a kol. 2012)

Efektivita léčby cisplatinou (a dalšími platinovými deriváty) je individuální a zčásti je její úspěšnost založena na genetických predispozicích jedince. Do účinnosti léčby zasahují geny pro metabolismus léčiv, transport léčiv i geny pro opravu DNA. Znalost genetických markerů nám může poskytnout více informací pro personalizovanou léčbu. (Makovec 2019)

## **2.4 Výzkum nových léčiv pro léčbu nádorových onemocnění**

Výskyt mnoha nežádoucích účinků, které mohou vést i ke značnému poškození organismu, nás nabádá hledat nové sloučeniny pro léčbu rakoviny založené také na iontech jiných kovů. Hlavními požadavky na testovanou látku je větší (nebo srovnatelná) cytotoxicita ve srovnání se sloučeninou cisplatinu, ale zároveň co nejmenší toxicita pro orgány a tím pádem i co nejméně nežádoucích účinků pro lidský organismus.

### **2.4.1 Camplatina**

Ve snaze vyvinout látku s podobným účinkem jako je cisplatina, ale zároveň minimalizovat nežádoucí účinky a rezistenci, byla syntetizována camplatina. Podle studie popsané v článku „Design and delivery of camplatin to overcome cisplatin drug resistance“, lze rezistenci k cisplatině obejít léčením camplatinou. Tato sloučenina byla vytvořena připojením cisplatinu k anhydridu kafru. Sloučenina camplatinu byla následně konjugována s biodegradovatelným polymerem (MPEG-b-PCL-b-PLL) a celý komplex byl do buňky doručen v micelle endocytózou. (Qi a kol. 2015)

Apoptóza je jednou z cest mechanismu účinku cisplatinu, proto při narušení správného fungování apoptózy dochází k rezistenci na cisplatinu. Při zvýšené hladině protiapoptického proteinu bcl-2 a zároveň snížené hladině proapoptického proteinu bax je blokována apoptóza a dochází tím ke snížení účinnosti léčiva. Camplatina je po vstupu do buňky redukována na toxickou cisplatinu, vázající se na DNA, a kafrovou kyselinu,



kteřá snižuje hladinu bcl-2. Kafrová kyselina snižuje hladinu bcl-2 a zároveň zvyšuje hladinu bax, čímž je následně spuštěna apoptóza. (Qi a kol. 2015)

Camplatina byla testována na buňkách senzitivních i rezistentních k platině. Camplatina vykazovala vyšší cytotoxicitu než cisplatina na obou buněčných liniích. Zároveň camplatina snižovala hladinu antiapoptického proteinu bcl-2 a celkově snížila poměr bcl-2/bax. (Qi a kol. 2015)

#### **2.4.2 Fotosenzitivní sloučeniny**

Léčiva na bázi platiny v cis konfiguraci – cisplatina nebo carboplatina - se vyznačují stejným mechanismem rezistence, který je způsoben sníženou akumulací léčiva v buňce. Sloučeniny v trans konfiguraci tento problém nemají. Sloučeniny mohou být cíleně doručeny na požadované místo pomocí nanočástic. (Song a kol. 2015)

Izomer cisplatiny – transplatina – je nestabilní a v krevním oběhu rychle deaktivován a je proto považován za klinicky neúčinný. Tato sloučenina byla transformována na fotosenzitivní sloučeniny vycházející z transplatiny, tyto sloučeniny byly připojeny k syntetickému polymeru, který sloučeninu ochránil před deaktivací v krevním oběhu a do buňky byl celý komplex doručen pomocí micely. Do buňky se sloučenina dostala pomocí endocytózy. (Song a kol. 2015)

Sloučenina byla následně v buňce aktivována UVA zářením (315 - 400 nm), v jehož důsledku se uvolnila cytotoxická transplatina. (Song a kol. 2015)

#### **2.4.3 Distribuce léčiv pomocí nanočástic**

Doručovací systém chemoterapeutik založený na nanočásticích přináší nové možnosti efektivnějšího doručování léčiva přímo k místu nádoru. Tato technologie může přinést efektivnější léčbu nádorových onemocnění a omezit nežádoucí účinky. (Yang a kol. 2014)

Ve studii „Rational design of Palyion Complex Nanoparticles to Overcome Cisplatin Resistance in Cancer Therapy“ se pojednává o nanočásticích vytvořených z prekursoru léčiva Pt(IV) konjugovaným s kopolymerem a micelou. Pro přípravu byly použity pozitivně nabitě nanočástice, které mají usnadněný vstup do buňky a následně zvýšenou akumulací nanočástic v buňce se může předejít rezistenci buněk k léčivu. Rezistence se obchází také prodlouženou dobou cirkulace léčiva v krevním oběhu a zvýšeným příjmem léčiva buňkou. (Yang a kol. 2014)

#### 2.4.4 Doručování léčiv pomocí lipozomů

V klinickém testování jsou nyní lipozomální nosiče cisplatin. Tento přístup vypadá velmi slibně v boji proti rezistenci k cisplatině. Bylo testováno, že u buněk rezistentních k cisplatině, došlo při lipozomální aplikaci látky ke zvýšené akumulaci léčiva v buňce v porovnání s volně aplikovanou cisplatinou. (Krieger a kol. 2010)

#### 2.4.5 Nové sloučeniny na bázi kovu

Nová generace léků založená na sloučeninách kovu by měla po strukturní stránce odpovídat cisplatině. Při hledání nových mechanismů, jak předejít rezistenci k léčivu, bylo syntetizováno mnoho různých potencionálně účinných komplexů pro léčbu nádorů.

Kromě nových (různě modifikovaných) sloučenin platiny se zkoumá možnost využití dalších kovů jako palladium (II), galium (III), ruthenium (II), zlato (I, III), bismut (III), rhenium (I), měď (II), cín (IV). Zkoumá se účinek sloučenin zlata, vědci se domnívají, že sloučeniny tohoto kovu cílí na mitochondrie buňky a také způsobují zlomy v řetězci DNA. Na podobném mechanismu by mohly účinkovat i sloučeniny palladia, jehož sloučeniny patří k nejvíce zkoumaným. Některé jeho sloučeniny vykazovaly vyšší protinádorovou aktivitu než cisplatin. (Song a kol. 2015; Alam a Huq 2016)

##### 2.4.5.1 Nové sloučeniny palladia

Mimo léčbu cisplatinou se nyní pozornost mnoha vědců ubírá ke sloučeninám palladia, jejichž výhodou je vysoká stabilita ve fyziologickém prostředí lidského těla. Sloučeniny palladia mají podobné koordinační a strukturální vlastnosti jako sloučeniny platiny. Mnoho ze zkoumaných sloučenin palladia vykazovalo antiproliferační aktivitu vůči zkoumaným buňkám a také působily na nádory rezistentní k léčivům na bázi platiny. Léky založené na sloučeninách palladia mají v mnoha případech zřejmě jiný mechanismus účinku než léky založené na platině. (Scattolin a kol., 2021)

V roce 1998 Navarro-Ranninger a Quiroga a kol. představili několik komplexů palladia s navázaným thiosemikarbazonem. Tyto sloučeniny vykazovaly velkou protinádorovou aktivitu dokonce i vůči liniím rezistentním k cisplatině, což bylo zřejmě způsobeno odlišným mechanismem účinku oproti cisplatině. (Alam a Huq 2016; Quiroga a kol. 1998)

Na začátku 21. století bylo popsáno mnoho slibných komplexů *trans*-palladia s vysokou protinádorovou aktivitou. Komplexy měly při testech na různých buněčných liniích (často ovariálních) často vyšší účinnost než cisplatin. (Alam a Huq, 2016) Většina z těchto sloučenin vykazovala vysokou protinádorovou aktivitu na buněčných liniích rezistentních k cisplatině. Mechanismus účinku těchto sloučenin byl přisuzován tvorbě DNA aduktů. (Huq a kol. 2004; Cheng a kol. 2006)

Velmi slibné výsledky přineslo testování cyklického komplexu palladia (C7a), které byly prezentovány v BMC Cancer v roce 2011 Serranem a kol. Mechanismus účinku je založen na aktivaci vnitřní dráhy apoptózy. Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných sloučenin byly 42krát až 1333krát nižší než hodnoty cisplatiny na několika buněčných liniích. Při dalších testech bylo prokázáno, že je látka účinná proti primárním nádorům a metastázám. Také se prokázala účinnost proti buňkám rezistentním k cisplatině. Tato sloučenina se jeví jako potencionální chemoterapeutické léčivo. (Alam a Huq 2016; Serrano a kol. 2011)

V laboratoři pana profesora Zdeňka Trávníčka na katedře anorganické chemie Univerzity Palackého v Olomouci byly připraveny další cytotoxické aktivní trans-palladium(II) komplexy {trans-[Pd(L)2Cl2]·H<sub>2</sub>O; L = 2-[(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)]-N6-(3-hydroxybenzyl)-9-isopropyladenine nebo 2-[(1-isopropyl-2-hydroxyethylamino)]-N6-(3-hydroxybenzyl)-9-isopropyladenine}, aktivita těchto komplexů byla popsána v Journal of Inorganic Biochemistry. Testováním bylo prokázáno, že tyto komplexy vykazovaly ještě vyšší aktivitu ( $IC_{50}$  = 3  $\mu$ M) než cisplatina ( $IC_{50}$  = 11  $\mu$ M) a oxaliplatina ( $IC_{50}$  = 18  $\mu$ M) testováním na buněčné linie K562 odvozené z myeloidní leukémie a na buněčné linii MCF7 odvozené z lidského adenokarcinomu prsu. (Starha, Travnicek a Popa 2009)

Týmem vědců Koumoussi a kol. byl v roce 2012 publikován článek o přípravě nových komplexů platiny a palladia obsahující 2,6 – diacetylpyridin dioxim jako ligand. (Koumoussi a kol. 2012) Na tomto článku spolupracoval i pan Dr. Stamatatos, který poskytl také nové komplexy platiny a palladia pro biologické testování v naší laboratoři.

V článku byly charakterizovány komplexy [PdCl(dapdoH)] a [PtCl(dapdoH)]. Ligand komplexů 2,6 – diacetylpyridin dioxim tvoří komplexy kovů s nadějnou biologickou aktivitou. Bylo prokázáno, že komplexy se mohou interkalovat do CT DNA (DNA telecího brzlíku (calf-thymus)). Samotný ligand i komplexy [PdCl(dapdoH)] a [PtCl(dapdoH)] vykazovaly vysokou vazebnou afinitu k sérovému albuminu. (Koumoussi a kol. 2012)

## 2.5 Motivace práce

Nádorová onemocnění jsou stále narůstajícím a rozšiřujícím se celosvětovým problémem vyskytujícím se napříč všemi věkovými skupinami. Cílem mnoha vědeckých skupin je objevit (vyvinout) účinné léčivo, které způsobuje zánik nádorových buněk a zároveň ostatní normální buňky nechává bez poškození, tím pádem je lidský organismus zatěžován léčivem co nejméně. V této bakalářské práci byly využity znalosti o nádorových a zdravých buňkách, u nichž byla testována cytotoxicita po aplikaci výše zmíněných nových komplexů [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) a [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>).

Důležitým poznatkem kromě zjištění cytotoxické dávky je také mechanismus, kterým cytostatické látky nádorové buňky zabíjí. Vyvinout nové léčivo je velmi obtížný a zdlouhavý proces, i přesto je případné riziko neúspěchu zapotřebí podstoupit a nové léčivé látky stále vyvíjet a testovat jejich cytotoxicitu. Jen tak je možné dosáhnout úspěšnější léčby nádorových onemocnění.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Materiály**

#### **3.1.1 Přístrojové vybavení**

TC10™ Automated Cell Counter (Bio–Rad), světelný mikroskop s fluorescenčním módem Olympus IX 70, inverzní světelný mikroskop Olympus CKX31, multidetekční reader Tecan infinite M200 pro (Schoeller Instruments), průtokový cytometr BD FACSVerse™ (BD Biosciences) s BD FACS Universal loaderem, vodní lázeň SW22 (Julabo), ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec (BANDELIN)

#### **3.1.2 Chemikálie a použité kity**

Deionizovaná voda, 0,25 % roztok Trypsin – EDTA (T4049; Sigma - Aldrich), 1×koncentrovaný PBS roztok, MTT (M2128; Sigma - Aldrich), DMSO > 99,9 % (472301; Sigma Aldrich), DMF (Sigma – Aldrich), BD Cycletest™ Plus DNA kit, kalcein (zásobní koncentrace 4 mM), propidium jodid (Sigma – Aldrich; zásobní koncentrace 1mg/ml)

#### **3.1.3 Použitá média**

DMEM (1X) + GlutaMAX™

Bylo připraveno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) obsahující 1 g/l D-glukózy, pyruvát, 10 % FBS a 1 % PEN/STR; pozn.: FBS – fetální bovinní sérum – zdroj bílkovin, PEN/STR – penicilín (10 000 U/ml) a streptomycin (10 000 µg/ml) – prevence před infekcí.

#### **3.1.4 Příprava použitých rotoků**

1× PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Následně bylo pomocí HCl upraveno pH na hodnotu 7,4 a objem byl doplněn opět destilovanou vodou na 1000 ml. Láhev s roztokem PBS byla následně autoklávována a připravena na použití.

#### **3.1.5 Testované sloučeniny**

##### **3.1.5.1 Cisplatina**

Byl použit 15 mM (zásobní) komerční roztok cisplatiny.

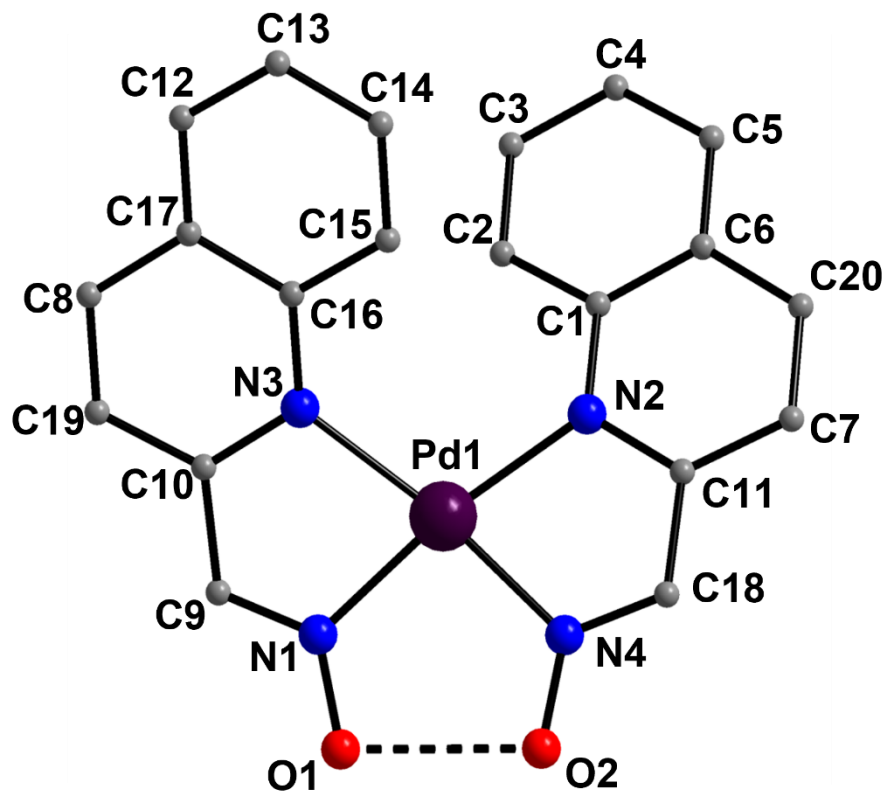
### 3.1.5.2 Komplexy $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ , $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ a ligand chinolin 2-aldoxim (qaoH)

Sloučeniny byly obdrženy od pana Dr. Theocharise C. Stamatatose. Tyto sloučeniny připravil a popsal společně se svým výzkumným týmem na Univerzitě Patras v Řecku.

Výzkum týmu pana Dr. Stamatatose se zabýval přípravou a charakterizací dvou nových Pd(II) a Pt(II) komplexů nesoucích organický chelatační ligand chinolin 2-aldoxim (qaoH) (viz obr. 4). Role organických chelatačních ligandů je zvláště důležitá pro krystalizaci, stabilitu a pro udržení daných vlastností koordinačních sloučenin. Volba těchto kovových iontů a ligandů je opodstatněna potencionálně zajímavými biologickými vlastnostmi. Chinolinoximy představují velmi důležitou třídu sloučenin souvisejících s biologickými systémy. Silná nukleofilita oximátového aniontu je spojena s mnoha hydrolytickými procesy, jako je přenos nebo štěpení acylové, fosforylové nebo sulfurylové skupiny atakováním elektrofilního centra.

Nově syntetizované komplexy byly charakterizovány monokrystalovou rentgenovou krystalografií a spektroskopickými/spektrofotometrickými technikami jako IČ, NMR, UV/VIS a ESI – MS a Ramanovou spektroskopii. Obě sloučeniny vykazovaly v různých roztocích stejné strukturální vlastnosti.

Důležitou vlastností obou komplexů je, že jsou rozpustné ve vodě, jsou tedy vhodné pro další biologické studie.



Obr. 4 – Struktura komplexu  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ . Uprostřed je fialově zvýrazněn centrální atom palladia. Šedě jsou zvýrazněny atomy ligandu, modře atomy dusíku a červeně atomy kyslíku. Sloučenina  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  má totožnou strukturu, přičemž atom palladia je nahrazen atomem platiny.

### 3.1.5.3 Syntéza sloučenin $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ a $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$

Dvě nové koordinační sloučeniny  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  a  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  byly připraveny přesně stejným postupem:

K světle žlutému roztoku ligandu (qaoH) (obr. 6) (0,1 mmol, 0,02 g) v MeOH (20 ml) byl přidán pevný  $PdCl_2$  (0,1 mmol, 0,02 g) a výsledný roztok byl magneticky míchán po dobu tří hodin. Přidáním pevného  $AgNO_3$  vznikl žlutý roztok, který se nechal pomalu odpařovat při pokojové teplotě.

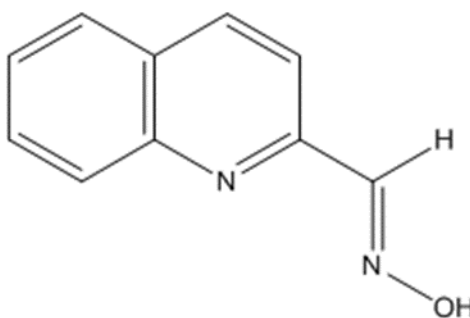
Následující den se vytvořily žlutooranžové krystaly (obr. 5), vhodné ke studiu pomocí rentgenových a difrakčních metod. Krystaly byly odfiltrovány, následně promyty studeným  $Et_2O$  (diethylether) a vysušeny na vzduchu. Výtěžek byl ~85 % (na základě celkově dostupného Pd). Analytická data z elementárních analýz vysušené sloučeniny 1: C 46.94, H 2.95, N 13.68 %. Vypočtená data pro vzorec  $C_{20}H_{15}N_5O_5Pd$ : C 46,75, H 2,92, N 13,75 %. Vybraná data z IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3425 (mb), 3015 (m), 1592 (m), 1526 (vs), 1431 (m),



Obr. 5 – Žlutooranžové krystaly sloučeniny  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ; Převzato od Dr. Theocharise C. Stamatatose

1382 (vs), 1215 (m), 1154 (s), 1025 (m), 999 (m), 947 (m), 893 (w), 837 (m), 797 (m), 763 (s), 675 (w), 530 (m), 500 (m).

Komplex 2 byl připraven podle stejného postupu jako komplex 1 s výjimkou použití  $\text{PtCl}_2$  (0,1 mmol, 0,03 g) místo  $\text{PdCl}_2$ . Výtěžek byl ~80 % (na základě celkově dostupného Pt). Analytická data z elementárních analýz vysušené sloučeniny 2: C 40.01, H 2.52, N 11.66 %. Vypočtená data pro vzorec  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5\text{Pt}$ : C 39.92, H 2.42, N 11.75 %. Vybraná data z IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3429 (mb), 2926 (m), 1588 (m), 1636 (m), 1523 (vs), 1382 (vs), 1214 (w), 1151 (m), 1027 (m), 950 (m), 886 (w), 834 (m), 799 (w), 765 (m), 675 (w), 564 (m).



Obr. 6 – Chemická struktura ligandu chinolin 2-aldoxim (qaoH).

### 3.1.6 Biologický materiál

Buněčné linie jsou důležitým nástrojem pro vědu, slouží jako modelový systém pro testování nových chemických sloučenin, metabolických dějů nebo mechanismu stárnutí buněk. Na buněčných liniích je testována míra toxicity látek a také jejich mutagenita či karcinogenita. (Šána a kol. 2017, 69-70)

Buněčné linie jsou odvozeny od primárních kultur, které jsou připravovány z tkání. Buněčné linie se následně kultivují ve vhodných podmínkách, ve kterých dochází k proliferaci buněk. Buňky se pěstují v médiu s přesně definovaným obsahem živin pro danou buněčnou linii. Buňky se v médiu dělí, až dosáhnou stavu konfluence, kdy buňky zaplní plochu dna nádoby a dochází k inhibici dělení buněk jejich vzájemným kontaktem. Pro další dělení buněk je nutné tuto populaci zpasážovat do nových nádob s čerstvým médiem. Pro uvolnění buněk od kultivační nádoby i k odlepení buněk od sebe se používá Trypsin-EDTA. (Šána a kol. 2017, 69-70)

Kultivované buňky rostou v médiu, které napodobuje extracelulární tekutinu. Médium obsahuje zdroj živin, růstových faktorů, hormonů a přidávají se rovněž antibiotika pro zamezení bakteriální kontaminace. Součástí média je také pufr zajišťující stálou hodnotu pH. Pro kultivaci buněk je vhodná teplota 37 °C a atmosféra s 4–10 %  $\text{CO}_2$ , nádoby

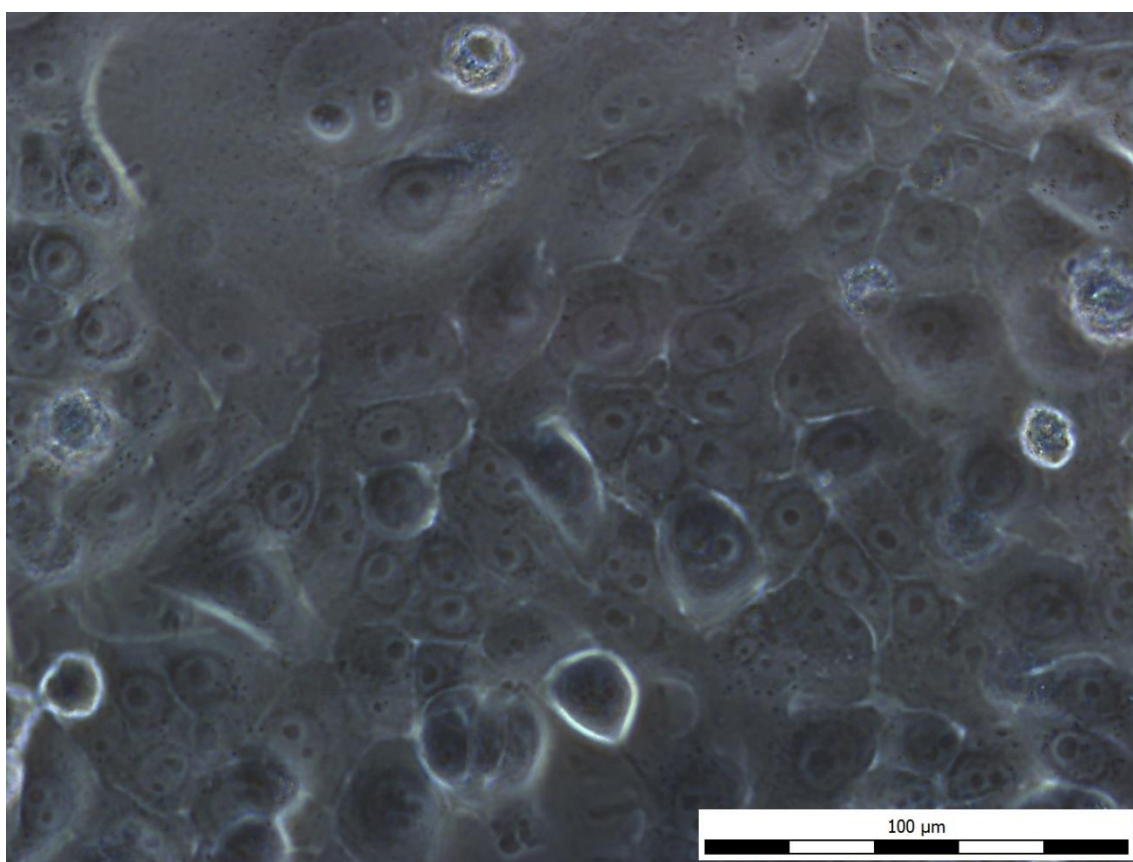


s buňkami jsou uchovávány ve speciálních inkubátorech, které zajistí všechny podmínky pro správný růst. (Šána a kol. 2017, 69-70)

### 3.1.6.1 Buněčná linie Cal-27 (CVCL\_1107)

Buněčná linie Cal-27 (obr. 7) je hojně používanou lidskou nádorovou buněčnou linií, která byla izolována ze spinocelulárního karcinomu jazyka. Tato buněčná linie byla založená Gioanni a kol. v roce 1982. (Gioanni a kol. 1993; Jiang a kol. 2009)

Ideálním médiem pro kultivaci těchto buněk je DMEM medium (Dulbecco Modified Eagle Medium) s přidavkem 10% FBS (fetální bovinní sérum), 1% penicillinu/streptomycinu uchovávané v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. (Jiang a kol. 2009)



Obr. 7 – Fotografie buněčné linie Cal27 inkubované 24 hodin v médiu. Buňky byly pozorovány mikroskopem Olympus IX70 a fotografie byly pořízeny pomocí aplikace Quick photo camera 3.0.

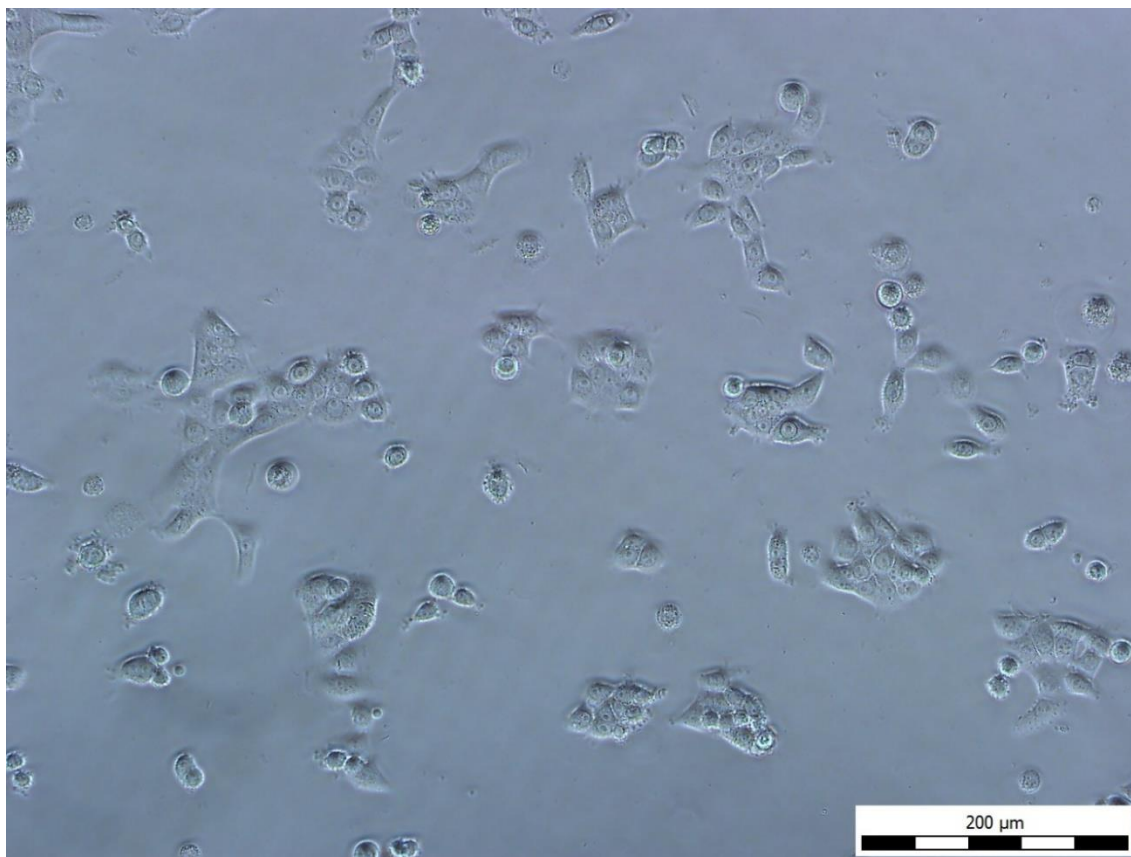
### 3.1.6.2 Buněčná linie HaCat (CVCL\_0038)

Buněčná linie HaCat (obr. 8) je transformovaná netumorigenní buněčná linie pocházející z keratinocytů dospělého muže. Důležitou vlastností těchto buněk je neomezený proliferační potenciál a také neinvazivnost. Imortalizované buňky byly vytvořeny transfekcí lidského papillomaviru. Buňky jsou diferenciovány podobně jako normální keratinocyty. (Boukamp a kol. 1988; Tao a kol. 2013)

Za normálních podmínek mají buňky polygonální tvar, často jsou vícejaderné. (Boukamp a kol. 1988)

HaCat jsou využívány ve výzkumu pro jejich vysokou rychlost proliferace. HaCat buňky se využívají ve výzkumech souvisejících s karcinogenezí v lidských buňkách. (Tao a kol. 2013; Schoop, Mirancea a Fusenig 1999)

Ideálním médiem pro kultivaci těchto buněk je DMEM medium s přidavkem 10% FBS (fetální bovinní sérum). Médium je vhodné měnit jednou za 2–3 dny. Kultivujeme za normálních podmínek 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. (Tao a kol. 2013)



Obr. 8 – Fotografie buněčné linie HaCat inkubované 24 hodin v médiu. Buňky byly pozorovány mikroskopem Olympus IX70 a fotografie byly pořízeny pomocí aplikace Quick photo camera 3.0.

### 3.1.6.3 Buněčná linie HeLa (CVCL\_0030)

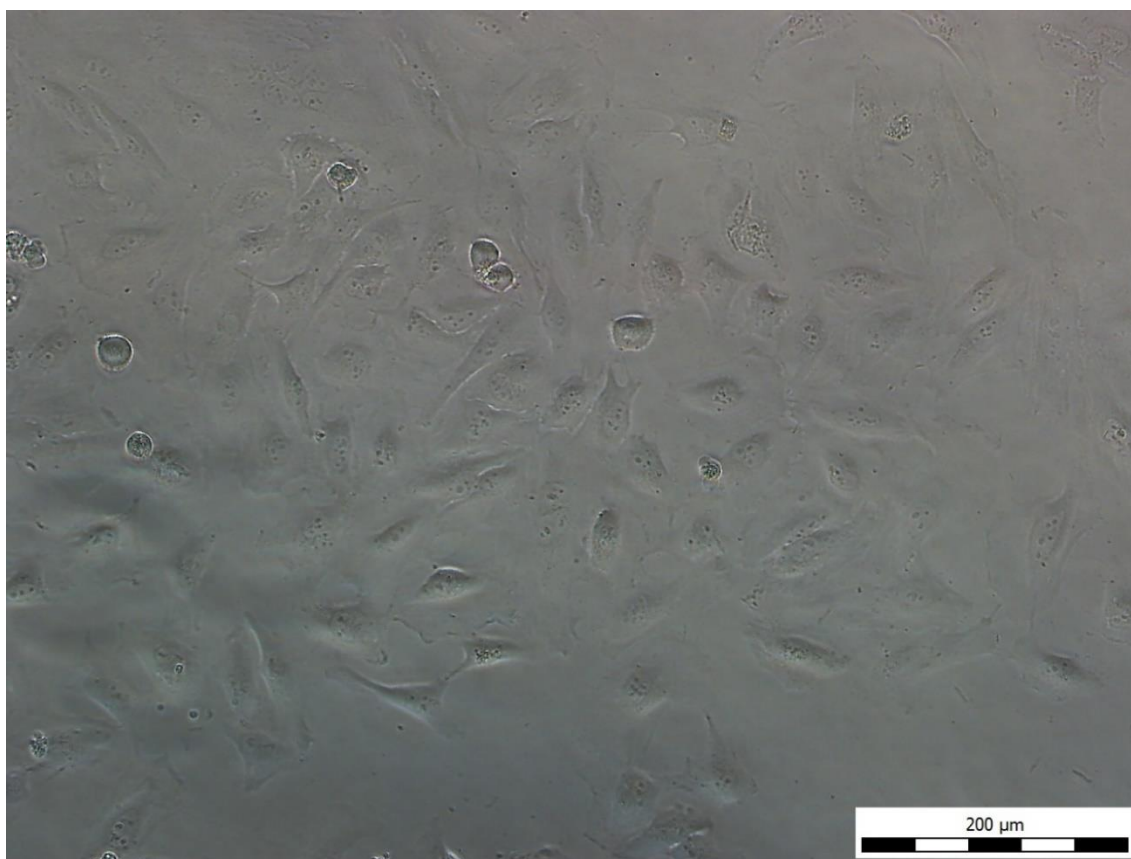
HeLa je buněčná nádorová linie (obr. 9). Tyto buňky byly izolovány v roce 1951 z agresivního nádoru děložního hrdla (neboli karcinomu děložního čípku) Henrietty Lacksové. HeLa je první uvedenou buněčnou linií a do dneška je tato buněčná linie jednou z nejpoužívanějších v laboratorních výzkumech. (Ivankovic a kol. 2007; Adey a kol. 2013; Lucey, Nelson-Rees a Hutchins 2009)

V současnosti analýza původního vzorku tkáně prokázala, že buňky obsahovaly lidský Papilloma virus (HPV), tento virus je znám tím, že způsobuje velmi agresivní adenokarcinomy. (Lucey, Nelson-Rees a Hutchins 2009)

Buněčná linie HeLa je velmi invazivní a nesmrtelná, může projít nekonečně mnoho buněčnými děleními. To je možné díky aktivním telomerázám, které obnovují telomery chromozomů (nedochází ke zkracování telomer). Buňky tak mohou projít neomezeným počtem dělení – nepodléhají Hayflickovu limitu a nepřechází do stádia senescence. (Ivankovic a kol. 2007) HeLa buňky obsahují aneuploidní sadu chromozomů, přesný počet chromozomů se může lišit od konkrétního podtypu buněk. (Adey a kol. 2013)

Je zřejmé, že HeLa buňky kontaminují mnoho jiných buněčných linií používaných v laboratořích, což je problém, protože po kontaminaci buněk jsou výsledky studií irelevantní. Pro detekci kontaminace buněčné linie lze využít například specifické DNA testy. (Rahbari a kol. 2009 ; Lucey, Nelson-Rees a Hutchins 2009)

Ideálním médiem pro kultivaci těchto buněk je DMEM medium s přídavkem 10% FBS, glukózy, pyruvátu sodného, L-glutaminu, antibiotika penicilinu a streptomycinu. Buňky kultivujeme v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. (Ivankovic a kol. 2007)



Obr. 9 – Fotografie buněčné linie HeLa, inkubované 24 hodin v médiu. Buňky byly pozorovány mikroskopem Olympus IX70 a fotografie byly pořízeny pomocí aplikace Quick photo camera 3.0.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Atomová absorpční spektroskopie

Koncentrace Pd a Pt byla ve vzorcích  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ,  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  byla stanovena pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-

MS) po předchozím rozkladu vzorků směsí koncentrovaných anorganických kyselin v uzavřeném mikrovlnném systému (MLS 1200 mega (Milestone)). Ke vzorkům (50  $\mu$ l) v mineralizačních kelímcích byla připadána rozkladná směs (4 ml  $\text{HNO}_3$ , 1 ml  $\text{HClO}_4$ , 0,25 ml  $\text{HCl}$ ) a vzorky byly po uzavření kelímků rozkládány pomocí 7stupňového rozkladného programu. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byly vzorky kvantitativně převedeny do 25 ml odměrné baňky (třída A). V takto připravených vzorcích byl stanovena celková koncentrace Pd a Pt s využitím ORS-ICP-MS 7700x vybaveného autosamplerem, koncentrickým zmlžovačem, kolizně-reakční celou pracující v He módu pro eliminaci potenciálních spektrálních interferencí a kvadrupólovým analyzátozem (Agilent Technologies), a to metodou kalibrační přímky.

### 3.2.2 Optická mikroskopie

Při práci v laboratoři byl využíván světelný mikroskop s fluorescenčním módem Olympus IX 70 pro pořízení fotografií buněk (v aplikaci QuickPHOTO CHAMERA 3.0) a inverzní světelný mikroskop Olympus CKX31 pro běžné pozorování buněk.

Optický mikroskop byl při práci využíván pro kontrolu růstu buněk. Při testování cytotoxických látek byly pořízeny fotografie buněk při různých koncentracích látky. Pozorované buňky můžeme rozlišit na živé a mrtvé podle jejich tvaru a struktury.

### 3.2.3 MTT test

MTT je jedním z nejrozšířenějších testů používaných ke zjištění metabolické aktivity testovaných buněk. Pomocí tohoto testu lze analyzovat proliferaci a viabilitu buněk a také cytotoxicitu testovaného materiálu. (Michalová a kol. 2008) Princip testu je založen na skutečnosti, že živé buňky mají na rozdíl od mrtvých buněk funkční mitochondriální dehydrogenázy, díky nimž dokážou redukovat solubilní roztok MTT na fialový formazan nerozpustný ve vodě. (Šána a kol. 2017, 81-82; Michalová a kol. 2008)

Kolorimetrický test je založen na redukci žluté rozpustné tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na nerozpustný formazan, který pozorujeme ve formě fialových krystalků. Reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních sukcinát - dehydrogenáz živých buněk. Formazanové krystalky jsou poté rozpuštěny přidáním silného detergentu (v našich testech DMSO). Následně se spektrofotometricky stanoví hodnota absorpance roztoku při 570 nm. Počet živých buněk je určen podle množství redukovaného MTT. (Šána a kol. 2017 81-82; Michalová a kol. 2008)

Absorbance byla vyhodnocena pomocí přístroje multidetekčního readeru Tecan infinite M200 pro (Schoeller Instruments).

V této práci bylo na nádorových a normálních zdravých buněčných liniích testováno, jak moc cytotoxické byly různé koncentrace testovaných potencionálních cytostatik. V případě, že buňky mají funkční metabolismus a přeměňují sůl MTT na formazan, znamená to, že přežily působení testované chemické látky. (Michalová a kol. 2008)

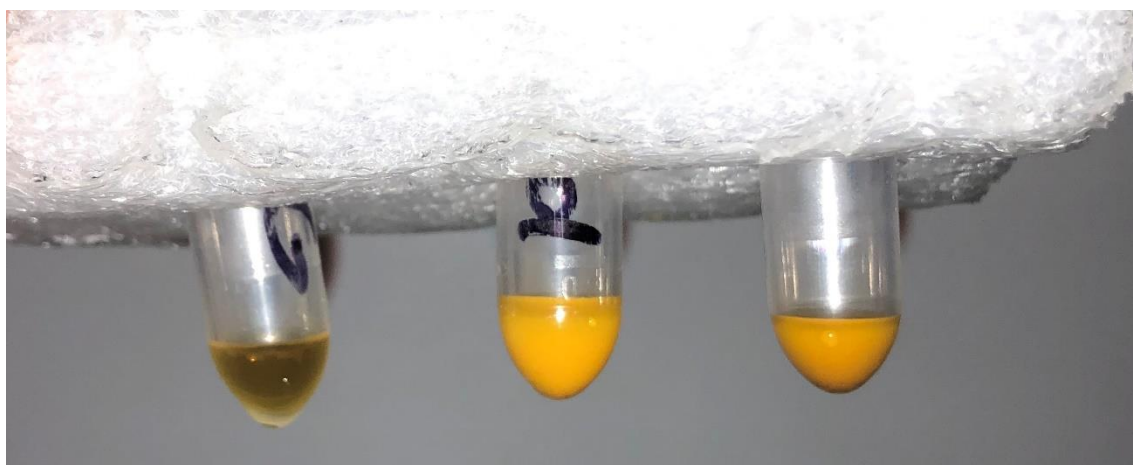
### 3.2.3.1 Postup měření viability buněk

Byla testována viabilita (životaschopnost) buněk po inkubaci s novými sloučeninami palladia a platiny ( $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ,  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ ) s potencionálním protinádorovým účinkem a s volným ligandem chinolin 2-aldoxim (qaoH). U samotného ligandu se předpokládá, že by neměl být cytotoxický. Pro porovnání byly buňky také inkubovány s běžně používaným cytostatikem cisplatinou.

Viabilita buněk byla testována na třech buněčných liniích – Cal27, HaCat a HeLa. Testováno bylo pět koncentrací sloučenin  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ,  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ , ligandu (qaoH) a cisplatinu – 6,25  $\mu M$ ; 12,5  $\mu M$ ; 25  $\mu M$ ; 50  $\mu M$ ; 100  $\mu M$  (tab. 1). Viability ovlivněných buněk byly porovnány s viabilitou kontrolních buněk.

Pro testování viability buněk byl pro všechny buněčné linie opakován stejný postup:

První den byly buňky vysazeny na 96jamkovou destičku. Každá jamka na destičce obsahovala 100  $\mu l$  buněčné suspenze s 10000 buňkami. Počet buněk byl určen pomocí přístroje TC10™ Automated Cell Counter (Bio – Rad). Následně se buňky inkubovaly 24 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.



Obr. 10 – Rozpuštěné komplexy v DMF (zleva) - chinolin 2-aldoxim (qaoH),  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ,  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$

Následující den byly k buňkám přidány testované sloučeniny o požadovaných koncentracích. Při testování byly použity dvě série vzorků.

U první série obdržených vzorků byly vzorky v pevném skupenství naváženy a rozpuštěny v DMF (obr. 10) a přesná koncentrace roztoků byla změřena metodou AAS. Koncentrace sloučeniny Pt byla 37,93 mM, koncentrace sloučeniny Pd byla 47,92 mM, koncentrace cisplatinu byla 15 mM a koncentrace ligandu byla 100 mM.

Ze známých koncentrací byl spočítán objem potřebný k přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku: Výpočet pro přípravu 200  $\mu\text{l}$  1 mM výchozího roztoku sloučeniny  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ :

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{37,93 \text{ mM}} = 5,27 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku bylo použito 5,3  $\mu\text{l}$  původního roztoku  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$  a 194,7  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Výpočet pro přípravu 200  $\mu\text{l}$  1 mM výchozího roztoku sloučeniny  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ :

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{47,92 \text{ mM}} = 4,17 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku bylo použito 4,2  $\mu\text{l}$  původního roztoku  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$  a 195,8  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Výpočet pro přípravu 200  $\mu\text{l}$  1 mM výchozího roztoku sloučeniny ligandu chinolin 2-aldoxim:

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{100 \text{ mM}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku bylo použito 2  $\mu\text{l}$  původního roztoku chinolin 2-aldoxim a 198  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Výpočet pro přípravu 200  $\mu\text{l}$  1 mM výchozího roztoku sloučeniny cisplatiny:

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{15 \text{ mM}} = 0,01333 \text{ ml}$$

K přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku bylo použito 13,3  $\mu\text{l}$  původního roztoku cisplatiny a 186,7  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

U druhé série obdržených vzorků sloučenin byla připravena nejdříve 50 mM koncentrace vzorků Pd, Pd a lig přesným navážením vzorků v pevném skupenství a následným rozpuštěním v DMF. Koncentrace cisplatiny byla stále 15 mM (v celém měření byl použit stejný vzorek).

Výpočet pro přípravu 200  $\mu\text{l}$  1 mM výchozího roztoku sloučeniny  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ :

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{50 \text{ mM}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku bylo použito 4  $\mu\text{l}$  původního roztoku  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$  a 196  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Výpočet pro přípravu 200 µl 1 mM výchozího roztoku sloučeniny [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>):

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{50 \text{ mM}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200 µl 1 mM roztoku bylo použito 4 µl původního roztoku [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) a 196 µl deionizované vody.

Výpočet pro přípravu 200 µl 1 mM výchozího roztoku sloučeniny ligandu chinolin 2-aldoxim:

$$V = \frac{0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mM}}{50 \text{ mM}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$$

K přípravě 200 µl 1 mM roztoku bylo použito 4 µl původního roztoku chinolin 2-aldoxim a 196 µl deionizované vody.

Pro vytvoření koncentrační řady se postupovalo tak, že z 200 µl 1 mM roztoku bylo odebráno 100 µl do čisté mikrozkušavky a k tomuto roztoku bylo přidáno 100 µl deionizované vody, tím vznikl 500 mM roztok. Stejným způsobem jsme se dostali až ke koncentraci 62,5 mM.

1 mM roztok se na 100 µM zředil tak, že z 1 mM roztoku bylo odebráno 70 µl do nové mikrozkušavky, ve které již bylo předem napipetováno 630 µl DMEM média. Důležité bylo vždy roztok důkladně promíchat. Pro ředění dalších koncentrací sloučenin bylo postupováno stejným způsobem.

Z buněk vysazených na 96jamkových destičkách bylo odsáto staré médium odsávačkou (vakuový systém na odsávání média (Mediset)) (buňky již byly po 24 hodinách adherovány na dně jamek). K buňkám byly následně přidány roztoky z koncentrační řady sloučenin v triplikátech – rozmístění viz tabulka 1. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl roztoku sloučeniny.

Tab. 1 – Vizualizace rozložení koncentrací sloučenin na 96jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pd100	Pd100	Pd100	Pt100	Pt100	Pt100	cisPt100	cisPt100	cisPt100	lig100	lig100	lig100
B	Pd50	Pd50	Pd50	Pt50	Pt50	Pt50	cisPt50	cisPt50	cisPt50	lig50	lig50	lig50
C	Pd25	Pd25	Pd25	Pt25	Pt25	Pt25	cisPt25	cisPt25	cisPt25	lig25	lig25	lig25
D	Pd12.5	Pd12.5	Pd12.5	Pt12.5	Pt12.5	Pt12.5	cisPt12.5	cisPt12.5	cisPt12.5	lig12.5	lig12.5	lig12.5
E	Pd6.25	Pd6.25	Pd6.25	Pt6.25	Pt6.25	Pt6.25	cisPt6.25	cisPt6.25	cisPt6.25	lig6.25	lig6.25	lig6.25
F	kontrl*	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl	kontrl

\*kontrl = kontrolní buňky (buňky kultivované bez ovlivnění sloučeninou)

V tabulce jsou uvedeny zkratky pro sloučeniny a koncentrace bez jednotek [µM].

Pd100 = roztok sloučeniny ([Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>)) v 100 µM koncentraci.

Pt100 = roztok sloučeniny [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>)) v 100 µM koncentraci.

cisPt100 = roztok sloučeniny cisplatiny v 100 µM koncentraci.

lig100 = roztok sloučeniny ligandu qaoH v 100  $\mu$ M koncentraci.

Buňky byly inkubovány se sloučeninami 24 hodin v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Následně byly buňky vyfoceny na optickém mikroskopu Olympus IX70, byla použita aplikace Quick photo microscope (viz Výsledky – obrázky) pro pořízení fotografií buněk.

Dále byl proveden MTT test pro zjištění životaschopnosti buněk. Do každé jamky bylo k médiu z předešlého dne přidáno 20  $\mu$ l MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid). Buňky se s MTT inkubovaly 4 hodiny. Následně bylo veškeré médium s MTT z jamek odsáto a do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l DMSO. Buňky se s přidaným DMSO inkubovaly 10 minut ve tmě (překryté alobalem) na třepačce. Následně byla měřena absorbance při 570 nm pomocí přístroje multidetekční reader Tecan infinite M200 pro (Schoeller Instruments).

Hodnoty absorbancí byly následně vyhodnoceny v programu Excel. Nejdříve byl vypočten průměr absorbancí z triplicátu vzorků buněk s různými koncentracemi testovaných sloučenin. Viabilita byla vypočtena jako podíl průměru absorbance vzorku buněk s testovanými sloučeninami a průměru absorbance kontrolních buněk (bez přidaných sloučenin), výsledek byl vynásoben 100.

Viabilita (životaschopnost) buněk vyjadřuje podíl mezi živými buňkami a všemi buňkami vynásobeným 100.

Testování viability bylo provedeno pro HaCat čtyřikrát, pro Cal27 pětkrát a pro HeLa dvakrát. Byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky viabilit buněk ze všech provedených měření a z těchto získaných hodnot byly sestrojeny grafy (viz Výsledky - obr. 11, 16, 21).

### 3.2.4 Průtoková cytometrie v analýze buněčného cyklu

V budoucnu by se pro další pokročilé testování cytotoxicity nových komplexů mohla použít metoda průtokové cytometrie. V následující kapitole je uveden postup měření buněčného cyklu.

Pro stanovení buněčného cyklu buněk ovlivněných různými koncentracemi komplexů [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) a cisplatiny byla použita metoda průtokové cytometrie (BD FACSVersé).

Průtoková cytometrie umožňuje stanovení více buněčných parametrů v jedné buňce zároveň. Tato metoda našla své uplatnění i při analýze buněčného cyklu, což nám umožňuje lépe porozumět mechanismu působení testované látky. (Šána a kol. 2017, 91)

Buněčný cyklus každé buňky je rozdělen do několika fází – G1, S, G2 a M, které na sebe navazují za předpokladu, že jsou splněny požadavky na buňky, které jsou monitorovány v kontrolních bodech. Pokud buňka nespĺňuje určité požadavky, například



má poškozené DNA či neprošla kompletní replikací, tak dochází k pozastavení buněčného cyklu, což lze měřit pomocí průtokové cytometrie. Základní podmínkou pro měření buněčného cyklu je odlišné množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. (Šána a kol. 2017, 98)

V jednotlivých fázích jsou markantní rozdíly, zatímco v G1 fázi je v jádru buňky 2N počet chromozomů, v G2 fázi se počet chromozomů zdvojnásobí na 4N (buňka se připravuje na dělení). (Šána a kol. 2017, 98-99)

Propidium jodid (PI) je fluorescenční látka schopná vázat se na nukleové kyseliny a používá se tak ke značení buněk. Píky G1 a G2 fáze se ve finálním grafu liší v intenzitě signálu získaným po přechodu buňky laserem. (Šána a kol. 2017, 98-99)

Vzorky pro průtokovou cytometrii mohou být automaticky dávkovány do cytometru z 96jamkové destičky pomocí autosampleru (BD FACS Universal loader).

#### **3.2.4.1 Postup měření buněčného cyklu buněk**

Cílem této metody je zjistit, kolik buněk se nachází v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Buněčný cyklus se testuje na třech stejných buněčných liniích jako u testování viability - Cal27, HaCat a HeLa. Pro každou buněčnou linii se testují odlišné koncentrace sloučenin [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) a cisplatinu podle toho, aby koncentrace zároveň vykazovaly cytotoxický účinek, ale současně, aby nebyla překročena hodnota IC<sub>50</sub> (inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> (inhibition concentration), při které dochází k zamezení růstu organismů). Pro sloučeninu ligandu qaoH se buněčný cyklus netestuje. Koncentrace sloučenin se opět testují v triplicátech.

Měření buněčného cyklu se provádí u buněčných linií Cal27 a HeLa a HaCat celkem třikrát.

První den jsou buňky vysazeny na 96jamkovou destičku. Každá jamka na destičce obsahuje 100 µl buněčné suspenze s 10000 buňkami. Následně se buňky inkubují 24 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Následující den jsou k buňkám přidány vybrané koncentrace (viz výše) látek. Požadované koncentrace jsou připravovány stejným způsobem jako při měření viability buněk. Pro testování buněčného cyklu se používá druhá série vzorků sloučenin.

Buňky jsou inkubovány se sloučeninami 24 hodin při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Třetí den jsou buňky připraveny k analýze buněčného cyklu na průtokovém cytometru. Nejdříve je od buněk odsáto všechno médium a do všech jamek s buňkami je napipetováno 100 µl PBS. Následně je PBS odsáto a k izolaci jader buněk je použit komerční kit BD Cycletest™ Plus DNA kit. Kit se používá podle návodu v příbalovém letáku.

Po promytí jamek s buňkami (100  $\mu$ l do každé jamky) PBS je do jamek přidáno 25  $\mu$ l roztoku A, buňky se 10 minut inkubují při pokojové teplotě. Následně je k roztoku A do jamek přidáno 20  $\mu$ l roztoku B, opět se buňky inkubují 10 minut při pokojové teplotě. Následně je přidáno ke sloučeninám A a B do jamek 20  $\mu$ l sloučeniny C, buňky se inkubují v lednici ve tmě 10 minut. Následně je obsah jamek 96jamkové destičky s izolovanými buněčnými jádry přepipetován do jedné nové 96jamkové destičky, která je vložena do průtokového cytometru BD FACSVerse™ (BD Biosciences) s BD FACS Universal loaderem.

K vyhodnocování dat průtokové cytometrie se používá program BD FACSuite™.

Výsledná data ukazují, kolik buněk se nachází v G1/G0, S nebo G2/M fázi buněčného cyklu. Z těchto dat se vypočte průměr ze všech provedených měření a výsledkem jsou sloupcové grafy, vyjadřující, kolik buněk se nachází v určitých fázích buněčného cyklu.

### **3.2.5 Barvení buněk kalceinem a propidium jodidem**

Pro testování viability buněk se využívá značení živých a mrtvých buněk fluorescenčními barvivy kalceinem a propidium jodidem.

Fluorescenční barvivo kalcein AM (AM znamená acetoxymethyl ester; excitační vlnová délka – 495 nm, emisní vlnová délka – 515 nm) je lipofilní barvivo, které prochází cytoplazmatickou membránou živých buněk. V buňce je kalcein AM přeměněn na kalcein, který je v buňce zadržován a produkuje zelený fluorescenční signál. V mrtvých nebo poškozených buňkách barvivo není zadržováno, proto tyto buňky nefluoreskují. (Bratosin a kol. 2005)

Propidium jodid (excitační vlnová délka – 535 nm, emisní vlnová délka – 617 nm) barví pouze mrtvé buňky, protože membrána živých buněk je pro něj nepropustná. Propidium jodid je barvivo s pozitivním nábojem, které se v jádře buňky interkaluje do DNA, která nese negativní náboj. (Kaneshiro a kol. 1993)

Buňky pro značení kalceinem a propidium jodidem byly připraveny stejným způsobem jako při stanovení viability a měření buněčného cyklu v předchozích kapitolách. První den byly buňky (HaCat, Cal27 a HeLa) rozesazeny na 96jamkové destičky (do každé jamky 10 000 buněk; 100  $\mu$ l buněčné suspenze). Další den byly k buňkám přidány sloučeniny testované na cytotoxicitu v koncentracích shodných jako pro měření buněčného cyklu (viz kapitola 3.2.4.2).

Roztok kalceinu byl připraven tak, že zásobní roztok kalceinu (4 mM) byl 80x zředěn, tak aby finální koncentrace roztoku kalceinu byla 50  $\mu$ M. Do mikrozkušavky se 158  $\mu$ l DMSO byly přidány 2  $\mu$ l zásobního roztoku kalceinu. Následně byl do každé jamky, s buňkami v médiu DMEM inkubovanými s testovanou sloučeninou, přidán 1  $\mu$ l připraveného roztoku kalceinu a 1  $\mu$ l roztoku propidium jodidu (koncentrace 1 mg/ml).

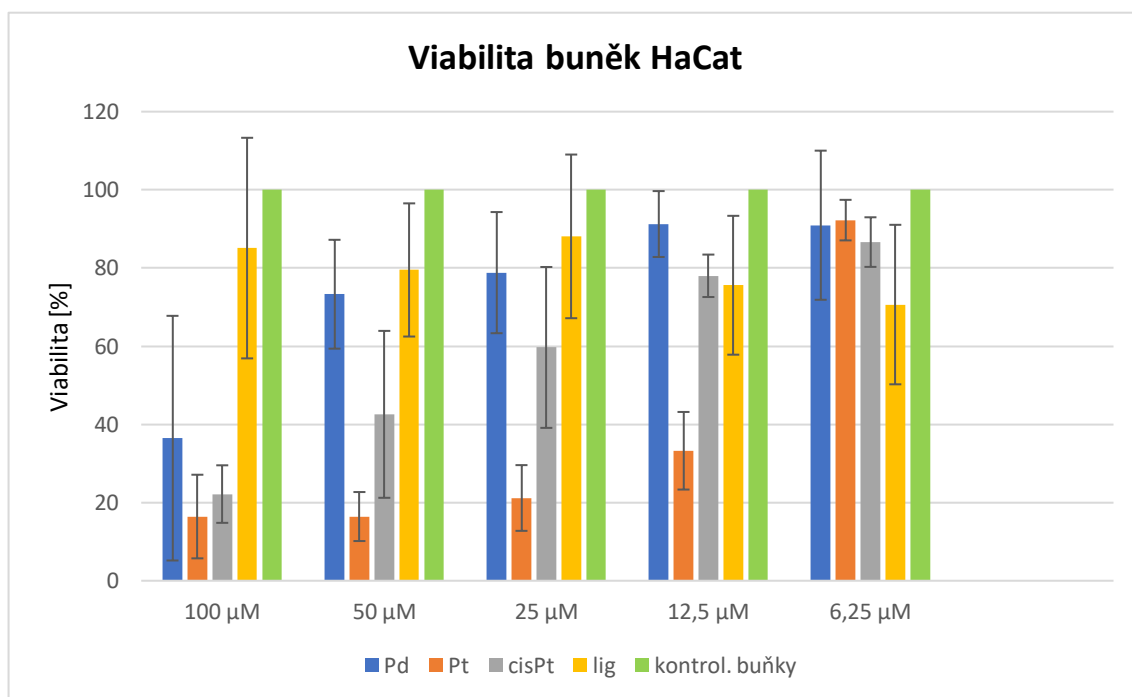
Buňky se s kalceinem a propidium jodidem 5 minut inkubovaly v inkubátoru (37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>). Poté bylo z jamek odsáto médium a do každé jamky bylo přidáno 50 µl PBS. Díky promytí buněk v PBS bylo dosaženo lepšího rozlišení a byly potlačeny šumy v pozadí.

96jamková destička byla vložena do světelného mikroskopu s fluorescenčním módem Olympus IX 70 a byla pozorována fluorescence buněk. Fotky buněk byly pořízeny v aplikaci QuickPHOTO CHAMERA 3.0.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Měření viability buněk HaCat

Pro všechny tři buněčné linie byly provedeny minimálně tři opakování měření viability pro danou koncentraci. Data ze spektrofotometrického měření byla následně zpracována v programu Excel, v němž byla vypočítána viabilita dané buněčné linie.



Obr. 11 – Graf viability buněk HaCat; Viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) je vyobrazena modře, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) je vyobrazena hnědě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi cisplatiny je vyobrazena šedě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny chinolin 2-aldoxim je vyobrazena žlutě, viabilita kontrolních buněk bez ovlivnění (inkubovaných 24 hodin ve standardních podmínkách) je vyobrazena zeleně.

V grafu na obr. 11 je vyobrazena závislost viability buněk na koncentraci sloučenin [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), cisplatiny, chinolin 2-aldoxim, se kterými byla inkubována netumorigenní buněčná linie HaCat. Téměř u všech sloučenin lze říci, že se snižující se koncentrací sloučenin roste viabilita buněk.

U koncentrací sloučenin, kde je hodnota viability větší než 80 %, považujeme tyto látky za biokompatibilní. Pokud je viabilita pod 80 %, vykazuje látka toxicitu.

Z grafu lze vyčíst, že nejvíce toxicky na buňky HaCat působí komplex [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), druhou nejvyšší toxicitu vykazuje cisplatina a nejméně toxicky na buňky působí komplex [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>).

Komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  (v grafu modrou barvou) působí na buňky nejméně toxicky v porovnání s dvěma dalšími sloučeninami.  $IC_{50}$  se pohybuje v rozmezí 50 - 100  $\mu M$ . Biokompatibilita (viabilita nad 80 %) byla stanovena u koncentrací 6,25 a 12,5  $\mu M$ .

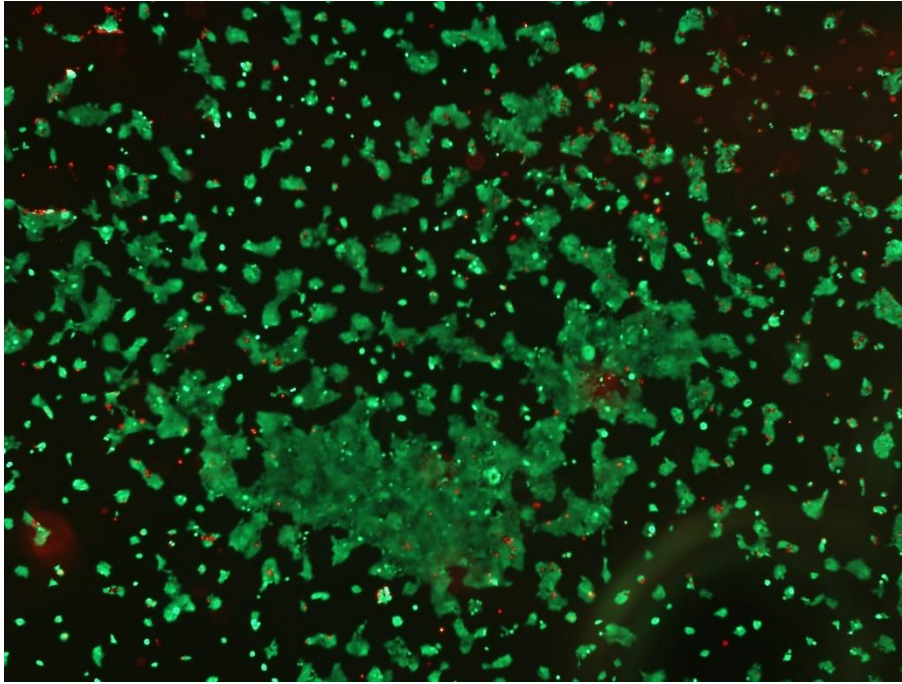
U komplexu  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  (v grafu oranžovou barvou) se  $IC_{50}$  pohybuje v rozmezí 6,25 – 12,5  $\mu M$ . Biokompatibilní koncentrace byla pouze u nejnižší - 6,25  $\mu M$ .

U běžně používané cisplatiny byla viabilita nad 80 % pouze u nejnižší koncentrace 6,25  $\mu M$ .  $IC_{50}$  se pohybuje v rozmezí 25 - 50  $\mu M$ .

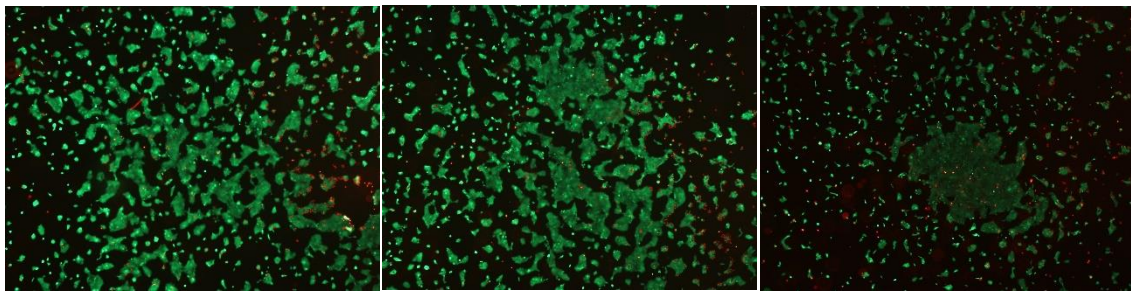
U ligandu chinolin 2-aldoxim (v grafu žlutě) se předpokládá, že není cytotoxický. Výsledky měření viability ukazují, že biokompatibilní koncentrace sloučeniny ligandu byly koncentrace 100  $\mu M$ , 50  $\mu M$  a 25  $\mu M$ . Nižší koncentrace (12,5  $\mu M$  a 6,25  $\mu M$ ) měly paradoxně viabilitu pod 80 %, což by se dalo přisoudit spíše špatnému ředění či měření, o čemž svědčí i velké rozpětí směrodatných odchylek.

## 4.2 Značení buněk HaCat fluorescenčními barvivy

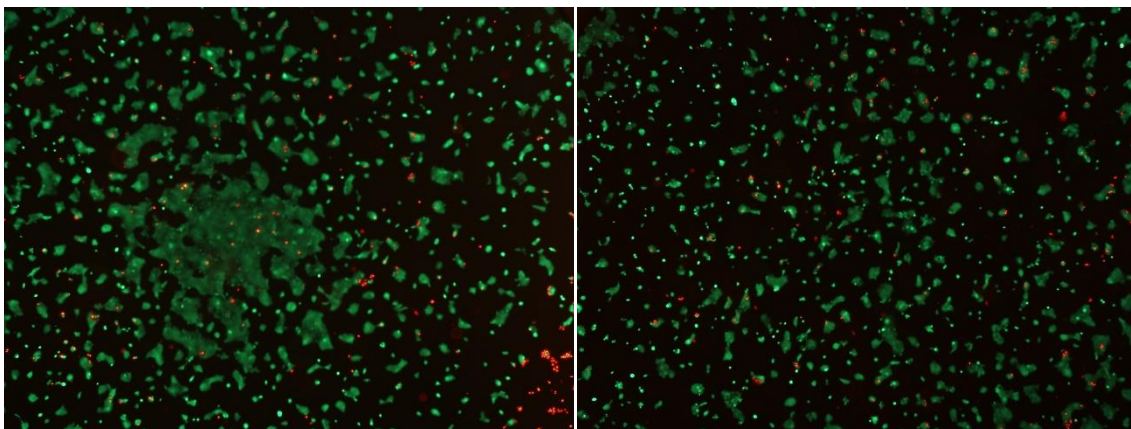
Pro porovnání výsledků z metody MTT byl proveden experiment barvení buněk fluorescenčními barvivy calceinem barvicím viabilní buňky a svítící zeleně a PI, které penetruje do jader mrtvých buněk a svítí červeně. Buňky byly připraveny stejně jako pro MTT. Na obr. 12 je snímek z optického fluorescenčního mikroskopu kontrolních buněk, kde buňky HaCat v převážné většině zorného pole svítí zeleně, tedy jsou viabilní. Na obr. 13, 14, 15 jsou zobrazeny buňky Hacat po 24 hod inkubaci s Pd, Pt komplexem a cisplatinou o vybraných koncentracích, které již měly cytotoxický efekt dle výsledků MTT. S rostoucí koncentrací přidané látky roste poměr červené ku zelené nebo případně zelené ubývá v zorném poli. Výsledky tak kvalitativně odpovídají výsledkům z MTT.



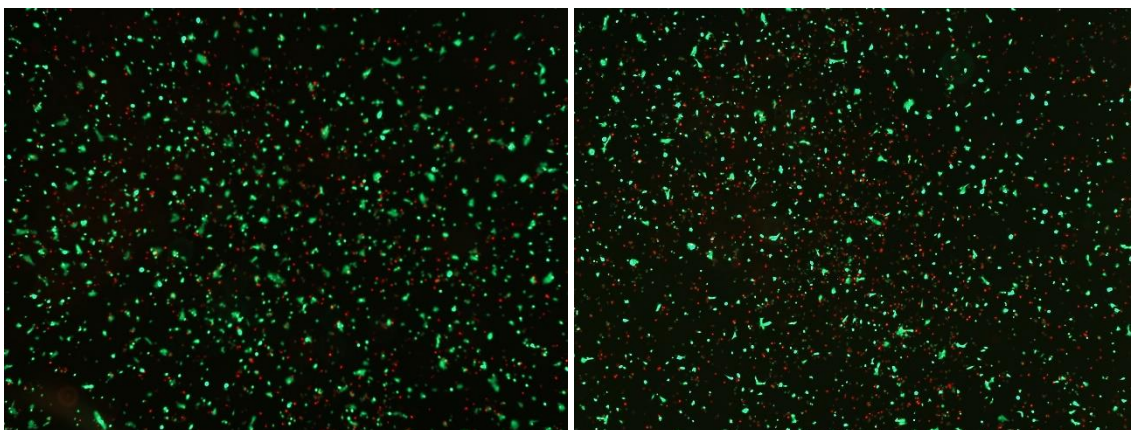
Obr. 12 – Kontrolní buňky HaCat inkubované 48 h v médiu DMEM, značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu$ M) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 13 – Buňky HaCat inkubované 24 hodin (zleva) s 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku komplexu  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ . Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x

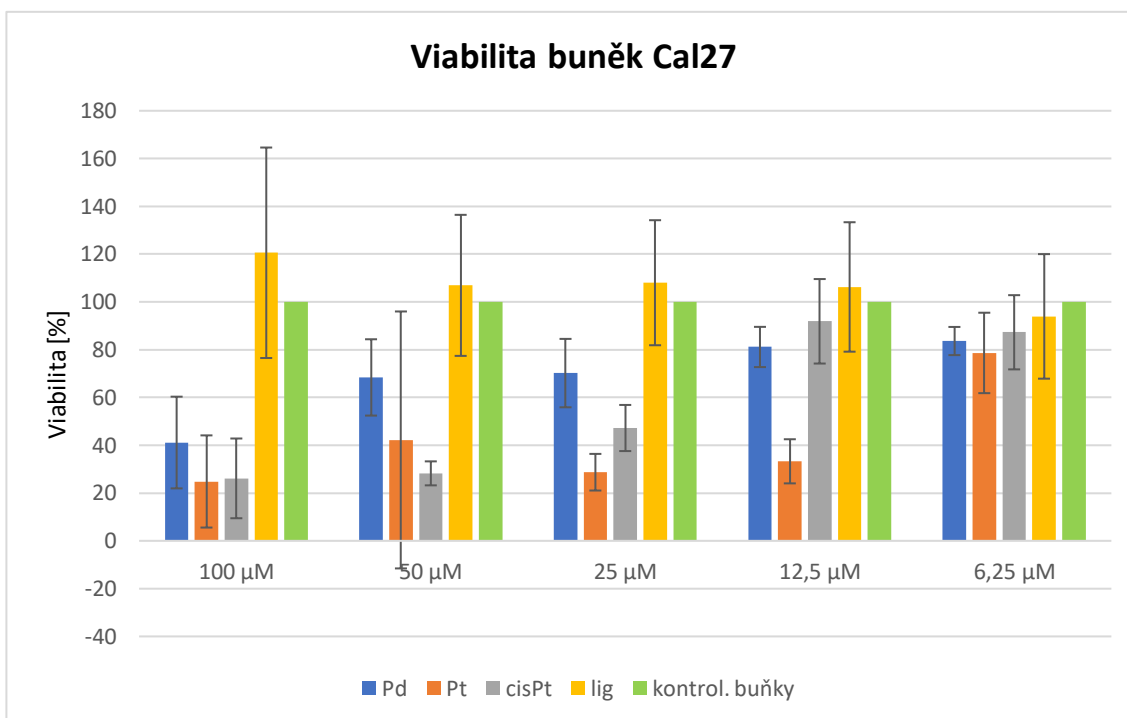


Obr. 14 – Buňky HaCat inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku komplexu  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ . Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 15 – Buňky HaCat inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku cisplatinu. Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x

### 4.3 Měření viability buněk Cal27



Obr. 16 – Graf viability buněk Cal27; Viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) je vyobrazena modře, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) je vyobrazena hnědě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi cisplatiny je vyobrazena šedě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny chinolin 2-aldoxim je vyobrazena žlutě, viabilita kontrolních buněk bez ovlivnění (inkubovaných 24 hodin ve standardních podmínkách) je vyobrazena zeleně.

V grafu na obr. 16 je vyobrazena závislost viability buněk na koncentraci sloučenin [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), cisplatiny, chinolin 2-aldoxim, se kterými byla inkubována nádorová buněčná linie Cal27. U většiny sloučenin lze říci, že se snižující se koncentrací sloučenin roste viabilita buněk.

U koncentrací sloučenin, kde je hodnota viability větší než 80 %, považujeme tyto látky za biokompatibilní.

Z grafu lze vyčíst, že nejvíce toxicky na buňky Cal27 působí komplex [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>), druhou nejvyšší toxicitu vykazuje cisplatina a nejméně toxicky na buňky působí komplex [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>).

Komplex [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) (v grafu modrou barvou) působí na buňky nejméně toxicky v porovnání s dvěma dalšími sloučeninami. IC<sub>50</sub> se pohybuje v rozmezí 50 - 100 μM. Biokompatibilita (viabilita nad 80 %) byla stanovena u koncentrací 6,25 a 12,5 μM.

U komplexu [Pt(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>) (v grafu oranžovou barvou) se IC<sub>50</sub> pohybuje v rozmezí 6,25 – 12,5 μM. Biokompatibilní zde nebyla žádná koncentrace (koncentrace by musela být ještě nižší než 6,25 μM).

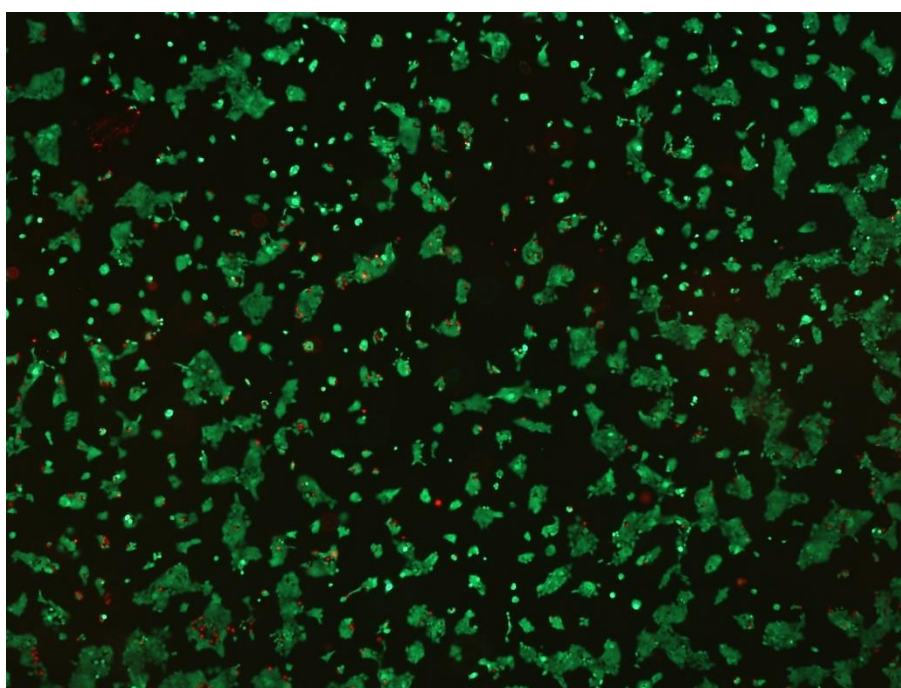


U běžně používané cisplatiny byla viabilita nad 80 % u koncentrací roztoku cisplatiny 6,25 – 12,5  $\mu\text{M}$ .  $\text{IC}_{50}$  se pohybuje v rozmezí 12,5 - 25  $\mu\text{M}$ .

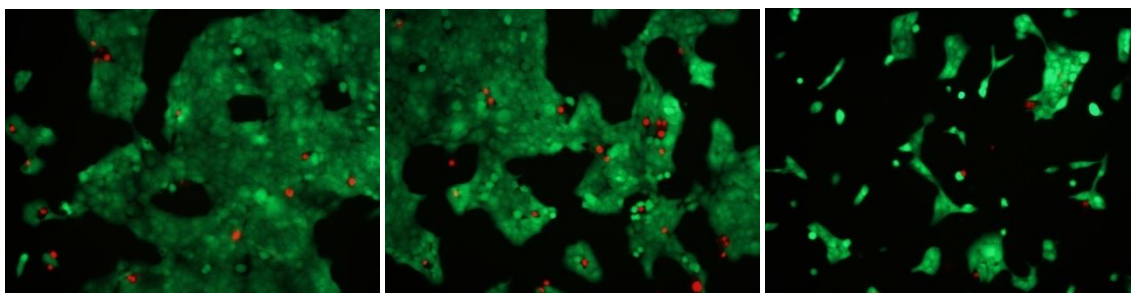
U ligandu chinolin 2-aldoxim (v grafu žlutě) se předpokládá, že není cytotoxický. Výsledky měření viability ukazují, že biokompatibilní koncentrace sloučeniny ligandu byly všechny testované koncentrace.

#### 4.4 Značení buněk Cal27 fluorescenčními barvivy

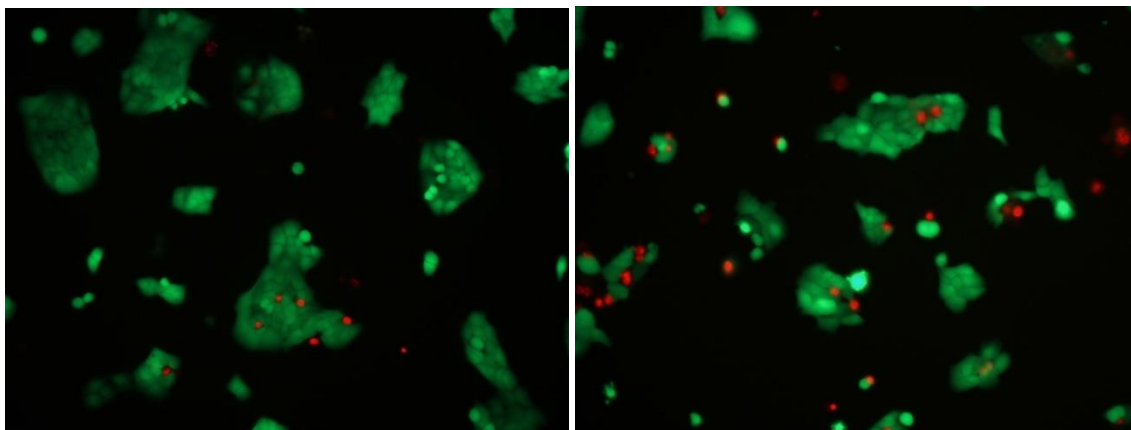
Stejně jako v kapitole 4.2. byly buňky Cal27 obarveny kalceinem a PI. Opět je vidět v porovnání s kontrolními buňkami (obr.17) závislost vzrůstající koncentrace látek na úbytku zelené barvy a nárůstu červených mrtvých buněk viz obr. 18, 19, 20.



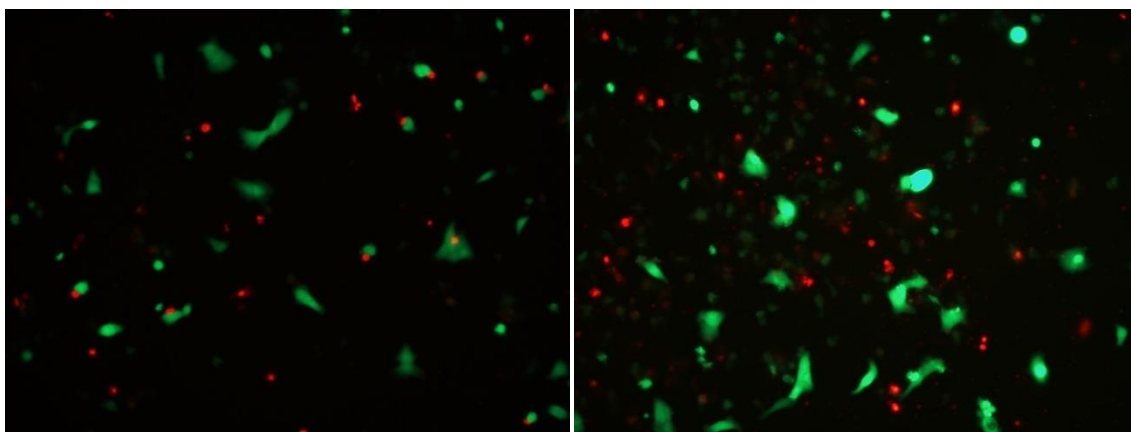
Obr. 17 – Kontrolní buňky Cal27 inkubované 48 h v médiu DMEM, značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 18 – Buňky Cal27 inkubované 24 hodin (zleva) s 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku komplexu  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ . Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 20x

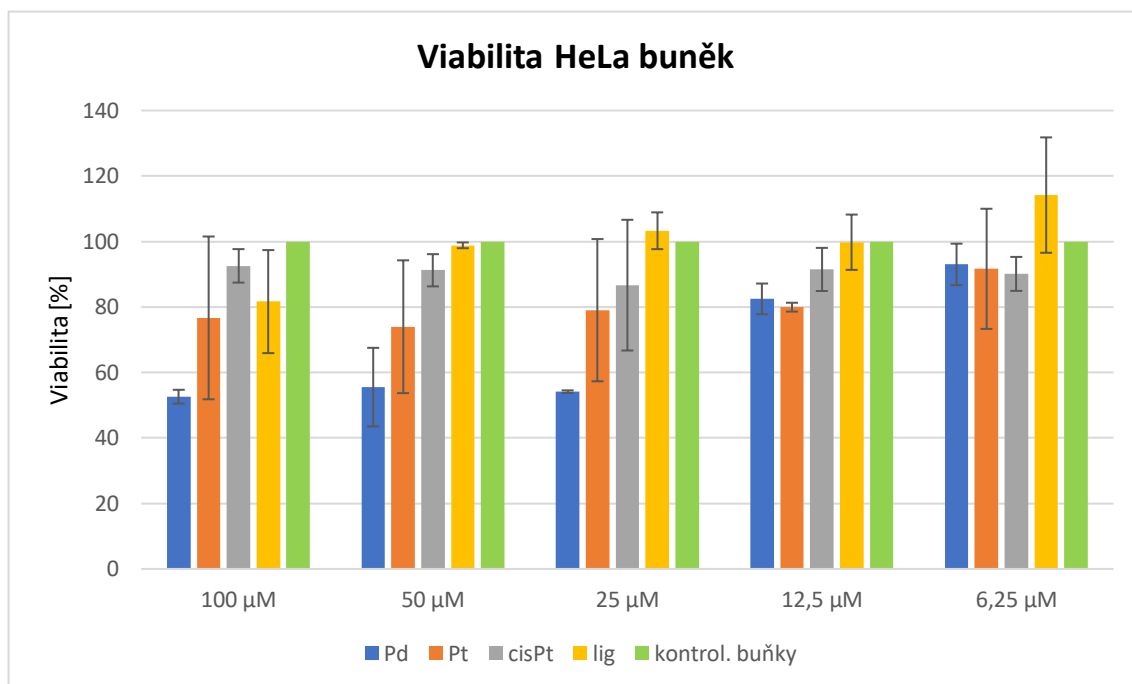


Obr. 19 – Buňky Cal27 inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku komplexu  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ . Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 20x



Obr. 20 – Buňky Cal27 inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku cisplatinu. Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 20x

## 4.5 Měření viability buněk HeLa



Obr. 21 – Graf viability buněk HeLa; Viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  je vyobrazena modře, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  je vyobrazena hnědě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi cisplatiny je vyobrazena šedě, viabilita buněk inkubovaných 24 hodin s 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM a 6,25 μM koncentracemi sloučeniny chinolin 2-aldoxim je vyobrazena žlutě, viabilita kontrolních buněk bez ovlivnění (inkubovaných 24 hodin ve standardních podmínkách) je vyobrazena zeleně.

V grafu na obr. 21 je vyobrazena závislost viability buněk na koncentraci sloučenin  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ ,  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ , cisplatiny, chinolin 2-aldoxim, se kterými byla inkubována nádorová buněčná linie HeLa. Téměř u všech sloučenin lze říci, že se snižující se koncentrací sloučenin roste viabilita buněk.

Z grafu lze vyčíst, že nejvíce toxicky na buňky HeLa působí komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ , následně komplex  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ , naopak nejméně cytotoxicky na buňky působí cisplatin.

Komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  (v grafu modrou barvou) působí na buňky nejvíce toxicky v porovnání s dvěma dalšími sloučeninami.  $IC_{50}$  se pohybuje v rozmezí 50 - 100 μM. Biokompatibilita (viabilita nad 80 %) byla stanovena u koncentrací 6,25 a 12,5 μM.

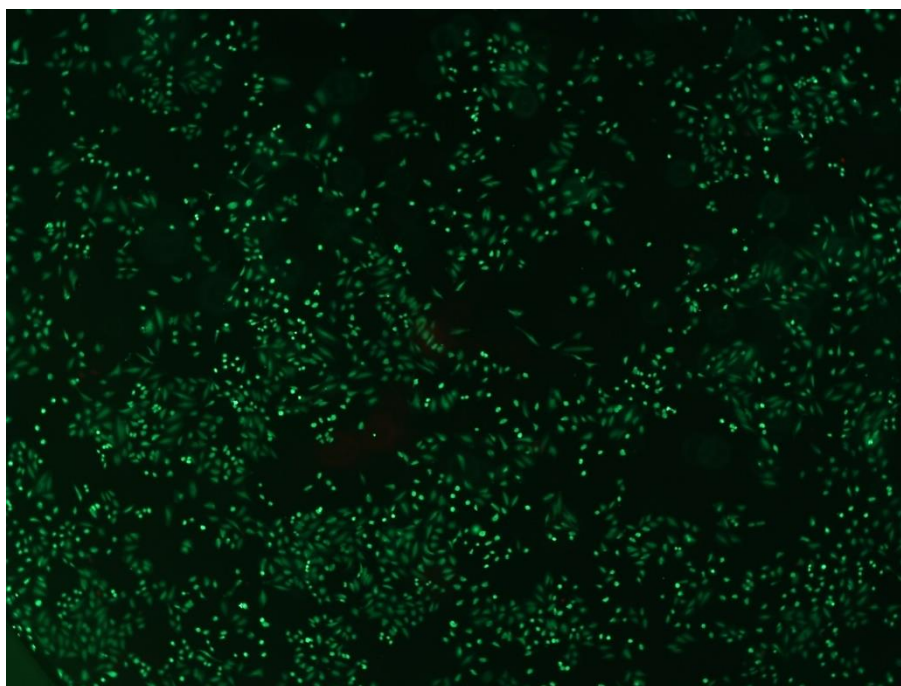
U komplexu  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  (v grafu oranžovou barvou) je  $IC_{50}$  kolem 100 μM koncentrace. Biokompatibilní koncentrace byla pouze 6,25 μM.

U běžně používané cisplatiny byla viabilita nad 80 % u všech testovaných koncentrací.

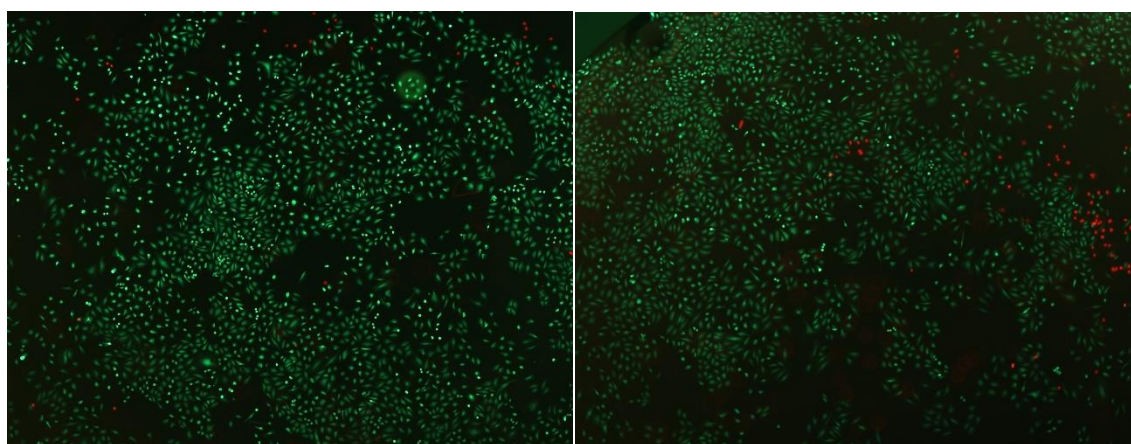
U ligandu chinolin 2-aldoxim (v grafu žlutě) se předpokládá, že není cytotoxický. Výsledky měření viability ukazují, že biokompatibilní koncentrace sloučeniny ligandu byly všechny testované koncentrace 100 μM, 50 μM a 25 μM.

## 4.6 Značení buněk HeLa fluorescenčními barvivy

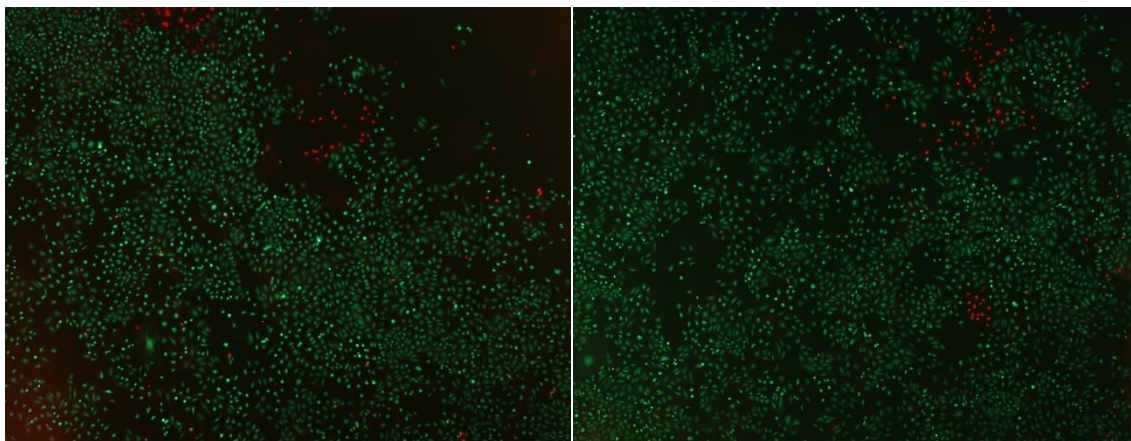
I v případě HeLa buněk bylo provedeno optické snímání obarevných buněk kalceinem a PI. Z obr. 22-25 je vidět že na HeLa buňky působí látky nejméně cytotoxicky, což odpovídá výsledkům z MTT. Oproti MTT výsledkům, kde Pd komplex vykazoval vyšší toxicitu než zbylé Pd a cisplatina, z obrázků z optického fluorescenčního mikroskopu 50 $\mu$ M koncentrace cisplatiny způsobila více než poloviční úbytek zeleně zbarvených buněk a velký nárůst červeně svítících buněk. Z těchto výsledků by se dalo usoudit, že 50  $\mu$ M koncentrace cisplatiny již dosahuje hodnoty IC 50, což je však v rozporu z výsledky z MTT.



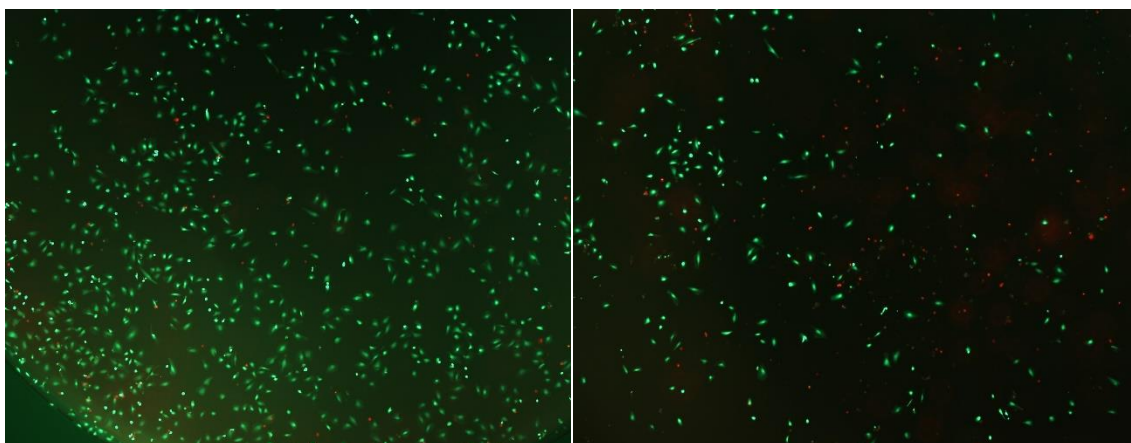
Obr. 22 – Kontrolní buňky HeLa inkubované 48 h v médiu DMEM, značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu$ M) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 23 – Buňky HeLa inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu$ M a 25  $\mu$ M koncentrací roztoku komplexu [Pd(qao)(qaoH)](NO<sub>3</sub>). Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu$ M) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 24 – Buňky HeLa inkubované 24 hodin (zleva) s 12,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku komplexu  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ . Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x



Obr. 25 – Buňky HeLa inkubované 24 hodin (zleva) s 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  koncentrací roztoku cisplatiny. Buňky byly značeny fluorescenčními barvivy kalceinem (50  $\mu\text{M}$ ) a propidium jodidem (1 mg/ml). Zvětšení: 4x

#### 4.7 Zhodnocení výsledků měření viability buněk

Z výše okomentovaných výsledků lze vyvodit závěr, že působením dvou nových potencionálně cytotoxických sloučenin a běžně používaným cytostatikem cisplatinou dostáváme různou odezvu signálu (viability) na třech vybraných buněčných liniích.

Podobný trend výsledků (hodnot viabilit) lze pozorovat u nenádorové buněčné linie HaCat a nádorové linie Cal27. U těchto dvou buněčných linií působí nejvíce cytotoxicky komplex  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ , druhou nejvyšší toxicitu vykazuje cisplatin a nejméně toxicky na buňky působí komplex  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ .

U nádorové buněčné linie HeLa byly výsledky odlišné. Nejvíce toxicky na buňky HeLa působí komplex  $[\text{Pd}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ , následně komplex  $[\text{Pt}(\text{qao})(\text{qaoH})](\text{NO}_3)$ , naopak nejméně cytotoxicky na buňky působí komplex cisplatin. V případě cisplatiny

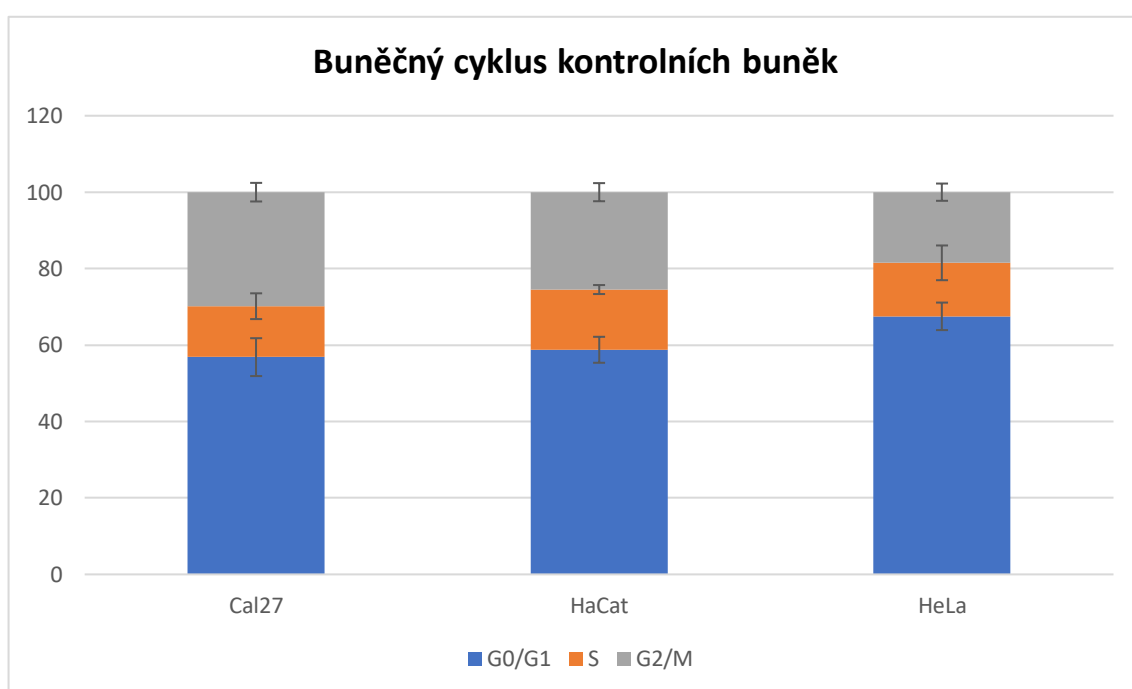
však bylo dle snímání z optického fluorescenčního mikroskopu vyzorováno, že u koncentrace 50  $\mu\text{M}$  je látka výrazně cytotoxická, což neodpovídá výsledkům z MTT.

Ligand chinolin 2-aldoxim byl u všech buněčných linií testován jako biokompatibilní.

Pro detailnější analýzu mechanismu účinku testovaných sloučenin na jejich buněčný cyklus je potřeba ještě provést další experimenty, jako například analýzu pomocí průtokové cytometrie.

#### 4.8 Měření buněčného cyklu kontrolních buněk

Buněčný cyklus byl měřen pomocí průtokového cytometru jen u kontrolních buněk (buněk neznačených žádnými sloučeninami) Cal27, HaCat a HeLa.



Obr. 26 – Rozdělení kontrolních buněk Cal27, HaCat a HeLa do třech fází buněčného cyklu (G0/G1, S, G2/M fáze), naměřeno pomocí průtokového cytometru. Modře jsou vyznačeny buňky v G0/G1 fázi, oranžově buňky v S fázi a šedě buňky v G2/M fázi.

Na obr. 26 je vidět histogram zachycující jednotlivé fáze G0/G1, S a G2/M pro všechny tři buněčné linie. Je vidět, že HeLa buňky mají oproti Cal27 a HaCat prodlouženou G0/G1 fázi a naopak zkrácenou fázi G2/M.

Do budoucna bude měřen buněčný cyklus buněčných linií s několika koncentracemi testovaných sloučenin.

## 5 Závěr

Mnoho vědeckých výzkumů naznačuje, že cytostatika založená na atomu různých kovů by mohla dosahovat stejné účinnosti v léčbě rakoviny jako běžně používané léčivo cisplatina, avšak s minimalizací vedlejších nežádoucích účinků na organismus pacienta. Nová léčiva by také pomohla vyřešit problém rezistence buněk k léčivům, což je jeden z největších problémů současných léčiv.

V bakalářské práci byla zkoumána cytotoxicita nových komplexů  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$  a  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  pro tři vybrané buněčné linie – HaCat, Cal27 a HeLa. Testována byla také cytotoxicita ligandu chinolin 2-aldoxim, který byl biokompatibilní (viabilita nad 80 %) při všech provedených MTT testech.

Na buňky HaCat působil nejvíce cytotoxicky komplex  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$  – koncentrace 12,5  $\mu M$  a vyšší byly cytotoxické, druhou nejvyšší toxicitu vykazovala cisplatina, která působila cytotoxicky od koncentrace 12,5  $\mu M$  a vyšší. Nejméně toxicky na buňky působil komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ , kde byla sloučenina cytotoxická od koncentrace 25  $\mu M$  a vyšší.

U buněčné linie Cal27 nejvíce toxicky na buňky působil komplex  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ . Cytotoxické byly všechny testované koncentrace, druhou nejvyšší toxicitu vykazovala cisplatina, kde byly cytotoxické koncentrace 25  $\mu M$  a vyšší. Nejmenší cytotoxicitu na buňky vykazoval komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ , kde byly cytotoxické koncentrace 25  $\mu M$  a vyšší.

Pro buněčnou linii HeLa byl nejvíce cytotoxický na buňky komplex  $[Pd(qao)(qaoH)](NO_3)$ , cytotoxicky zde působily koncentrace 25  $\mu M$  a vyšší. Následně druhou nejvyšší cytotoxicitu vykazoval komplex  $[Pt(qao)(qaoH)](NO_3)$ , naopak nejméně cytotoxicky na buňky působí cisplatina, u které žádná z testovaných koncentrací nepůsobila na buňky cytotoxicky.

Pro potvrzení mechanismu účinku byly všechny buněčné linie značeny fluorescenčními brávy. Při porovnání pozorování buněk v optickém fluorescenčním mikroskopu u buněčných linií Cal27 a HaCat se výsledky shodovaly s výsledky MTT testu. U buněčné linie HeLa jsou výsledky pozorování ve fluorescenčním mikroskopu v rozporu s výsledky získanými MTT testem.

Do budoucna bude pro detailnější pochopení mechanismu cytotoxicity nových komplexů palladia a platiny nutno provést další testy. Naplánováno je testování buněčného cyklu buněk inkubovaných s roztoky komplexů. Zatím byl naměřen buněčný cyklus kontrolních buněk Cal27, HaCat a HeLa inkubovaných pouze v živném médiu ve třech opakováních.

## 6 Použitá literatura

- Adey A., Burton J. N., Kitzman J. O., Hiatt J. B., Lewis A. P., Martin B. K., Qiu R. L., Lee C. a Shendure J. (2013) The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* **500** (7461), 207-212.
- Alam M. N. a Huq F. (2016) Comprehensive review on tumour active palladium compounds and structure-activity relationships. *Coordination Chemistry Reviews*, **316**, 36-67.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. a Fusenig N. E. (1988) NORMAL KERATINIZATION IN A SPONTANEOUSLY IMMORTALIZED ANEUPLOID HUMAN KERATINOCYTE CELL-LINE. *Journal of Cell Biology* **106** (3), 761-771.
- Brabec V., Kleinwachter V., Butour J. L. a Johnson N. P. (1990) BIOPHYSICAL STUDIES OF THE MODIFICATION OF DNA BY ANTITUMOR PLATINUM COORDINATION-COMPLEXES. *Biophysical Chemistry* **35** (2-3), 129-141.
- Bratosin D., Mitrofan L., Pali C., Estaquier J. a Montreuil J. (2005) Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A* **66A** (1), 78-84.
- Calo C. A., Smith B. Q., Dorayappan K. D. P., Saini U., Lightfoot M., Wagner V., Kalaiyarasan D., Cosgrove C., Wang Q. E., Maxwell G. L., Kalai T., Kuppusamy P., Cohn D. E. a Selvendiran K. (2022) Aberrant expression of TMEM205 signaling promotes platinum resistance in ovarian cancer: An implication for the antitumor potential of DAP compound. *Gynecologic Oncology* **164** (1), 136-145.
- Cheng H., Huq F., Beale P. a Fisher K. (2006) Synthesis, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of a trinuclear complex: {trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}-[trans-Pd(NH<sub>3</sub>) (2-hydroxypyridine)-(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] Cl-4. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41** (7), 896-903.
- Dasari S. a Tchounwou P. B (2014) Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* **740**, 364-378.
- Duan M. R., Ulibarri J., Liu K. J. a Mao P. (2020) Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (23).
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M. a Kroemer G. (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31** (15), 1869-1883.
- Ghosh S. (2019) Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* **88**.



- Gioanni J., Grosgeorge J., Zanghellini E., Mazeau C., Gaudray P., Ettore F., Formento P. a Demard F. (1993) CHARACTERIZATION OF CAL39, A NEW HUMAN CELL-LINE DERIVED FROM A VULVAR SQUAMOUS-CELL CARCINOMA. *International Journal of Oncology* **3** (2), 293-297.
- He M., Rosen J., Mangiameli D. a Libutti S. K. (2007) Cancer development and progression. *Microarray Technology and Cancer Gne Profiling* **593**, 117-133.
- Huq F., Daghri H., Yu J. Q., Tayyem H., Beale P. a Zhang M. (2004) Synthesis, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of {trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>} {mu-(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)} trans-PdCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (NO<sub>3</sub>)Cl. *European Journal of Medicinal Chemistry* **39** (11), 947-958.
- Ivankovic M., Cukusic A., Gotic I., Skrobot N., Matijasic M., Polancec D. a Rubelj I. (2007) Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology* **8** (2), 163-172.
- Jiang L., Ji N., Zhou Y., Li J., Liu X. T., Wang Z., Chen Q. M. a Zeng X. (2009) CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncology* **45** (11), E204-E207.
- Kaneshiro E. S., Wyder M. A., Wu Y. P. a Cushion M. T. (1993) RELIABILITY OF CALCEIN ACETOXY METHYL-ESTER AND ETHIDIUM HOMODIMER OR PROPIDIUM IODIDE FOR VIABILITY ASSESSMENT OF MICROBES. *Journal of Microbiological Methods* **17** (1), 1-16.
- Koumoussi E. S., Zampakou M., Raptopoulou C. P., Psycharis V., Beavers C. M., Teat S. J., Psomas G. a Stamatatos T. C. (2012). First Palladium(II) and Platinum(II) Complexes from Employment of 2,6-Diacetylpyridine Dioxime: Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization, and Biological Evaluation. *Inorganic Chemistry* **51** (14), 7699-7710.
- Krieger M. L., Eckstein N., Schneider V., Koch M., Royer H. D., Jaehde U. a Bendas G. (2010) Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **389** (1-2), 10-17.
- Liberti M. V. a Locasale J. W. (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* **41** (3), 211-218.
- Linhart, I. a Novák J. (2002) Deriváty purinových bází jako indikátory poškození DNA. *Chemické listy* **96**, 276 - 28.
- Lucey B. P., Nelson-Rees W. A. a Hutchins G. M. (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **133** (9), 1463-1467.

- Maccio A. a Madeddu C. (2013) Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy - from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **14** (13), 1839-1857.
- Makovec T. (2019) Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology* **53** (2), 148-158.
- Massoud S. S., Louka F. R., Dial M. T., Malek A. J., Fischer R. C., Mautner F. A., Vanco J., Malina T., Dvorak Z. a Travnicek Z. (2021) Identification of potent anticancer copper(II) complexes containing tripodal bis 2-ethyl-di(3,5-dialkyl-1H-pyrazol-1-yl) amine moiety. *Dalton Transactions* **50** (33), 11521-11534.
- Matthews H. K., Bertoli C. a de Bruin R. A. M. (2022) Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **23** (1), 74-88.
- McLendon K. a Britini Sternard T. (2021). "Anaphylaxis." accessed February 2, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482124/>.
- Michalová E., Popracha A., Němečková I., Nenutil R., Valík D., Žaloudík J., Vyzula R. a Vojtěšek B. (2008) Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům *ex vivo* - úskalí a limitace vlastní metody. *Klinická onkologie* **21** (3), 93-97
- Mokhtari R. B., Homayouni T. S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B. a Yeger H. (2017) Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **8** (23), 38022-38043.
- Pehalova L., Krejci D., Snajdrova L. a Dusek L. (2021) Cancer incidence trends in the Czech Republic. *Cancer Epidemiology* **74**.
- Petruželka L. a Konopásek B. (2003) *Klinická onkologie*. 9-28, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Qi R. G., Xiao H. H., Wu S. H., Li Y. X., Zhang Y. a Jing X. B. (2015) Design and delivery of camplatin to overcome cisplatin drug resistance. *Journal of Materials Chemistry B* **3** (2), 176-179.
- Quiroga A. G., Perez J. M., Lopez-Solera I., Montero E. I., Masaguer J. R., Alonso C. a Navarro-Ranninger C. (1998) Binuclear chloro-bridged palladated and platinated complexes derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxicity against cisplatin resistant tumor cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry* **69** (4), 275-281.
- Rahbari R., Sheahan T., Modes V., Collier P., Macfarlane C. a Badge R. M. (2009) A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* **46** (4), 277-284.

- Ryvolova M., Smerkova K., Chomoucka J., Hubalek J., Adam V. a Kizek R. (2013) Glutathione modified CdTe quantum dots as a label for studying DNA interactions with platinum based cytostatics. *Electrophoresis* **34** (6), 801-808.
- Scattolin T., Voloshkin V. A., Visentin F. a Nolan S. P. (2021) A critical review of palladium organometallic anticancer agents. *Cell Reports Physical Science* **2** (6).
- Schoop V. M., Mirancea N. a Fusenig N. E. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **112** (3), 343-353.
- Serrano F. A., Matsuo A. L., Monteforte P. T., Bechara A., Smaili S. S., Santana D. P., Rodrigues T., Pereira F. V., Silva L. S., Machado J., Santos E. L., Pesquero J. B., Martins R. M., Travassos L. R., Caires A. C. F. a Rodrigues E. G. (2011) A cyclopalladated complex interacts with mitochondrial membrane thiol-groups and induces the apoptotic intrinsic pathway in murine and cisplatin-resistant human tumor cells. *Bmc Cancer* **11**.
- Shen D. W., Pouliot L. M., Hall M. D. a Gottesman M. M. (2012) Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews* **64** (3), 706-721.
- Song H. Q., Li W. L., Qi R. G., Yan L. S., Jing X. B., Zheng M. H. a Xiao H. H. (2015) Delivering a photosensitive transplatin prodrug to overcome cisplatin drug resistance. *Chemical Communications* **51** (57), 11493-11495.
- Starha P., Travnicek Z. a Popa I. (2009) Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of the first palladium(II) oxalato complexes involving adenine-based ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103** (7), 978-988.
- Šána J., Slabý O., Bešše A., Juráček J., Lízal P., Vaňáčková J., Nekvindová J. a Radová L. (2017) Úvod do molekulární medicíny, 69-70; 81-82; 91-99, Masarykova Univerzita, Brno
- Tao K., Bai X. Z., Zhang Z. F., Shi J. H., Li X. Q., Tang C. W., Hu D. H. a Han J. T. (2013) Construction of the tissue engineering seed cells (HaCaT-EGF) and analysis of its biological characteristics. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **6** (11), 893-896.
- Weinberg R. A. (1996). "How cancer arises." *Scientific American* **275** (3), 62-70.
- Yang X. Z., Du X. J., Liu Y., Zhu Y. H., Liu Y. Z., Li Y. P. a Wang J. (2014) Rational Design of Polyion Complex Nanoparticles to Overcome Cisplatin Resistance in Cancer Therapy. *Advanced Materials* **26** (6), 931-936.