

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Efekt nového komplexu ruthenia s protinádorovým účinkem na buňky karcinomu tlustého střeva s různou invazní schopností

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Dana Habrová**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Dana Habrová
Název práce	Efekt nového komplexu ruthenia s protinádorovým účinkem na buňky karcinomu tlustého střeva s různou invazní schopností
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Kolorektální karcinom je často se vyskytující závažné onemocnění. Léčba tohoto onemocnění může být komplikována tvorbou metastáz, které u některých typů kolorektálního karcinomu vznikají v dalších orgánech. Stále se tedy hledají nové způsoby léčby či nová léčiva účinná i na vzdálené metastázy. V oblasti metalofarmak jsou rozšířené komplexy platiny, které však často působí vedlejší účinky. Kvůli těmto nedostatkům se vývoj metalofarmak zaměřil na možné využití rutheniových komplexů. V této práci proto byl testován nový komplex ruthenia s naftopyranovým ligandem, kdy byl zkoumán jeho vliv na buněčné linie kolorektálního karcinomu. Komplex byl podroben testu antiproliferativní aktivity, testu zacelování rýhy a re-adheznímu testu. Z dosažených výsledků byla prokázána antiproliferativní a antimigrační aktivita, rovněž tak schopnost této látky ovlivnit re-adhezi. Lze proto předpokládat, že tento nový komplex má do budoucna slibné využití.</p>
Klíčová slova	kolorektální karcinom, rutheniový komplex, antiproliferativní aktivita, antimigrační aktivita
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Dana Habrová
Title of thesis	Effect of a novel ruthenium complex with antitumor activity on colon cancer cells with different invasive capacity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	Colorectal cancer is a frequently occurring serious disease. Treatment of this disease can be complicated by the formation of metastases, which in some types of colorectal cancer occur in other organs. Therefore, new treatments or new drugs that are effective even for distant metastases are still being sought. Platinum complexes are widespread in the field of metallodrugs, but often cause side effects. Because of these shortcomings, the development of metallodrugs has focused on the possible use of ruthenium complexes. Therefore, a new ruthenium complex with a naphthopyran ligand was tested in this work on colon cancer cell lines. The complex was subjected to antiproliferative activity test, wound-healing assay and re-adhesion test. From the results obtained, antiproliferative and antimigratory activity was demonstrated as well as the ability of this substance to affect re-adhesion. Therefore, it can be assumed that this new complex has promising applications in the future.
Keywords	colorectal cancer, ruthenium complex, antiproliferative activity, antimigratory activity
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. a za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 11. 5. 2023

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za odborné vedení a konzultace k mé bakalářské práci a to nejen při psaní, ale především v laboratoři, kde jsem mohla převzít cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat za poskytnutí buněk Ústavu molekulární a translační medicíny a profesoru B. Kepplerovi z Univerzity ve Vídni (Rakousko). Mé poděkování rovněž patří projektu IGA_PřF_2023_023 za pořízení materiálu použitého při experimentech.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Komplexy platiny s protinádorovým účinkem	11
3.1.1 Cisplatina	11
3.1.2 Karboplatina	13
3.1.3 Oxaliplatina	14
3.1.4 Nedaplatina	14
3.1.5 Heptaplatina a lobaplatina	15
3.1.6 Satraplatina	16
3.2 Komplexy ruthenia s protinádorovým účinkem	17
3.2.1 První komplexy ruthenia v klinické studii	19
3.2.2 Aren-rutheniové komplexy	21
3.3 Nádorové onemocnění a tvorba metastáz	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Materiál	25
4.1.1 Chemické látky	25
4.1.2 Komplexy ruthenia a platiny	25
4.1.3 Roztoky	26
4.1.4 Biologický materiál	27
4.1.5 Laboratorní přístroje a software	27
4.2 Metody	28
4.2.1 Kultivace buněčných linií	28
4.2.2 Počítání buněk	28
4.2.3 Měření antiproliferativní aktivity	29
4.2.4 Test vlivu na migrační aktivitu buněk	30
4.2.5 Re-adhezní test	31
4.3 Výsledky	32
4.3.1 Měření antiproliferativní aktivity	32
4.3.2 Test vlivu na migrační aktivitu buněk	33
4.3.3 Re-adhezní test	37
4.4 Diskuze	38
5. ZÁVĚR	41

6. SEZNAM LITERATURE42

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATB	antibiotika (směs Penicilinu a Streptomycinu)
cDDP	<i>cis</i> -diammindichloroplatnatý komplex, cisplatina
CL	cross-linking, zesíťování vláken DNA
DACH	1,2-diaminocyklohexan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EPR	jev zvýšené permeability a retence u nádorových cév
ER	endoplasmatické retikulum
FBS	fetální hovězí sérum
HSA	lidský sérový albumin, human serum albumin
PBS	fosfátový pufr
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfaadamantanový ligand, součást komplexů RAPTA
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 médium
SRB	sulforhodamine B, sulforhodamin B
TCA	trichloroacetic acid, kyselina trichloroctová

1. ÚVOD

Rakovina, jakožto velmi nebezpečné a těžce léčitelné onemocnění, je cílem vývoje léčiv a právě výzkum stále nových metalofarmak se stal nedílnou součástí tohoto vývoje. V současné době jsou v České republice v klinické praxi k léčbě rakoviny schválena metalofarmaka na bázi platiny, látky na bázi dalších těžkých kovů jsou ve fázi výzkumu. Mezi prvními zavedenými léky na bázi platiny byl komplex cisplatiny (*cis*-diammindichloroplatnatý komplex, cDDP). Po cisplatině vstoupily do klinických studií i další komplexy a některé z nich byly úspěšně zavedeny do klinické praxe. Komplexy platiny působí skrze jejich vazbu na DNA a tím její poškození, nicméně jejich selektivita je nízká a často působí i na zdravé buňky a způsobují nežádoucí účinky. Dalším vyskytujícím se problémem je rezistence vůči platinovým lékům (Bai et al., 2017). Alternativa byla spatřena v komplexech ruthenia. Tyto komplexy vykazují vyšší selektivitu a nižší toxicitu, což je činí atraktivními léky. Několik z nich se rovněž dostalo do fáze klinických studií (Liu et al., 2019).

V této práci byl podroben experimentům nový rutheniový komplex (dichlorido(*p*-cymen)[2-amino-4-(pyridin-4-yl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitril]ruthenium(II)), jehož účinky byly sledovány na liniích kolorektálního karcinomu. Tento typ rakoviny se řadí k onemocněním s častým výskytem a schopností metastazovat, což značně omezuje jeho léčbu. Proto byl nový rutheniový komplex testován na jeho antiproliferativní a antimigrační aktivitu s cílem posoudit jeho potenciál jako budoucí plnohodnotné léčivo. Pro zkoumání těchto vlastností byly vybrány tři linie odvozené od kolorektálního karcinomu s různě invazní schopností a to buněčné linie HT-29, HCT-116 a SW-620.

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Na základě literárních zdrojů připravit přehledný text k uvedené problematice.
- 2) Vybrat vhodné buněčné linie s invazním a neinvazním fenotypem pro testování.
- 3) Zvládnout práci s buněčnými kulturami a osvojit si další potřebné metody.
- 4) Testovat vliv komplexu ruthenia na buňky lidského kolorektálního karcinomu, zejména stanovit antiproliferativní aktivitu a antimetastatický potenciál dané látky.

3. TEORETICKÁ ČÁST

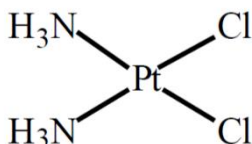
3.1 Komplexy platiny s protinádorovým účinkem

Léky na bázi platiny jsou známy již řadu let. Jedním z prvních komplexů používaných v protinádorové terapii byla cisplatina, která se stala předlohou pro vývoj dalších platinových léků. Z tohoto důvodu sdílí řada komplexů na bázi platiny podobný mechanismus působení, který zahrnuje kovalentní vazbu na DNA. Při vazbě komplexu na DNA dochází k jejímu poškození, což následně vede k buněčným opravným mechanismům nebo k buněčné smrti nádorových buněk.

Komplexy platiny se navzájem liší oxidačními stavy, geometrií, rychlostí substituce ligandů za vodu a typech ligandů. Mezi platinové komplexy nejčastěji používané jako protinádorová léčiva patří společně s cisplatinou i karboplatina nebo oxaliplatina (Bergamo and Sava, 2015), které jsou schváleny pro klinické aplikace také v České republice.

3.1.1 Cisplatina

Cisplatina je neutrální koordinační komplex s platinovým centrálním atomem v oxidačním stavu II. Na centrální atom jsou navázány dva chloridové ionty a dva amminy (NH_3) v *cis* geometrii (obr. 1). Tyto NH_3 skupiny jsou vázány pevně koordinační vazbou, zatímco chloridové ligandy jsou vázány slaběji a proto snadno podléhají neenzymatické transformaci (Pierre et al., 2011) a ve vodném prostředí disociují, jsou nahrazovány vodou. Pokud se bude komplex nacházet v prostředí s vysokou koncentrací chloridových iontů, bude v roztoku převládat nehydrolyzovaná cisplatina.



Obrázek 1-Chemická struktura cisplatiny (převzato z Ott and Gust, 2007).

Tohoto jevu se využívá při intravenózním podávání léčiva, kdy je v krvi koncentrace chloridů vysoká a komplex není disociován. Až po vstupu do buňky, kde je nižší koncentrace chloridů, jsou chloridové ligandy v cisplatině nahrazeny vodou. V takovémto stavu je cisplatina aktivní a reaguje s nukleofilními činidly, konkrétně s donorovými atomy dusíku nukleových

kyselin (Kartalou and Essigmann, 2001). Při této interakci dochází k tvorbě vnitrořetězcových křížových vazeb neboli zesíťování (cross-linking, CL) a to v poloze N7 imidazolového kruhu, tyto vytvořené můstky se nazývají adukty. CL dvou sousedních guaninů tvoří až 60-65 % všech aduktů. V zastoupení 20 % se také tvoří vazby mezi jedním adeninem a jedním guaninem. V menší míře se také objevují monofunkční adukty, meziřetězcové CL, DNA-platina-protein CL nebo zesíťování, které spojuje dva guaniny oddělené další vymezenou bází (Brabec et al., 2017).

Tvorba aduktů narušuje konformaci DNA a je pravděpodobně zodpovědná za cytotoxické účinky. Vazba cisplatiny na sousední guaniny vytvoří 1,2-vnitrořetězcové CL, které „nutí“ DNA řetězec k ohybu směrem k velkému žlábků. Tato interakce je rozpoznávána buněčnými proteiny. Po rozpoznání může být poškozený řetězec DNA opraven opravnými buněčnými mechanismy nebo naopak může dojít k aktivaci postupů, které způsobí zánik buňky skrze apoptózu (Wexselblatt et al., 2012). Cytotoxicitu cisplatiny lze ovlivnit teplotou, jelikož s rostoucí teplotou roste množství meziřetězcových CL. Meziřetězcové CL také narušují konformaci DNA, ale jiným způsobem než 1,2-vnitrořetězcové CL. V tomto případě je dvoušroubovice přetočena do levotočivé formy podobající se Z-DNA, což způsobí rozvinutí helixu a následnou apoptózu. V malé míře se také mohou vyskytovat DNA-proteinové CL cisplatiny, které vznikají z monofunkčních aduktů či vnitrořetězcových CL. Toto uskupení inhibuje polymeraci DNA nebo bývá odstraněno opravnými systémy a to mnohem snadněji než častější vnitrořetězcové adukty (Brabec et al., 2017).

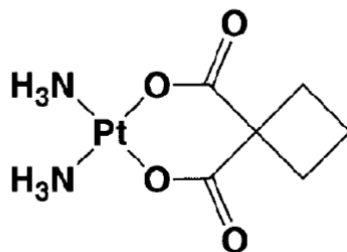
Obecně známou nevýhodou cisplatiny a většiny cytotoxických léčiv jsou jejich vedlejší účinky. Podávané dávky musí být proto omezené. Vedlejší účinky zahrnují nežádoucí aktivitu s přirozeně se vyskytujícími nukleofily lidského těla. Další nevýhodou je úzké spektrum použití. Velice efektivní je při léčbě rakoviny varlat, nicméně pro použití na jiné typy nádorů je vhodné v kombinaci s jinými léčivy. Nádory také mohou získat vůči léčivu rezistenci. V případě cisplatiny jsou tu tři hlavní mechanismy vývoje rezistence nádorových buněk k této látce. Jedná se o snížení akumulace cisplatiny v buňkách, cytosolové detoxifikace, zvýšenou opravu a toleranci DNA. Mechanismy se vzájemně doplňují a nedovolí navázání velkého množství léčiva na jadernou DNA. V první řadě se minimalizuje množství molekul platinových komplexů v buňce pomocí zrychleného odtoku nebo sníženého přísunu léčiva. Komplexy, které do buňky vstoupí, jsou inaktivovány buněčnými nukleofily, což brání vytvoření aduktu s DNA. Jestliže přeci jen dojde k navázání na jadernou DNA, mohou být adukty odstraněny např. pomocí nukleotidové excisní opravy (Wexselblatt et al., 2012).

Za účelem vylepšit léčbu a snížit dopady vedlejších účinků, byla vyvinuta řada dalších platinových komplexů. K nejpopulárnějším patří karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, heptaplatina nebo lobaplatina. Vzhledem k tomu, že pro všechny zmíněné komplexy byla cisplatinou předlohou, mají také podobný mechanismus účinku (Vijgh and F, 1991).

3.1.2 Karboplatina

Karboplatina (obr. 2) [(*cis*-diammin-[1,1-cyklobutandikarboxylato]platina (II)] má vyšší chemickou stabilitu oproti cisplatině, a tím i nižší reaktivitu s DNA, což může souviset s její menší nefrotoxicitou (Vijgh and F, 1991). Disociující skupinou v tomto případě nejsou chloridové ionty, ale cyklobutandikarboxylátový ligand, který neodstupuje snadno. Rychlost tvorby aduktů bývá stokrát pomalejší než v případě cisplatinu. Kyselější pH nádorových buněk však odštěpení ligandu napomáhá společně s jeho aktivací nukleofily. Pro dosažení stejného množství aduktů na DNA je potřeba použít přibližně dvakrát větší koncentrace v porovnání s cisplatinou (Brabec et al., 2017).

Ačkoliv je karboplatina známa pro mírnější vedlejší účinky, než jsou ty zaznamenané u cisplatinu, u léčených pacientů byly často zaznamenány hypersenzitivní reakce. Tyto reakce se projevily jako mírné příznaky ve formě kožních problémů, například kopřivky či zarudlých skvrn. Ve vážnějších případech došlo k anafylaktickým příznakům (Confino-Cohen et al., 2005). Hypersenzitivita byla dána do souvislosti s množstvím podávaných opakování karboplatiny, jelikož u pacientů, kteří prošli méně než pěti cykly protinádorové chemoterapie, byly příznaky hypersenzitivity relativně vzácné, nicméně se objevily i případy, kdy se příznaky objevily již po prvním podání (Sliesoraitis and Chikhale, 2005).



Obrázek 2-Chemická struktura karboplatiny (převzato z Todd and Lippard, 2009).

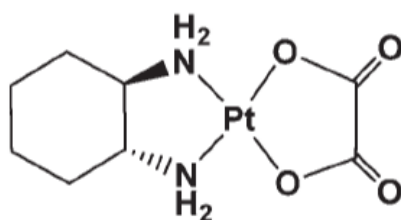
3.1.3 Oxaliplatina

Oxaliplatina [oxalato(*trans*-L-1,2-diaminocyklohexan)platina (II)] je dalším derivátem cisplatinu, který se primárně využívá k léčbě kolorektálního karcinomu (obr. 3). Strukturně se liší nahrazením amminů 1,2-diaminocyklohexanovou skupinou (DACH). Zdá se, že aktivita této DACH skupiny, je zodpovědná za účinnost proti některým nádorům rezistentním na cisplatinu (Piccart et al., 2001).

Po vstupu oxaliplatinu do těla odstoupí oxalátová skupina a léčivo je přeměněno na svou aktivní formu. Primárně se váže na atom dusíku (N7) guaninu jaderné DNA. Vytváří 3 typy vazeb a to intravláknové CL, mezireťezcové CL a CL s vazbou DNA-protein. Tyto adukty jsou cytotoxičtější než adukty cisplatinu, vyvolávají inhibici syntézy a opravy DNA, ale není jich tolik a vznikají pomaleji (Alcindor and Beauger, 2011).

Pro zabránění nebo alespoň určité omezení vzniku rezistence bývá oxaliplatina kombinována s jinými látkami, například s cetuximabem. Cetuximab zvyšuje akumulaci oxaliplatinu v jádře a snižuje aktivitu DNA opravných mechanismů. Při kombinaci těchto látek je cetuximab schopný obnovit citlivost buněk na oxaliplatinu (Prewett et al., 2007).

Oxaliplatina má však také nežádoucí účinky, kterými jsou např. poškození hematopoetických orgánů, nervového a gastrointestinálního systému pacientů (Alcindor and Beauger, 2011).



Obrázek 3-Chemická struktura oxaliplatinu (převzato z Oun et al., 2018).

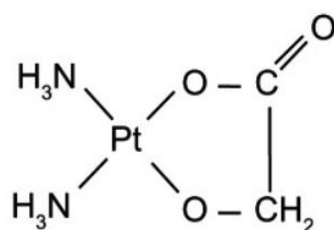
3.1.4 Nedaplatina

Nedaplatina (*cis*-diammin-glykolát-O,O'-platina (II)) byla vyvinuta v Japonsku, kde je její použití také schváleno a používá se zde jako léčivo s protinádorovou aktivitou. Nedaplatina má nižší gastrointestinální a renální toxicitu ve srovnání s cisplatinou, od které je odvozená. Obsahuje taktéž dva NH₃ ligandy vázané na platinu (obr. 4). Odstupující skupinou je pak

pětičlenný kruh tvořený glykolátem, vázaným jako bidentátní ligand k platini (II), který po odštěpení umožní vazbu na DNA (Alberto et al., 2009, Shimada et al., 2013).

Po vstupu léčiva do buňky dojde k hydrolytickému štěpení glykolátové části kruhu a komplex se v tomto stavu váže na DNA podobným způsobem jako cisplatina. Množství navázané nedaplatiny na DNA je podobné jako u cisplatin, ale je zde nižší vazba na proteiny. Jakožto analog vykazuje s cisplatinou křížovou rezistenci.

Ačkoliv má nedaplatina nižší, již zmíněnou, gastrointestinální a renální toxicitu, podávané dávky tohoto léčiva jsou přesto omezené, kvůli jeho jiným vedlejším účinkům, kterými jsou myelosuprese zahrnující trombocytopenii či anémii (Shimada et al., 2013).



Obrázek 4 -Chemická struktura nedaplatiny (převzato z Shimada et al., 2013).

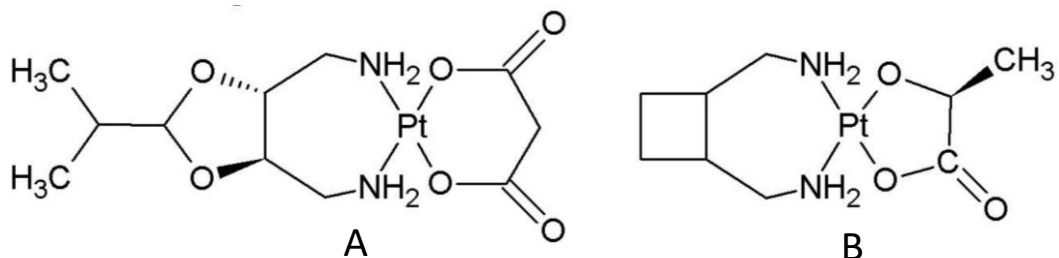
3.1.5 Heptaplatina a lobaplatina

Heptaplatina i lobaplatina patří k platinovým léčivům třetí generace. Jejich použití je schváleno pouze v některých zemích.

Lobaplatina je používána v Číně k léčbě karcinomu prsu, malobuněčného karcinomu plic nebo chronické myeloidní leukémie (Dilruba and Kalayda, 2016). Její chemický název je 1,2-diamino-methyl-cyklobutanplatina(II)-laktát (obr. 5B) (Wu et al., 2010), kde odstupující skupinou je kyselina mléčná. Ovlivňuje expresi genu *c-myc*, který se podílí na onkogenezi, apoptóze a buněčné proliferaci. Podávané dávky lobaplatiny jsou omezené kvůli trombocytopenii, kterou způsobuje (McKeage, 2005).

Heptaplatina neboli [*cis*-malonato((4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolan)platina (II)] (obr. 5A) je v současnosti povolena pro použití v Jižní Koreji především pro léčbu rakoviny žaludku (Zhang et al., 2014). Odstupující skupinou je zde malonát. Byla prokázána účinnost vůči leukemickým buňkám, již rezistentním na cisplatinu. Toxické účinky heptaplatiny nejsou tak vysoké, v porovnání s cisplatinou vykazuje např. nižší nefrotoxicitu. V roztoku vykazuje vysokou stabilitu a antiproliferativní aktivitu vůči buňkám (Reddy B. et al., 2017).

Mechanismus účinku obou léků je podobný jako u karboplatiny nebo oxaliplatiny, jelikož jsou strukturně podobné. Reagují s guaninovými zbytky DNA, ale je potřeba delší reakční doba než u cisplatiny. Zajímavostí heptaplatiny je, že se váže na dvoušroubovicovou DNA v bezbuněčném médiu a působí její kondenzaci (Brabec et al., 2017).



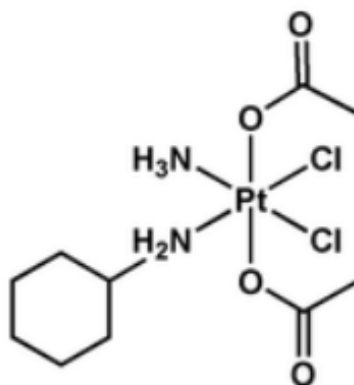
Obrázek 5-Chemická struktura A) heptaplatiny B) lobaplatiny (převzato z Brabec et al., 2017).

3.1.6 Satraplatina

Platičité komplexy představují stabilnější a méně toxické látky než komplexy Pt (II). Jsou považovány za proléčiva, jelikož bývají redukovány na aktivní komplexy Pt (II) v intracelulárním prostředí. V porovnání s jejich protějšky Pt (II) mají komplexy Pt (IV) vyšší koordinační čísla, vyskytují se s čísly čtyři nebo šest a dvěma přidanými axiálními ligandy. Jsou méně reaktivní než Pt (II), např. skoro nereagují s plazmatickými proteiny, methioninem a cysteinem. Díky tomu by mohla být léčiva v budoucnu pacientům podávána perorálně namísto intravenózní aplikace (Han et al., 2015).

Jako první perorálně prezentované léčivo byla uvedena satraplatina (bis-acetato-ammino-dichloro-cyclohexylamin-platina (IV)) (obr. 6). Do těla se vstřebává skrz střeva, odkud se dostane do krve. V krvi jsou štěpeny její acetátové skupiny, čímž získává podobnou strukturu jako cisplatina. Výjimku tvoří jedna z ammin skupin, která je nahrazena cyklohexylaminovou skupinou. Mechanismus účinku je podobný cisplatině (Choy et al., 2008).

V preklinických studiích byly pozorovány vysoké účinky satraplatiny proti nádorům prostaty, vaječníků nebo plic (Zhang et al., 2016). Nicméně, i přes velký benefit perorálního podání, které nabízí pohodlné a šetrné podání léku, nebo slibné účinky proti nádorům, není satraplatina schválena pro léčbu rakoviny. Během testů bylo zjištěno, že přínos satraplatiny pro celkové přežití pacientů není významný a klinický vývoj se prozatím zastavil (Zander et al., 2022).



Obrázek 6-Chemická struktura satraplatiny (převzato z Karmakar et al., 2019)

3.2 Komplexy ruthenia s protinádorovým účinkem

Zájem o vytvoření nových komplexů kovů vzrůstal, a tak byly vyvinuty rutheniové komplexy. Ruthenium se nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu II a III s hexakoordinovanou oktaedrickou geometrií. Centrální atomy v oxidačním stupni IV jsou méně časté, jelikož nejsou plně stabilní. Ruthenium, v oxidačním stavu II, vykazuje nejvyšší stabilitu a potřebnou rychlost při odštěpení ligandů (Zeng et al., 2017).

Pro zvýšení specifity a snížení vedlejších účinků jsou často na buňky aplikovány komplexy obsahující ruthenium v oxidačním stavu III, který je pak redukován v nádorové buňce. Redukce je aktivována přítomností redukčních činidel, jako třeba glutathion a kyselým prostředím s nízkým obsahem kyslíku, které je vytvářeno nádorem (Süss-Fink, 2010). Snadnější dodání látky do cíle také podporuje dobrá rozpustnost většiny komplexů ve vodě a podobnost se železem, díky čemuž je ruthenium schopné vazby s různými biomolekulami, například albuminem nebo s transferinovými receptory, které jsou nadměrně produkovány u rakovinných buněk. (Das et al., 2021).

Léčivo se přes buněčnou membránu dostává do buňky několika způsoby, z kterých je nejčastější endocytóza. Typickým cílem je jádro s DNA, ale působnost látky může zasáhnout i další organely jako mitochondrie nebo lysosomy.

Pro zacílení potenciálních ruthenioých léčiv do jádra buněk je např. možné vytvořit konjugát ruthenia (II) s peptidem D-oktaargininem. Bez navázaného peptidu by se látka soustředila spíše v cytoplazmě, ale kladně nabitý konjugát byl dobře vychytáván jádrem a zlepšil lokalizaci komplexů, nicméně cytotoxický efekt nebyl příliš velký (Puckett and Barton, 2010). Proto byly navrženy i jiné sloučeniny, mezi nimi například komplexy obsahující

β -karbolinový alkaloid. Ruthenium (II), s β -karbolinovou skupinou jako ligandem, může aktivovat apoptózu nebo autofagii v nádorových buňkách. Jádro je pro tyto látky propustné a některé z nich mají vyšší aktivitu než cisplatina (Tan et al., 2010).

Akumulace komplexů může probíhat i v mitochondriích, které se podílí na metabolismu buňky a za určité situace produkují reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a jiné molekuly podílející se na indukci apoptózy. Protonový gradient na vnitřní mitochondriální membráně způsobuje vysoce záporný membránový potenciál uvnitř organely. Tento potenciál kovové komplexy přitahuje a jejich interakce s prostředím mitochondrie může aktivovat apoptotickou dráhu.

Lysozomy plní v buňkách několik funkcí. Zajišťují zejména degradaci či recyklaci molekul a podílí se na procesu apoptózy nebo endocytózy. Končí zde mnoho makromolekul a také se zde uplatňují účinky nanomateriálů obsahující rutheniové komplexy. Zacílení léčiva spočívá v tom, že nanomateriál se přednostně štěpí v kyselém prostředí lysozomu, kde je rutheniový komplex uvolňován (Zeng et al., 2017).

Jak již bylo zmíněno, cílem látky bývá nejčastěji jaderná DNA. Oktaedrická geometrie komplexů poskytuje širokou škálu trojrozměrných struktur, a proto jsou i vazby na DNA rozmanité a selektivní. Hlavní dva vazebné stavy, které mezi sebou mohou komplexy a DNA vytvořit, jsou koordinační a nekoordinační. Koordinační vazba je založena na příjmu elektronů komplexem z nukleofilní DNA. Takto vytvořená vazba je ireverzibilní a je zprostředkována mezi ruthenioým centrem a bází. Nekoordinační vazba se např. může tvořit prostřednictvím interkalace komplexů s aromatickým ligandem mezi páry bází, elektrostatickými interakcemi nebo hydrofobními silami (Brabec and Kasparkova, 2018). Pozornost se zaměřuje nejvíce na interkalační vazbu. Vzniká při vmezeření planárního heterocyklického aromatického kruhu mezi páry bází, což způsobí modifikační změny DNA. Dochází například k rozvíjení dvoušroubovice DNA, což vede k inhibici replikace a transkripce (Liu and Sadler, 2011).

V procesech spojených s rakovinou hrají důležitou roli také enzymy, proto byly zahrnuty do cílů léků. Díky prostorové struktuře komplexu lze vyplnit aktivní místo enzymu, což může způsobit inhibici a zvýšení selektivity. Podle funkce kovového jádra komplexu při inhibici enzymu můžeme inhibitory rozdělit do tří hlavních tříd:

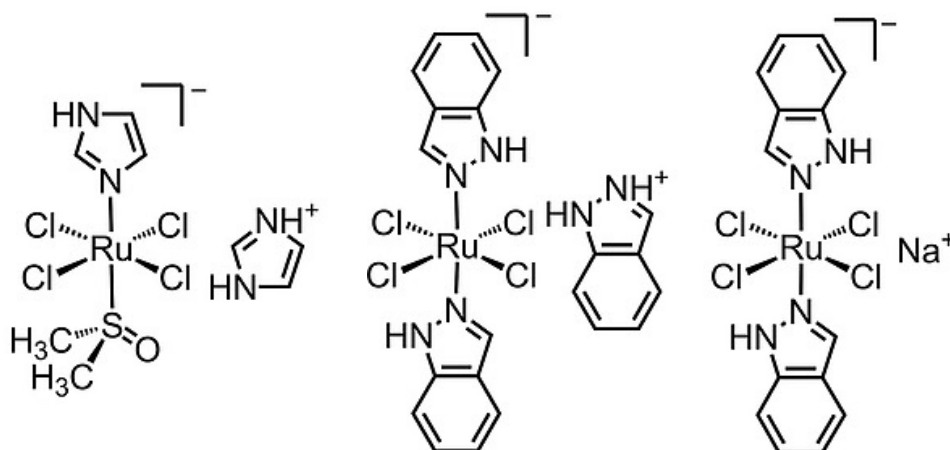
- Komplexy s kovovým jádrem, které se nekoordinuje přímo s enzymem. Inhibice probíhá skrze vazbu biologicky aktivního ligandu a enzymu.
- Komplexy, kde kovové centrum reaguje neselektivně s mnoha enzymy. Ligandy obvykle nejsou biologicky aktivní a slouží převážně ke stabilizaci a ochraně centrálního atomu kovu.

- Komplexy, kde ligand i kov zodpovídá za biologickou aktivitu komplexu (Kilpin and Dyson, 2013).

3.2.1 První komplexy ruthenia v klinické studii

Mezi první rutheniové komplexy, které vstoupily do klinické studie, se řadí sloučeniny KP1019, NKP1339 a NAMI-A (obr. 7) (Lee et al., 2020).

Komplex NAMI-A (imidazolium-*trans*-DMSO-imidazol-tetrachlorruthenát, *trans*-RuCl₄(DMSO)Im) byl vytvořen podle sloučeniny NAMI (Na[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]), u které došlo k náhradě sodného kationtu za kationt imidazolový (Rademaker-Lakhai et al., 2004). V pevném stavu je NAMI-A stabilní, zatímco ve vodném roztoku obvykle podléhá rychlé hydrolyze, která se odvíjí podle pH. Za fyziologické teploty a pH dochází k hydrolyze chloridů a DMSO přibližně během 15 minut. V kyselejším prostředí (pH 3-6) a čisté vodě (pH 5,5) je komplex stabilnější a dochází pouze k pomalejší hydrolyze DMSO (Alessio and Messori, 2019).



Obrázek 7-(zleva) Chemická struktura komplexů NAMI-A, KP1019 a NKP1339 (převzato z Alessio, 2017)

Bylo zjištěno, že NAMI-A *in vitro* přechodně zastavuje růst nádorových buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, díky čemuž dochází k modifikaci buněčného růstu. Z tohoto poznatku vyplynulo, že komplex je vhodný pro léčbu nádorových metastáz a to v jakémkoliv stádiu růstu (Bergamo et al., 1999). Antimetastatické vlastnosti jsou také podporovány schopností podněcovat tvorbu pojivové tkáně kolem primárního nádoru a extracelulární matrix kolem cév, čímž je bráněno invazi nádorových buněk do okolních tkání a krevního řečiště (Sava et al., 1998). Do procesu tvorby metastáz je také silně zapojena angiogeneze. Endoteliální buňky

a jejich funkce jako proliferace, chemotaxe a produkce matrixových metaloproteináz, jsou nezbytné pro tvorbu nových cév. Proto byl zkoumán účinek NAMI-A na funkce endoteliálních buněk *in vitro* a angiogenezi. Bylo prokázáno, že komplex inhibuje *in vitro* zmíněné funkce a *in vivo* zabraňuje angiogenezi, při podávání dávek, které mají antimetastázovou aktivitu (Vacca et al., 2002).

V porovnání s cisplatinou je NAMI-A také schopen vazby na DNA a tvorby vnitrořetězcových aduktů, ale v menším množství. Experimenty ukázaly, že NAMI-A má vyšší afinitu k jiným buněčným složkám než je DNA ve srovnání s cisplatinou (Pluim et al., 2004). V případě tvorby monoaduktů dochází nejčastěji k vazbě v místě N7 guaninu. Mono- a dihydratované molekuly NAMI-A interagují mnohem rychleji než samotný komplex ve vodném prostředí vůči N7 guaninu, což podporuje názor, že NAMI-A je nejdříve hydrolyzován na hydratované produkty, které jsou reaktivnější a reagují s bázemi (Kumar Shah et al., 2016). Nejpriznivější místa pro tvorbu bifunkčních aduktů jsou N7 guanin na jedné straně a N3 adenin nebo N7 guanin na druhé, což potvrzuje experimentální pozorování o guaninu, jakožto převládajícím vazebném místě při tvorbě bifunkčních aduktů (Shah and Shukla, 2022).

KP1019 (*trans*-[tetrachlorbis (1H-indazol) ruthenát (III)]) patří stejně jako NAMI-A do komplexů s Ru (III) iontem (Bijelic et al., 2016) a podobnou geometrií. Prostorové rozložení se skládá ze čtyř ekvatoriálních chloridových a dvou indazolových ligandů. KP1019 je stabilní v pevném stavu a mírně rozpustný ve vodě, kde vykazuje také vyšší stabilitu než NAMI-A a obdobně také podléhá hydrolyze, která s rostoucím pH probíhá rychleji (Alessio and Messori, 2019). Předpokládá se, že cytotoxické vlastnosti komplexu závisí spíše na schopnosti poškodit endoplasmatické retikulum (ER) rakovinných buněk oxidačním stresem než na poškození samotné DNA. Nefunkční ER pak vede k apoptóze vnitřní mitochondriální cestou (Bijelic et al., 2016).

Má se za to, že KP1019 i NAMI-A jsou do nádorových buněk transportovány a akumulovány díky vazbě na sérové proteiny. Pozornost upoutal především lidský sérový albumin (HSA, human serum albumin) a transferin. Sérový transferin je glykoprotein uspořádaný do dvou laloků, z nichž každý utváří vazebné místo pro atom železa (III). Transferin s připojeným železem je navázán na transferinový receptor a skrze endocytózu je transportován do buňky. Spotřeba železa je obzvláště vysoká u nádorových buněk, které proto na svém povrchu exprimují velké množství transferinových receptorů. Rutheniové komplexy (III) jsou také schopny vazby na transferin a dostat se stejným způsobem do buňky, tudíž se předpokládá, že transportní proteiny jsou zodpovědné za akumulaci a selektivitu komplexů (Pongratz et al., 2004, Śpiewak and Brindell, 2015). Transport zprostředkovaný HSA je založen na schopnosti

proteinu vázat širokou škálu látek, mezi kterými jsou i kovové ionty. Vazebný poměr odpovídá vazbě čtyř molekul komplexních aniontů k jedné molekule HSA (Dömötör et al., 2013). Navázaný komplex lze distribuovat do rakovinných buněk díky zvýšené permeabilitě a retenci (EPR, efekt zvýšené permeability a retence) nádorových cév. Na rozdíl od zdravých tkáňových krevních cév je vaskulární systém nádorových tkání defektní a obsahuje mezery mezi endoteliálními buňkami. Efekt EPR tedy umožňuje komplexu HSA-lék průchod štěrbinami do cév vedoucích přímo do nádoru (Kalyane et al., 2019).

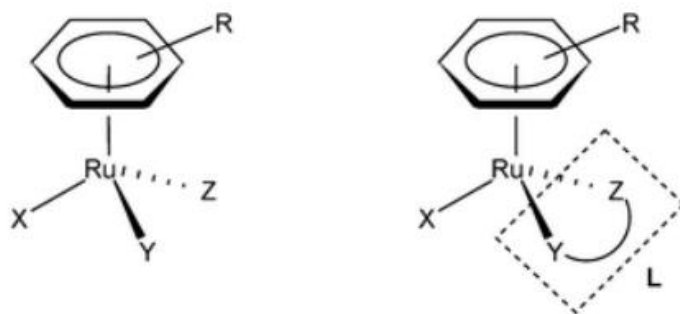
Dalším významným komplexem, který úspěšně vstoupil do klinických studií, je látka NKP1339 (*trans*-[tetrachloridobis(1*H*-indazol)ruthenát sodný (III)]) (Trondl et al., 2014). Jedná se o analog sodné soli KP1019, jehož vyvinutí se uskutečnilo s cílem vytvořit prekurzor KP1019, který bude vykazovat lepší rozpustnost ve vodě (Peti et al., 1999) a tím se umožní podávat pacientům velké dávky léku (Lee et al., 2020).

3.2.2 Aren-rutheniové komplexy

Pozornost upoutaly také aren-rutheniové komplexy, kde se kovový iont vykytuje ve stavu Ru (II). Jednotka Ru-arenu je stabilní a podporuje rozpustnost komplexu. Kostra nabývá oktaedrického tvaru, kde arenový ligand zaplňuje tři koordinační místa a další ligandy se vážou na zbylá tři koordinační místa. Takovéto seskupení vytváří tzv. klavírní stoličku (obr. 8) (Sonkar et al., 2022). Ligand X zůstává monodentátní, zatímco Y a Z se spojí za vzniku bidentátního ligandu (L), což společně s navázaným arenem podporuje protirakovinnou aktivitu (Kai Yan et al., 2005).

Aren-rutheniové komplexy často vykazují hydrofobní i hydrofilní charakter, s čímž je v souvislosti očekáván aditivní či synergický účinek. Spolu s dalšími navázanými ligandy tyto komplexy mohou vytvářet variabilní škálu struktur, což rozšiřuje možnosti interakcí s farmakologickými cíli (Lee et al., 2020).

Za původce cytotoxického účinku je považována hydrolýza monodentátního ligandu X, při které vznikne hydratovaný produkt. Nicméně tato forma existuje při určitém rozmezí pH a pokud tato hodnota pH bude větší než pKa, převládat bude forma s navázanou hydroxy skupinou, která je méně reaktivní než hydratovaná forma (Dougan and Sadler, 2007).



Obrázek 8-Typická struktura aren-rutheniových komplexů. Aren tvoří tzv. klavírní stoličku a připojené ligandy její „nohy“. X značí monodentátní ligand. L značí bidentátní ligand vzniklý spojením Y a Z ligandu (Kai Yan et al., 2005).

Jak již bylo zmíněno, aren-rutheniové komplexy jsou velice variabilní z hlediska vazby různých ligandů. V této práci byl např. použit komplex nesoucí naftopyranový ligand, který je zodpovědný za destabilizaci mikrotubulů, což má za následek inhibici polymerace tubulinu a změny v cytoskeletu mikrotubulů. Z těchto důvodů není vytvořeno dělicí vřetenko a buňka se zastaví v G2/M fázi buněčného cyklu. Poškozením cytoskeletu je dále způsobeno snížení mechanické stability buněk a nádorových krevních cév, což vede k nekróze nádorové tkáně (Schmitt et al., 2018).

Ke slibným aren-rutheniovým sloučeninám se také zařadily komplexy skupiny RAPTA. Tato skupina je charakteristická svým PTA ligandem (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantanový ligand) (Scolaro et al., 2005). Ligand PTA je zodpovědný za dobrou rozpustnost ve vodě a selektivitu. Přisouzení těchto vlastností PTA ligandu proběhlo na základě jednoho z pokusů, kde byl místo PTA použit methylovaný ligand PTA a zjištěno, že v tomto stavu molekula o svou selektivitu přišla (Ang et al., 2011).

Mezi zástupce RAPTA komplexů, které se dostaly do všeobecného povědomí, patří především *para*-cymenový derivát RAPTA-C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymen})(\text{pta})\text{Cl}_2]$) a benzenový derivát RAPTA-B ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\text{pta})\text{Cl}_2]$). Tyto dva komplexy neprokázaly příliš vysokou cytotoxicitu *in vitro*, ale dokázaly inhibovat rostoucí metastázy *in vivo*. Projevila se také jejich selektivita a velice nízká toxicita (Renfrew et al., 2009). O něco více toxický se pak ukázal derivát toluenu RAPTA-T ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$) (Süss-Fink, 2010), nicméně dokáže inhibovat oddělování buněk od primární nádorové tkáně, jejich migraci a adhezi u adenokarcinomu prsu či snižovat růst plicních metastáz (Wolters et al., 2012).

Při porovnání NAMI-A a např. RAPTA-C je možné pozorovat rozdílnou stabilitu. NAMI-A obsahuje ruthenium ve stavu Ru (III), které je méně stabilní v porovnání Ru (II) a to zejména v prostředí s vyšším obsahem chloridů jako krev. V prostředí buněčné cytoplazmy,

obsahující nízkou koncentraci chloridů, je RAPTA-C štěpen stejným způsobem jako cisplatina. Společně sdílí antiangiogenní a antimetastatické vlastnosti vůči kolorektálním karcinomům a schopnost zastavit buněčný cyklus v G2/M fázi (Rausch et al., 2019).

3.3 Nádorové onemocnění a tvorba metastáz

Nádorové onemocnění je charakterizováno jako neregulovaný růst klonální populace buněk z určité tkáně. Rozvoj tohoto onemocnění se také nazývá karcinogeneze (Rakoff-Nahoum, 2006). Dle tkáně vzniku lze nádory rozdělit např. na karcinomy, které mají původ v epitelových buňkách. Z mezenchymální tkáně vznikají sarkomy pocházející ze svalů či kostí, leukemie a lymfomy zasahují hematopoetický systém (Carbone, 2020). Karcinogenezi je možné dělit i s ohledem na vývoj buněk do třech fází a to iniciace, podpora a progresse. Během iniciace dochází k bodovým mutacím, delecím, amplifikaci genu a dalším nevratným procesům. Ve fázi podpory pak dochází k proliferaci klonů těchto pozměněných buněk. Během progresse nádor nabývá na velikosti a případně dochází ke vzniku metastáz a tedy vzniku maligního nádoru (Rakoff-Nahoum, 2006). Maligní nádory se na rozdíl od benigních šíří do okolní nebo vzdálené tkáně. Invaze tkáně probíhá skrze lymfatický systém či krevní řečiště. Ve srovnání s benigním nádorem, kdy stačí provést chirurgický zákrok, je tedy léčba zhoubných nádorů náročnější (Patel, 2020).

Označení buňky za rakovinnou probíhá na základě přítomnosti určitých rysů. Mezi typické schopnosti rakovinné buňky neopomenutelně patří neomezený replikační potenciál (zajištěn neměnicí se délkou telomer), zvýšená exprese antiapoptotických faktorů, přeprogramovaný energetický metabolismus, vyhýbání se imunitnímu systému, nezávislost na růstových faktorech, poškozená regulace buněčného cyklu, invazivita a metastázování, vznik zánětu podporující nádor, indukce angiogeneze a genomová nestabilita (Hanahan and Weinberg, 2011).

Tato práce se konkrétně zaměřuje na vliv nového komplexu ruthenia na vybrané linie kolorektálního karcinomu. Rakovina tlustého střeva je ve vyspělých zemích jedním z převládajících typů rakoviny. Častý výskyt se přisuzuje především špatným stravovacím návykům, kouření, obezitě a nízké fyzické aktivitě (Kuipers et al., 2015). Značná část kolorektálních karcinomů má pomalý proces vývoje, kdy začínají jako malé adenomy a jejich postupný růst trvá několik let (Buckhaults et al., 2001).

Některé typy kolorektálních karcinomů jsou velmi těžko léčitelné a to především kvůli jejich tendenci tvořit sekundární ložiska v dalších tkáních, která léčbu komplikují. Kvůli

závažnosti takového onemocnění jsou vyhledávány stále nová léčiva a léčebné postupy, které by v budoucnu mohly mít pozitivní dopad na léčbu i v klinické praxi. V této práci byl testován komplex na bázi ruthenia a pozorován jeho vliv právě na buňky karcinomu tlustého střeva s důrazem na antiproliferativní aktivitu a vliv této látky na migrační schopnost a re-adhezi vybraných nádorových buněk odrážející možný antimetastatický potenciál nového komplexu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

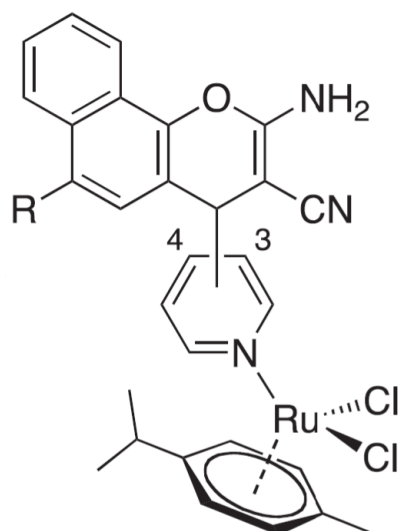
4.1 Materiál

4.1.1 Chemické látky

- Antibiotika (ATB): Penicilin 10 U·ml⁻¹; Streptomycin 10 µg·ml⁻¹ (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Deionizovaná voda (dH₂O) byla použita pro přípravu všech roztoků
- Dimethylformamid (DMF, Serva, Německo)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Penta, Česká republika)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biosera, Francie)
- Ethanol (Penta, Česká republika)
- Fetální hovězí sérum (FBS, PAA, Rakousko)
- Kyselina octová (Serva, Německo)
- Kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Neutrální červeň (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylfenazine hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 médium (RPMI, Biosera, Francie)
- Sulforhodamin B (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Trypsin/kyselina ethylendiamintetraoctová (Trypsin/EDTA, Sigma-Aldrich, Česká republika)

4.1.2 Komplexy ruthenia a platiny

Platinový komplex, konkrétně cisplatina, byl dodán firmou Sigma-Aldrich (Česká republika). Komplex ruthenia (dichlorido(p-cymen)[2-amino-4-(pyridin-4-yl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitril]ruthenium(II)) (komplex (1), obr. 9) byl poskytnut z University of Bayreuth (Německo) a to konkrétně prof. Schobertem. Zásobní roztoky kovových komplexů byly připravovány v DMF a dále ředěny kultivačním médiem dle potřeby.



R=H; 4-pyridinyl

Obrázek 9-Chemická struktura testovaného komplexu ruthenia s naftopyranovým ligandem (dichlorido(p-cymen)[2-amino-4-(pyridin-4-yl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitril]ruthenium(II)) (Schmitt et al., 2018).

4.1.3 Roztoky

- Zásobní roztok neutrální červeně:
 - 40 mg neutrální červeně
 - 10 ml PBS 1×
 - Uchovávat maximálně po dobu 2 měsíců při pokojové teplotě a ve tmě.
- Médium s neutrální červení (1:100):
 - 250 μ l roztoku neutrální červeně
 - 25 ml kultivačního média bez FBS, ATB
- Roztok pro extrakci neutrální červeně:
 - 50 % ethanol
 - 49 % deionizovaná voda (dH₂O)
 - 1 % kyselina octová (CH₃COOH)
- Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) 10× pH 7,4:
 - 150 mmol·l⁻¹ chlorid sodný (NaCl)
 - 2 mmol·l⁻¹ chlorid draselný (KCl)
 - 10 mmol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan disodný (Na₂HPO₄)
 - 2 mmol·l⁻¹ dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)
 - pH PBS roztoku bylo pozměněno díky 5 mmol·l⁻¹ NaOH na pH 7,4

- Sulforhodamin B 0,4% w/v
400 mg sulforhodaminu B
100 ml 1% kyseliny octové (CH₃COOH)
Uchovávat nejdéle 6 měsíců při teplotě 4 °C.

4.1.4 Biologický materiál

První vybranou buněčnou linií byly buňky SW-620. Jedná se o buněčnou linii lidského epiteliálního adenokarcinomu získanou z Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM) v Olomouci (Česká republika). Pro porovnání efektu komplexu pro různě invazivní typy rakovinných buněk byla do experimentů zahrnuta také linie HT-29 a HCT-116. Obě linie byly poskytnuty profesorem B. Kepplerem z Univerzity ve Vídni (Rakousko).

4.1.5 Laboratorní přístroje a software

- Automatická počítáčka buněk TC-20 (Bio-Rad; USA)
- Centrifuga Sigma 3-18 K (Satorius, Německo)
- CO₂ inkubátor MCO-18AC-PE (Panasonic Biomedical, Japonsko)
- Destičkový reader TECAN SPARK (Schoeller, Česká republika)
- Fotoaparát (Canon, Japonsko)
- Program ImageJ (USA)
- Laminární box SafeFAST Classic 212 (Faster, Itálie)
- Microsoft Excel (Microsoft, USA)
- Program GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software; USA)
- QuickPHOTO CAMERA 3.2 (Promicra, Česká republika)
- Světelný invertovaný mikroskop NIB-100 (MIKRO, Česká republika)
- Třepačka Universal Orbital Shaker OS-20 (Boeco, Německo)
- Vodní lázeň SB-12L shaking water bath (Benchmark Scientific, USA)

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněčných linií

Pro zahájení kultivace buněk byla SW-620 linie rozmrazena dle standardního protokolu. Byla zbavena zamrazovacího média obsahujícího dimethylsulfoxid (DMSO) stočením na centrifuze po dobu 5 minut při 2200 rpm a slítím tohoto média. Peletované buňky byly poté resuspendovány v médiu RPMI, které obsahovalo 10 % FBS, inaktivovaného při 56 °C po dobu 20 min a přefiltrovaného přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm, a ATB (Penicilin, Streptomycin) a převedeny do kultivační nádoby T-25 (TPP, Švýcarsko).

Následné pasáže byly provedeny dle standardního protokolu. Do vodní lázně byla vložena láhev s PBS 1× a médium RPMI s přidaným ATB a 10% FBS po dobu vyhřátí na 37 °C. Zkumavka s trypsin/EDTA byla nechána rozmrznout na stole. Nádoba s buňkami byla zkontrolována pod světelným invertovaným mikroskopem. V laminárním boxu bylo z kultivační nádoby s buňkami odebráno médium. Buňky byly promyty 5ml roztoku PBS 1×, který byl následně odstraněn. Pro rozrušení vazeb mezi jednotlivými buňkami a zároveň jejich vazeb ke kultivačnímu povrchu byl přidán 1 ml trypsinu/EDTA a nádoba byla vložena do inkubátoru po dobu 3 minut. K buňkám bylo přidáno 5 ml plnohodnotného média. Buňky (10 µl) byly odebrány a spočítány automatickou počítačkou buněk. Do nové kultivační nádoby T-75 s 15 ml plnohodnotného média RPMI byl přenesen 1 ml buněčné suspenze obsahující 1 000 000 buněk. Nově připravená kultivační nádoba s buňkami a médiem byla vložena do inkubátoru a ponechána pro další použití.

Stejný postup se opakoval pro buněčnou linii HT-29 a HCT-116 namísto RPMI média však bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médium rovněž s 10% FBS a ATB (penicilin, streptomycin).

4.2.2 Počítání buněk

Počítání buněk bylo prováděno vždy před začátkem experimentů pro zjištění přesného množství buněk a následného použití správného a přesně definovaného množství buněk. Kromě počtu byla zjišťována také životaschopnost používaných buněk.

Princip metody spočívá v obarvení mrtvých buněk trypanovou modří. Mrtvé buňky mají poškozenou membránu, což způsobuje zvýšenou propustnost a barvivo volně difunduje dovnitř, čímž buňku obarví. Naopak živé buňky mají membránu pro trypanovou modř nepropustnou a k obarvení nedojde. Jestliže by došlo k průniku barviva do intracelulárního prostoru, živá

buňka je schopná modř odčerpat ven. Z tohoto principu lze tedy určit viabilitu buněk (Louis and Siegel, 2011).

Před použitím automatické počítací buněk byl připraven vzorek. Do mikrozkuřavky bylo odebráno 10 μl buněčné suspenze a přidáno 10 μl trypanové modře. Obarvená suspenze buněk byla převedena na speciální sklíčko, které bylo vloženo do počítací buněk. Výsledek byl vyhodnocen přístrojem na základě analýzy obrazu a byl zobrazen jako množství buněk na mililitr suspenze a dále bylo uvedeno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk.

4.2.3 Měření antiproliferativní aktivity

Pro stanovení antiproliferativní aktivity komplexu (1) byla do 96-jamkové destičky napipetována suspenze buněk SW-620 o objemu 100 μl na jamku (20 000 buněk SW-620 na jamku). Buňky byly drženy v inkubátoru za podmínek: teplota 37 °C, 5% CO₂ a kultivovány po dobu 24 hodin. Poté byly buňky ošetřeny komplexem (1) v rozmezí koncentrací 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až 0,039 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo cDDP v rozsahu 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až 0,097 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztoky použitých komplexů byly před ředěním v kultivačním médiu RPMI rozpuštěny v DMF. Maximální koncentrace DMF u buněk nepřekročila 0,1 % a tedy neovlivnila životaschopnost buněk. Po ošetření byly buňky opět ponechány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a po 72 hodinách byl proveden test s neutrální červení.

Kolorimetrický test neutrální červení stanovuje cytotoxicitu chemických látek na buňkách *in vitro*, pomocí kvantitativního stanovení viabilních buněk. Živé buňky jsou schopny v lysozomech neutrální červeně hromadit a vázat. Mrtvé buňky akumulace barviva schopné nejsou (Repetto et al., 2008).

Kolorimetrický test byl započat naředěním neutrální červeně 1:100 v médiu DMEM bez ATB a FBS. Do 96-jamkové destičky s nasazenými a ošetřenými buňkami, bylo přidáno 100 μl média s neutrální červení na jamku. Po 2 h inkubace v inkubátoru bylo médium s neutrální červení odstraněno a buňky byly v každé jamce opláchnuty a následně zbaveny 150 μl PBS 1 \times . Po oplachovacím kroku bylo do každé jamky přidáno 100 μl odbarvovacího roztoku a takto připravená destička byla přemístěna na třepačku po dobu 10 minut, kde probíhala extrakce neutrální červeně. Následně byla v jamkách destičky měřena absorbance pomocí destičkového readeru, do kterého byla vložena destička s extrahovaným barvivem, kdy intenzita červeného zbarvení odpovídala počtu přeživších buněk. Při vlnové délce 540 nm byla změřena absorbance u daných jamek a výsledky byly zpracovány programem Microsoft Excel a GraphPad, kde byly vyhodnoceny hodnoty IC₅₀ (koncentrace látky, při které zahyne 50 % buněk). Hodnoty byly

získány ze tří nezávislých měření provedených v triplicátu. Počty buněk u různých typů ošetření byly vždy normalizovány na hodnoty získané pro neošetřené kontrolní buňky.

U buněk linie HT-29 a HCT-116 byl proveden stejný postup, nicméně místo média RPMI bylo při sazení buněk do 96-jamkové destičky použito médium DMEM a bylo pipetováno 10 000 buněk na jamku. Koncentrace cDDP i komplexu (1) se pohybovaly v rozmezí $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $0,097 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.2.4 Test vlivu na migrační aktivitu buněk

Migraci buněk *in vitro* lze studovat např. s využitím testu zacelování rýhy. Tato metoda simuluje migraci buněk při jejich přechodu od místa primárního nádoru až do nového ložiska *in vivo*. Základním postupem je vytvoření „rány“ v monovrstvě buněk a následné pozorování zacelování rány a schopnosti buněk migrovat. Při aplikaci protinádorového léčiva na buňky tak lze posoudit jeho antimigrační účinek (Rodriguez et al., 2005).

Do 6 cm Petriho misky bylo nasazeno 2 500 000 buněk SW-620 ve 4 ml média RPMI (Celkem sazeny tři misky: jedna Petriho miska pro kontrolní buňky, druhá pro komplex (1) a třetí pro cDDP). Po dobu 24 hodin byly buňky v Petriho miskách udržovány při teplotě 37°C a 5% CO_2 v inkubátoru. Po uplynutí těchto 24 hodin byly buňky zkontrolovány pod světelným mikroskopem. RPMI médium bylo odsáto a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Do Petriho misek byly přidány 4 ml čerstvého média RPMI s 1% FBS a ponechány v inkubátoru dalších 24 hodin. Po inkubaci byla do monovrstvy buněk plastovou špičkou od automatické pipety (200 μl) provedena rýha. Po tomto kroku bylo médium opět odstraněno a buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS 1×. Do Petriho misek bylo přidáno po 4 ml kultivačního média s testovanými látkami (komplex (1), cDDP) o koncentraci 65 % IC_{50} daných látek po 72 hodinách. Jedna z Petriho misek obsahovala pouze čisté médium pro kontrolu. Velikost rýhy byla zachycena fotoaparátem připojeným k invertovanému mikroskopu. Buňky byly opět vloženy do inkubátoru. Focení bylo opakováno po 24 a 48 hodinách od vytvoření rýhy. V programu ImageJ byly vyhodnoceny plochy rýh a změny jejich velikostí byly vztaženy na plochu rýhy v čase 0 hodin daného ošetření, která představuje 100 % nezahojené rány.

Pro linie HCT-116 a HT-29 bylo postupováno stejným způsobem. Na místo média RPMI však bylo použito médium DMEM.

4.2.5 Re-adhezní test

Schopnost buněk přisedat k povrchům po ošetření testovanými komplexy byla zkoumána re-adhezním testem.

Buňky linie HCT-116 byly kultivovány na 6 cm Petriho miskách sazených v počtu 2 000 000 buněk a 6 ml plnohodnotného kultivačního média DMEM na miskou. Petriho misky s buňkami byly kultivovány po dobu 48 hodin v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% CO₂. Po inkubační době bylo z misek odsáto původní médium a bylo nahrazeno 6 ml média DMEM s 0,1% BSA na miskou. Poté byly buňky opět vloženy do inkubátoru po dobu 24 hodin. Následovalo ošetření buněk komplexem (1) a cDDP v koncentraci odpovídající hodnotě trojnásobku IC₅₀ daných látek po 72 hodinách. Ošetřené buňky byly na 1 hodinu opět vloženy do inkubátoru. Poté bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS 1×. Do Petriho misky byl přidán 1 ml trypsinu pro uvolnění buněk od kultivačního povrchu. Poté bylo do každé misky přidáno 5 ml kultivačního média DMEM a buňky byly převedeny do plastových 14 ml zkumavek. Zkumavky byly umístěny do centrifugy nastavené na 2000 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl oddělen a pelet byl resuspendován v 5 ml média DMEM s 0,1% BSA a bez ATB. Zkumavky s buňkami byly ponechány 30 minut ve svislé poloze pro obnovení povrchových receptorů. Tyto buňky byly poté převedeny do 96-jamkové destičky se sazením 30 000 buněk na jamku ve 100 μl média DMEM s 0,1% BSA. Destička s buňkami byla přenesena do inkubátoru, kde byla 30 minut ponechána.

Médium z jamek bylo odstraněno a buňky byly dvakrát opláchnuty 100 μl PBS 1×. Pro fixaci buněk bylo použito 100 μl 10% kyseliny trichloroctové (TCA), která působila po dobu 1 hodiny při 4 °C. Po fixaci byla TCA odstraněna z jamek destičky, buňky byly třikrát opláchnuty deionizovanou vodou a ponechány oschnout na vzduchu. Barvení buněk bylo provedeno pomocí 0,4% barviva sulforhodaminu B (SRB), který byl přidán v objemu 50 μl na jamku. SRB byl inkubován s buňkami po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté byl SRB odstraněn a buňky byly třikrát opláchnuty 100 μl 1% kyseliny octové. Kyselina octová byla opatrně vyklepnuta a destička byla ponechána oschnout na vzduchu. Do každé jamky bylo poté přidáno 50 μl 10 mmol·l⁻¹ odbarvovacího roztoku Tris. Destička byla umístěna na třepačku po dobu 10 minut. Posledním krokem bylo měření absorbance pomocí destičkového readeru při vlnové délce 570 nm a vyhodnocení výsledků v programu Excel a GraphPad. Výsledná data byla vyjádřena v % re-adherovaných buněk a vztažena k celkové kontrole neošetřených buněk.

4.3 Výsledky

4.3.1 Měření antiproliferativní aktivity

Prvním krokem testování komplexu (1) na kolorektálních liniích HCT-116, HT-29 a SW-620 bylo stanovení hodnoty IC_{50} (koncentrace látky, při které zahyne 50 % buněk), která byla potřebná pro následující experimenty, kvůli stanovení vhodné koncentrace látky pro ošetření buněk. Pro kontrolu byly stejné experimenty provedeny také s cisplatinou. Barvením buněk neutrální červení byla zjištěna závislost viability buněk na koncentraci použitých látek po 72 hodinách od ošetření (viz kapitola 4.2.3).

Pro linie HT-29 a HCT-116 byla nejvyšší zvolená koncentrace ošetření komplexem (1) i cDDP $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky SW-620 byly citlivější na daný komplex (1) a proto byla pro ošetření použita maximální koncentrace $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace cDDP byla u této linie opět $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Z naměřených absorbancí extrahované neutrální červeně byly stanoveny hodnoty IC_{50} po 72 hodinách od ošetření získané v závislosti viability buněčných linií na koncentraci vybraných komplexů. Výsledné hodnoty IC_{50} byly stanoveny programem GraphPad Prism4 (tab. 1). Počty buněk u různých typů ošetření byly vždy normalizovány na hodnoty získané pro neošetřené kontrolní buňky. Při porovnání účinnosti obou komplexů bylo pozorováno, že komplex (1) dosáhl nejlepších výsledků u buněčných linií v pořadí HCT-116 > HT-29 > SW-620 (čím nižší hodnota IC_{50} , tím účinnější látka na buňky). Cisplatinou byla naopak nejméně úspěšná vůči linii HT-29, následně SW-620 a nejvíce účinná byla proti buňkám HCT-116. V rámci buněčných linií měl komplex (1) 17,9x větší antiproliferativní aktivitu než cDDP na buňky HT-29, dále 35,1x větší účinek na buňky HCT-116 a 4,3x větší efekt na linii SW-620.

Tabulka 1-Hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) komplexu (1) a cDDP získané kolorimetrickým testem s neutrální červení na liniích HCT-116, HT-29 a SW-620 po 72 hodinách od ošetření.^a

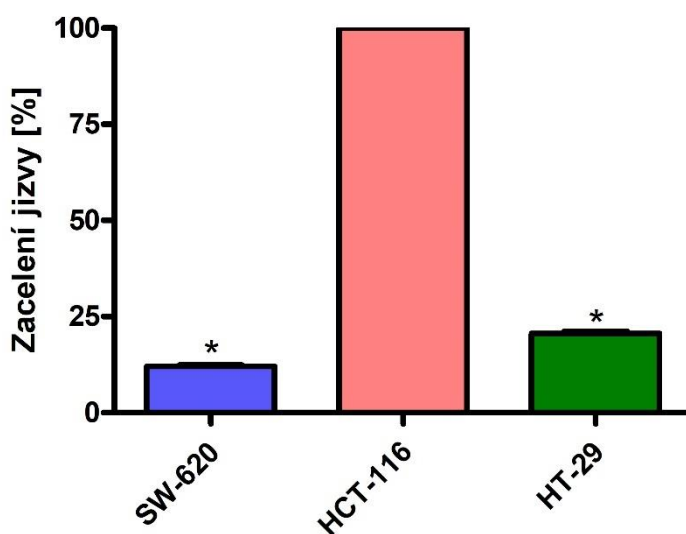
	HCT-116	HT-29	SW-620
cDDP	$9,49 \pm 0,21$	$33,39 \pm 7,90$	$12,20 \pm 4,42$
Komplex (1)	$0,27 \pm 0,02$	$1,87 \pm 0,03$	$2,87 \pm 1,63$

^aHodnoty byly získány ze tří nezávislých měření provedených v triplikátu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD z těchto měření.

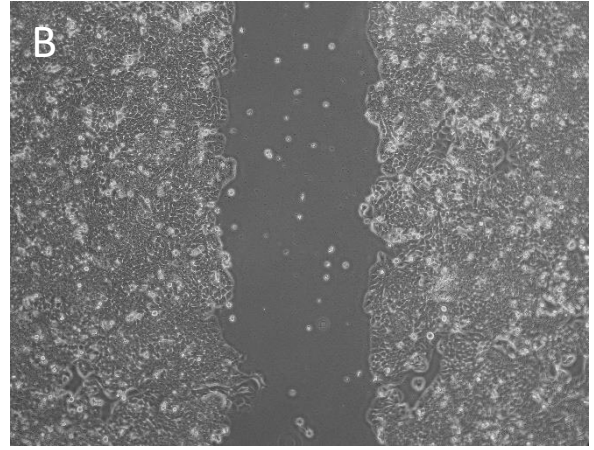
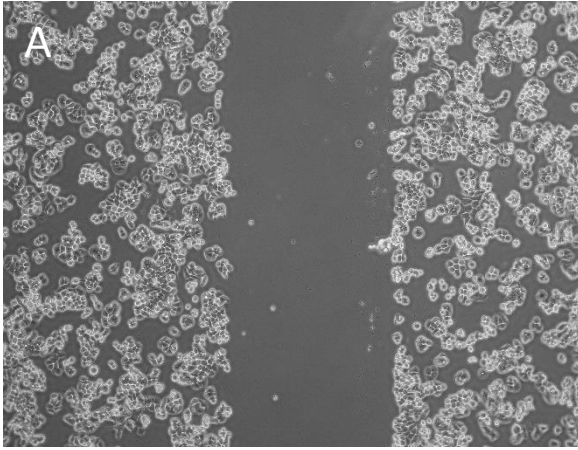
4.3.2 Test vlivu na migrační aktivitu buněk

Linie HT-29, HCT-116 a SW-620 byly podrobeny experimentu, který měl za cíl sledovat vliv komplexu (1) a cDDP na migraci těchto buněk a tím i schopnost potlačit potenciální migraci buněk nutnou při tvorbě metastáz. Základním postupem je vytvoření „rány“ v monovrstvě buněk a následné pozorování zacelování rány a schopnosti buněk migrovat.

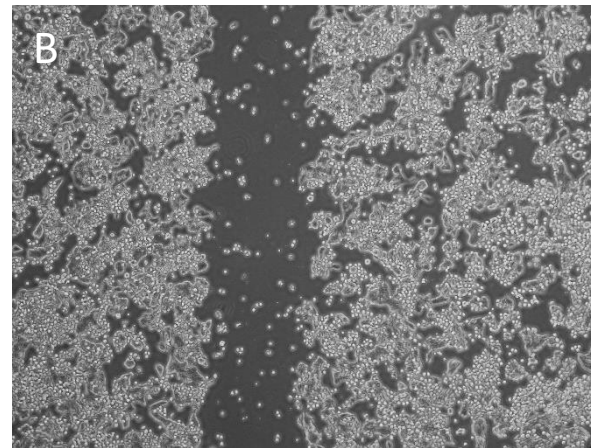
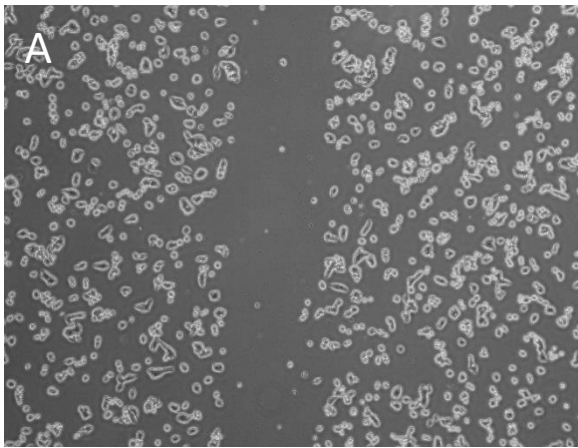
Během testování migračních schopností vybraných linií bylo zjištěno, že linie SW-620 a HT-29 neošetřené komplexem (1) ani cDDP po 48 hodinách kultivace nedosáhly signifikantního zacelení ráhy (obr. 10). Jak je vidět na obrázku 11 a 12, buňky obou linií se ve svém okolí pouze rozmnožily, nicméně nemigrovaly. Přítomné buňky v rýze jsou pouze mrtvé buňky v jiné rovině zaostření. Naproti tomu linie HCT-116 bez ošetření po 24 hodinách zarostly velkou část plochy a po 48 hodinách dosáhly úplného zacelení ráhy (obr. 13) a byly proto vyhodnoceny jako vhodný model ke zkoumání migračních vlastností buněk po aplikaci testovaných látek.



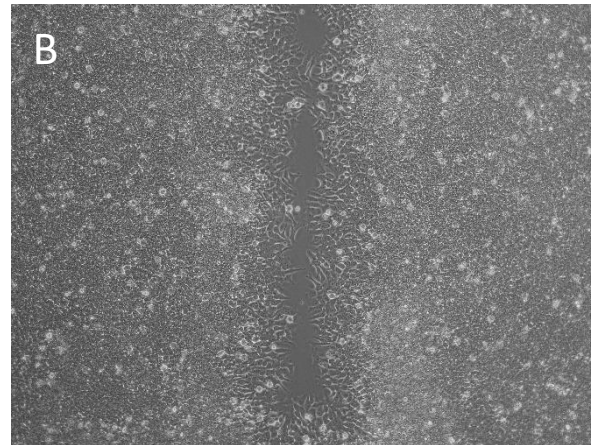
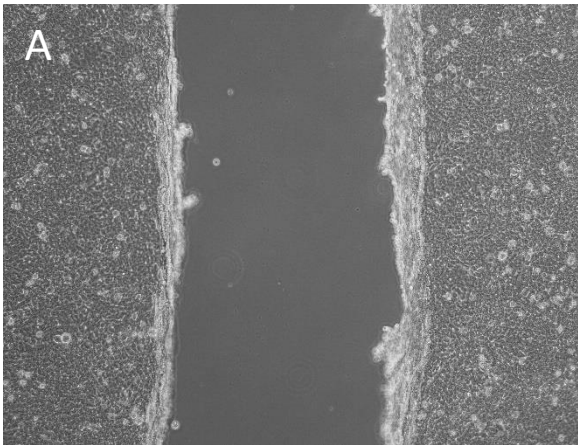
Obrázek 10-Graf znázorňuje % zacelení ráhy v čase 48 hodin buněčných linií SW-620, HCT-116 a HT-29 bez ošetření komplexem (1) a cDDP. Procentuální zacelení ráhy po 48 hodinách je vztažené k velikosti kontrolní ráhy v čase 0 hodin dané linie, která představuje 100 %. Data byla vyhodnocena vždy ze třech snímků pro každou linii. (* udává signifikantní rozdíl mezi výsledky pro linie HT-29 a SW-620 vztažené k linii HCT-116, $P < 0,05$)

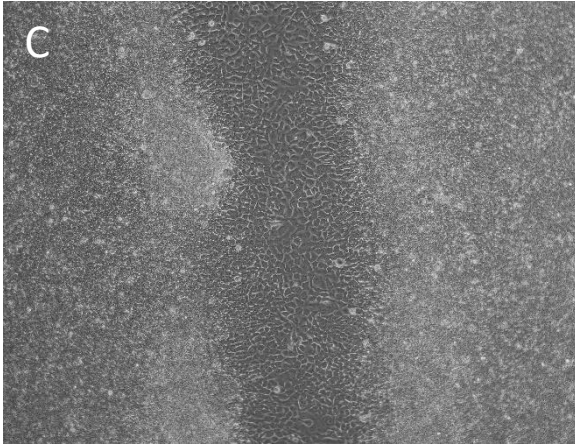


Obrázek 11-Representativní snímek buněk HT-29 bez ošetření. A) Rýha v čase 0 hodin. B) Rýha v čase 48 hodin. (zvětšení 100x)



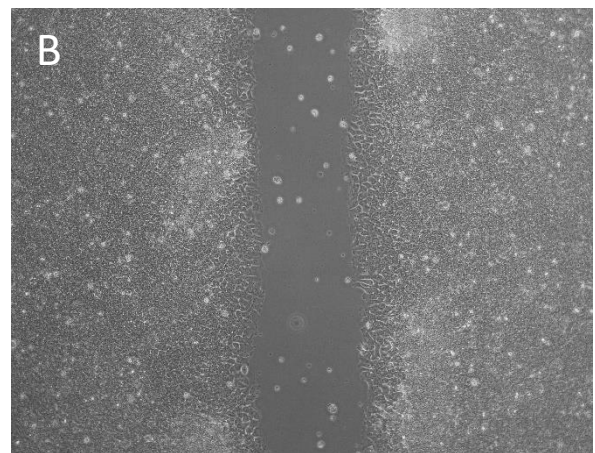
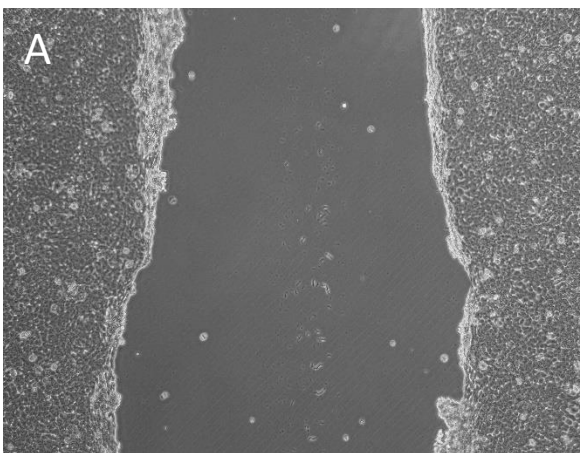
Obrázek 12-Representativní snímek buněk SW-620 bez ošetření. A) Rýha v čase 0 hodin. B) Rýha v čase 48 hodin. (zvětšení 100x)

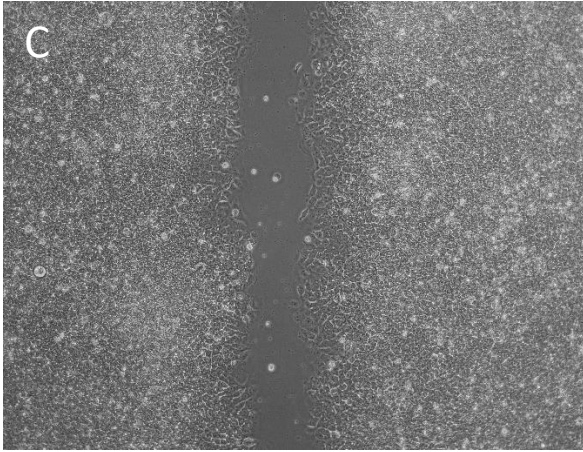




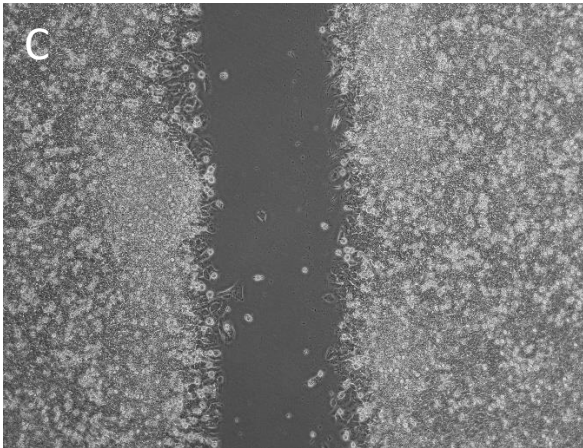
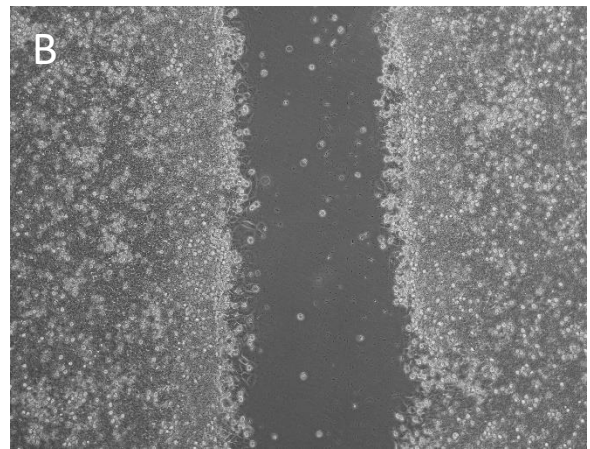
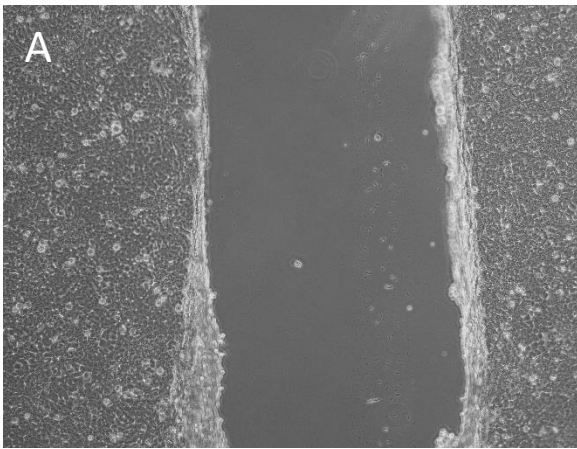
Obrázek 13-Reprezentativní snímek buněk HCT-116 bez ošetření. A) Rýha v čase 0 hodin. B) Rýha v čase 24 hodin. C) Rýha v čase 48 hodin. (zvětšení 100x)

Vzhledem k prokázaným migračním vlastnostem linie HCT-116 byly buňky po ošetření komplexem (1) a cDDP koncentracemi o hodnotě 65% jejich IC_{50} po 72 hodinách sledovány, kvůli vlivu látek na migrační schopnosti. Neošetřené buňky HCT-116 po 48 hodinách dosáhly 100% zacelení rýhy. V případě buněk ošetřených cDDP již bylo pozorováno ovlivnění migrace těchto buněk. Po 24 hodinách od ošetření buněk HCT-116 cDDP se rýha v porovnání s kontrolou zmenšila na 39 % původní velikosti a po 48 hodinách došlo ke zmenšení na 28 % (obr. 14). Výrazně účinněji ve srovnání s cDDP působil komplex (1), který po 24 hodinách zabránil zacelení až na 63 % původní plochy rýhy a po 48 hodinách na 46 % plochy (obr. 15). Komplex (1) tedy působil 1,6x efektivněji než cDDP. Celkové porovnání vývoje rýhy vytvořené ve vrstvě buněk linie HCT-116 ošetřených cDDP nebo komplexem (1) v čase 24 a 48 hodin po ošetření a také kontrolních buněk ve stejných časech, ale bez ošetření je zaznamenáno na obrázku 16.

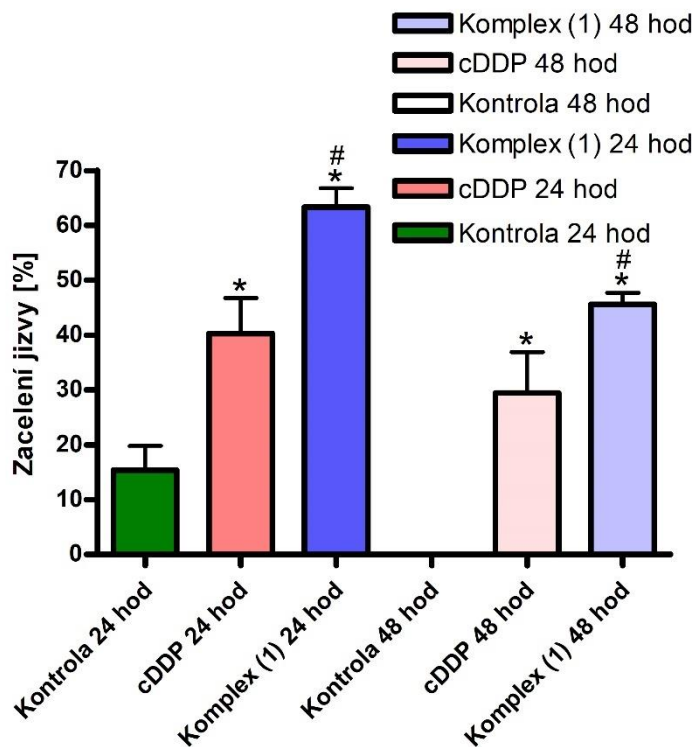




Obrázek 14-Reprezentativní snímek buněk HCT-116 ošetřených cDDP o koncentraci její 65% hodnoty IC_{50} . A) Rýha v čase 0 hodin. B) Rýha v čase 24 hodin. C) Rýha v čase 48 hodin. (zvětšení 100x)



Obrázek 15-Reprezentativní snímek buněk HCT-116 ošetřených komplexem (1) o koncentraci jeho 65% hodnoty IC_{50} . A) Rýha v čase 0 hodin. B) Rýha v čase 24 hodin. C) Rýha v čase 48 hodin. (zvětšení 100x)



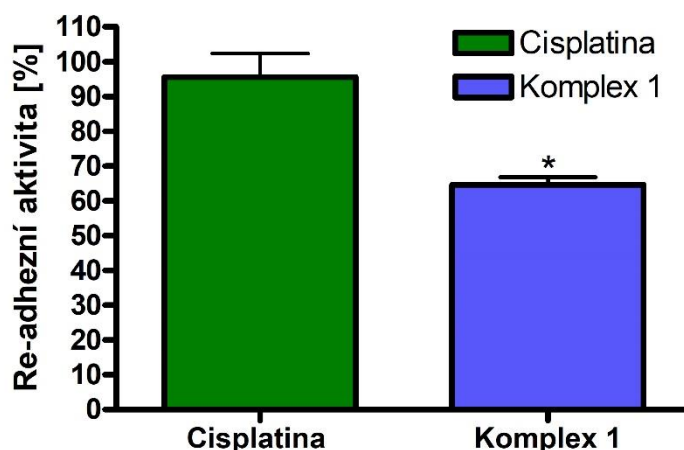
Obrázek 16-Graf vyjadřující % zacelení ráhy buněčné linie HCT-116 v čase 24 hodin a 48 hodin. Procento zacelení je vztaženo k velikosti ráhy v čase 0 hodin daného ošetření, které představuje 100 % velikosti této ráhy. Buňky byly ošetřeny komplexem (1) a cDDP v koncentraci odpovídající jejich 65% hodnotě IC_{50} . Hodnoty byly vyhodnoceny na základě 3 fotografií každého ošetření v daném čase. (* udává signifikantní rozdíl vztažený ke kontrole v daném čase, $P < 0,05$; # udává signifikantní rozdíl hodnot komplexu (1) od cDDP, $P < 0,05$)

4.3.3 Re-adhezní test

Re-adhezní test měl za cíl stanovit schopnost buněk adherovat zpět ke kultivačnímu povrchu po jejich předchozím umělém oddělení a také určit vliv testovaných látek na tuto schopnost buněk. Bylo tak možné pozorovat, zda vybrané komplexy (komplex (1) a cDDP) ovlivňují adhezi buněk HCT-116 k povrchu kultivační destičky a sledovat potenciál využití zkoumaného komplexu v boji proti tvorbě metastáz, konkrétně vlivu na krok znovu přisedání nádorových buněk k cílové tkáni v místě sekundárního ložiska, což přeneseně umožňuje tento experiment *in vitro*.

Ze získaných výsledků re-adhezního testu, zaznamenaných na obrázku 17, vyplývá, že komplex (1), v porovnání s cDDP, působil proti re-adhezi efektivněji za podmínek použití koncentrace rovné trojnásobku hodnoty IC_{50} testovaných látek. Vyšší koncentrace látek ($3 \times IC_{50}$) byly zvoleny z důvodu kratší expozice (30 minut) nádorových buněk těmto látkám během uvedeného experimentu. Zobrazené hodnoty byly vyjádřeny v % a vztaženy k celkové kontrole, která představuje 100 % re-adherovaných buněk. Po ošetření linie HCT-116

komplexe (1) re-adherovalo $64,56 \pm 3,79$ % buněk. Při působení cDDP bylo dosaženo $95,58 \pm 11,71$ % re-adheze buněk. Komplex (1) tedy ovlivňoval adhezi buněk HCT-116 1,5x účinněji než cDDP.



Obrázek 17-Graf představující procentuální vyjádření míry re-adheze linie HCT-116 po ošetření buněk komplexem (1) a cDDP koncentracemi o hodnotě trojnásobku jejich IC_{50} po 72 hodinách. Data byla vztažena k celkové neošetřené kontrole představující 100 % re-adherovaných buněk a byla porovnávána z měření třech nezávislých duplikátů. (*) Udává signifikantní rozdíl hodnot komplexu (1) od cDDP. ($P < 0,05$)

4.4 Diskuze

Kolorektální karcinom je rozšířené a nebezpečné onemocnění. Kvůli jeho schopnosti tvořit sekundární ložiska, která komplikují léčbu, jsou hledána stále nová léčiva. Vyvíjená léčiva jsou podrobena testování v základním výzkumu a ty s dobrým potenciálem poté i v klinických studiích. Během testování jsou využívány různé buněčné linie jako modely, které disponují různými vlastnostmi, např. schopnost migrace, invazivita, adheze. Tyto vlastnosti odrážejí schopnost tvorby metastáz nádoru od něhož je linie odvozena. Z tohoto důvodu byl testován vliv nového rutheniového komplexu dichlorido(p-cymen)[2-amino-4-(pyridin-4-yl)-4H-benzo[h]chromen-3-karbonitril]ruthenium(II) hned na třech liniích tlustého střeva s různým fenotypem a to HCT-116, HT-29 a SW-620.

Prvním experimentem byl test antiproliferativní aktivity, který byl proveden s využitím barvení pomocí neutrální červeně. Toto barvivo se hromadí v lysozomech živých buněk. Konfluentní buňky byly ošetřeny danými komplexy po dobu 72 hodin. Poté byly barveny zmíněnou neutrální červení a následovalo změření absorbance. Poté bylo možné stanovit závislost viability daných buněk na koncentraci testovaných látek. Čím více barviva bylo extrahováno, tím vyšší absorbance byla zaznamenána a tím méně byly komplexy účinné a

buňky přežívaly. Vliv cDDP byl již několikrát zkoumán a tento komplex je také často využíván jako látka kontrolní pro porovnání s účinky jiných substancí. Tanaka et al., 2015 například získal hodnotu IC_{50} pro cDDP po 72 hodinách pro linii SW-620 $30,60 \pm 3,50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kitada et al., 2008 došel k podobnému výsledku a to $37,20 \pm 2,31 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mnou získaná hodnota IC_{50} pro cDDP ($12,20 \pm 4,42 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) se liší, nicméně rozdíly mohly být způsobeny zvoleným barvivem. V první zmíněné publikaci bylo zvoleno barvivo WTS-8 a ve druhé publikaci WTS-1. Obě tato barviva patří k tetrazoliovým solím, které se v buňkách redukuje na formazánový produkt, jež je detekován spektrofotometricky (Chamchoy et al., 2019). Jedná se tedy o obdobu MTT testu, který rovněž funguje na principu redukce barviva MTT na formazánový produkt, jež je extrahován z mitochondrií živých buněk a následně detekován (Ngamwongsatit et al., 2008). Kitada et al., 2008 rovněž testoval IC_{50} cDDP na linii HCT-116. Došel k hodnotě $6,61 \pm 1,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je podobný výsledek jako ten získaný v této práci ($9,49 \pm 0,21 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V článku Serova et al., 2006 byla zjištěna hodnota IC_{50} cDDP po 120 hodinách při použití MTT testu pro linii HT-29 $20,00 \pm 5,00 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V mém případě byly buňky HT-29 méně citlivé a hodnota IC_{50} dosahovala $33,39 \pm 7,90 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento rozdíl však mohl být způsoben opět použitím jiného barviva a také dobou expozice testovaným látkám. Výsledky pro testovaný komplex (1) lze porovnat s publikací Schmitt et al., 2018, kde byl komplex (1) podroben antiproliferativnímu testu MTT pro linie HT-29 a HCT-116. Hodnota IC_{50} po 72 hodinách pro buňky HT-29 byla $0,082 \pm 6,000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v mém případě ($1,87 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebylo dosaženo takovéto citlivosti vůči komplexu (1). Linie HCT-116 se v této práci ukázala jako nejvíce citlivá vůči testovanému komplexu ruthenia ($0,27 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), nicméně Schmitt et al., 2018 získal IC_{50} při koncentraci $0,063 \pm 2,500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Navzdory tomu, že nový rutheniový komplex nevykazuje tak vysokou antiproliferativní aktivitu jako ve zmíněné publikaci, prokázal i tak velmi dobré výsledky. Ve srovnání s působením cDDP byl komplex (1) 4,3x efektivnější na linii SW-620; dále 35,1x účinnější na buňky HCT-116 a 17,9x účinnější na buňky HT-29. Při porovnání s jiným rutheniovým komplexem jako třeba komplexem ruthenia (II) s 2-hydrazinopyridinem, zkoumaným v článku Soliman et al., 2019, vykazuje komplex (1) podobné výsledky. Jeden ze zkoumaných rutheniových komplexů dosáhl podobné hodnoty IC_{50} vůči linii HCT-116 ($0,154 \pm 0,006 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), jako zde použitý komplex (1). V tabulce 1 je také možné vidět, že u linií HT-29 (cDDP) a SW-620 (cDDP) mají výsledky vyšší směrodatné odchylky. Tyto odchylky se vyskytly pravděpodobně z důvodu růstu buněk v klastrech a ošetření tedy nemuselo proběhnout homogenně.

Buněčné linie byly dále podrobeny testu zacelování ráhy, kde každá ze zmíněných linií vykazovala rozdílnou schopnost migrace zpět do místa ráhy. Buňky SW-620 a HT-29

nedosáhly výrazného zacelení kontrolní rýhy bez ošetření ani po 48 hodinách inkubace. U buněk HT-29 výsledek nebyl překvapivý, jelikož nejsou považovány za vhodný model na tento typ testování a ani v člancích moc nebývají v tomto ohledu zmiňovány. Na druhou stranu, buňky SW-620 bývají využívány a jsou známé svou migrační schopností, například v článku Huang et al., 2021 tato linie dosáhla po 48 hodinách plného zacelení rýhy. Lze tedy usuzovat, že u buněk SW-620 v tomto případě došlo k mutaci, která zapříčinila změnu schopnosti migrovat u daného subklonu. V kontrastu s těmito liniemi byly buňky HCT-116 velice aktivní a vhodné pro testování komplexu (1).

Za účelem testování komplexu (1) na modelu metastazujícího kolorektálního karcinomu byla použita právě linie HCT-116, která ve srovnání s dalšími testovanými liniemi, prokázala nejvyšší metastatický potenciál (Ishizu et al., 2007). Vzhledem k prokázaným vlastnostem byly buňky HCT-116 dále ošetřeny komplexem (1) a cDDP pro porovnání. Efekt komplexu (1) byl zaznamenán na snímcích rýhy, kde na rozdíl od kontrolní zarostlé jizvy, k plnému zacelení nedošlo. Komplex cDDP do značné míry pozastavil migraci, nicméně v porovnání s komplexem (1) působil 1,6x méně efektivně.

Při testu zacelování rýhy bylo možné vidět, že neošetřené linie HT-29 a SW-620 neměly dobrý migrační fenotyp. Buňky nemigrovaly zpět do rýhy, a proto je nebylo možné ani vhodně využít pro re-adhezní test. Naopak linie HCT-116 prokázala vhodný fenotyp migrace a byla vybrána dále i pro re-adhezní test. Komplex (1) prokázal značný vliv na re-adhezi buněk této linie. Po obarvení ošetřených buněk HCT-116 (ošetřené trojnásobkem hodnoty IC_{50} po 72 hodinách cDDP či komplexu (1)) pomocí SRB a spektrofotometrického měření bylo zjištěno, že komplex (1) nezabránil re-adhezi u $64,56 \pm 3,79$ % buněk, zatímco cDDP neprokázala skoro žádný vliv a pod jejím působením re-adherovalo $95,58 \pm 11,71$ % buněk. Komplex (1) tedy vykazoval 1,5x účinnější vliv na re-adhezi než cDDP.

5. ZÁVĚR

Vlivem častého výskytu kolorektálních karcinomů a závažnosti tohoto onemocnění v populaci, byla a jsou vyvíjena a testována stále nová léčiva. V minulosti byla vyvinuta řada platinových komplexů, nicméně tato léčiva nejsou na kolorektální karcinom, až na výjimky, příliš účinná a vzhledem k jejich vedlejším účinkům a vzniku rezistence buněk byla pozornost upřena vůči dalším kovům. Rutheniové komplexy se zdají býti dobrou alternativou a proto jsou syntetizovány stále nové látky, které jsou podrobovány různým testům. V této práci byl zkoumán rutheniový komplex nesoucí naftopyranový ligand.

Vliv zmíněného komplexu (1) byl testován na buněčných liniích kolorektálního karcinomu s různým fenotypem a to na liniích HCT-116, HT-29 a SW-620.

Prvním zvoleným testem byl test antiproliferativní aktivity provedený pomocí barvení neutrální červení. Díky tomuto testu byly získány hodnoty IC_{50} potřebné pro další experimenty. Jako srovnávací komplex byla zvolena cDDP. Z výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší citlivost vůči komplexu (1), stejně tak i vůči cDDP vykazuje linie HCT-116.

Migrační aktivita linií byla zkoumána testem zacelování rýhy, kde se buňky HT-29 a také nečekaně buňky SW-620 ukázaly jako nevhodné k tomuto typu testu, jelikož jejich neošetřená kontrolní rýha nedosáhla signifikantního zacelení ani po 48 hodinách. Vybrané komplexy byly tedy testovány pouze na linii HCT-116, kde byl viditelný antimigrační vliv jak komplexu (1) tak i cDDP, nicméně komplex (1) působil 1,6x efektivněji než cDDP.

Posledním provedeným experimentem byl test re-adheze, kde byl pozorován vliv komplexu (1) a cDDP na re-adhezi buněk HCT-116, které jako jediné prokázaly vhodný fenotyp pro tento typ testu. Komplex (1) v porovnání s cDDP vykazoval 1,5x vyšší vliv na re-adhezi buněk HCT-116.

S ohledem na dosažené výsledky lze říci, že u komplexu (1) byla dokázána antiproliferativní i antimigrační aktivita, stejně tak schopnost ovlivnit re-adhezi buněk HCT-116. Uvedené faktory, tedy migrace a adheze, jsou klíčové také *in vivo* při tvorbě metastáz. Lze tedy předpokládat, že daný komplex (1) má do budoucna potenciál a zaslouží si podstoupit další studie vlivu na buňky metastazujícího kolorektálního karcinomu, kdy by mohl být v budoucnu testován jako možné léčivo pro tento typ onemocnění.

6. SEZNAM LITERATURY

- Alberto, M.E., Lucas, M.F.A., Pavelka, M., Russo, N., 2009. The Second-Generation Anticancer Drug Nedaplatin: A Theoretical Investigation on the Hydrolysis Mechanism. *J. Phys. Chem. B* 113, 14473–14479. <https://doi.org/10.1021/jp9056835>
- Alcindor, T., Beauger, N., 2011. Oxaliplatin: A Review in the Era of Molecularly Targeted Therapy. *Curr. Oncol.* 18, 18–25. <https://doi.org/10.3747/co.v18i1.708>
- Alessio, E., 2017. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, 1549–1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>
- Alessio, E., Messori, L., 2019. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* 24, 1995. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>
- Ang, W.H., Casini, A., Sava, G., Dyson, P.J., 2011. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. *J. Organomet. Chem., Special Issue on International Symposium on Bioorganometallic Chemistry (ISBOMC'10)* 696, 989–998. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.11.009>
- Bai, L., Gao, C., Liu, Q., Yu, C., Zhang, Z., Cai, L., Yang, B., Qian, Y., Yang, J., Liao, X., 2017. Research progress in modern structure of platinum complexes. *Eur. J. Med. Chem.* 140, 349–382. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.034>
- Bergamo, A., Gagliardi, R., Scarcia, V., Furlani, A., Alessio, E., Mestroni, G., Sava, G., 1999. In Vitro Cell Cycle Arrest, In Vivo Action on Solid Metastasizing Tumors, and Host Toxicity of the Antimetastatic Drug NAMI-A and Cisplatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 559–564.
- Bergamo, A., Sava, G., 2015. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chem. Soc. Rev.* 44, 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/C5CS00134J>
- Bijelic, A., Theiner, S., Keppler, B.K., Rompel, A., 2016. X-ray Structure Analysis of Indazolium trans-[Tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides Insights into the Drug Binding Mechanism. *J. Med. Chem.* 59, 5894–5903. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00600>
- Brabec, V., Hrabina, O., Kasparkova, J., 2017. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coord. Chem. Rev., Bioinorganic Chemistry in the European Union* 351, 2–31. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.04.013>
- Brabec, V., Kasparkova, J., 2018. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coord. Chem. Rev.* 376, 75–94. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012>
- Buckhaults, P., Rago, C., St. Croix, B., Romans, K.E., Saha, S., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 2001. Secreted and Cell Surface Genes Expressed in Benign and Malignant Colorectal Tumors. *Cancer Res.* 61, 6996–7001.
- Carbone, A., 2020. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers* 12, 980. <https://doi.org/10.3390/cancers12040980>
- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U., Boonyuen, U., 2019. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochem.* 20, 4. <https://doi.org/10.1186/s12858-019-0108-1>
- Choy, H., Park, C., Yao, M., 2008. Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue. *Clin. Cancer Res.* 14, 1633–1638. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2176>
- Confino-Cohen, R., Fishman, A., Altaras, M., Goldberg, A., 2005. Successful carboplatin desensitization in patients with proven carboplatin allergy. *Cancer* 104, 640–643. <https://doi.org/10.1002/cncr.21168>

- Das, U., Kar, B., Pete, S., Paira, P., 2021. Ru(II), Ir(III), Re(I) and Rh(III) based complexes as next generation anticancer metallopharmaceuticals. *Dalton Trans.* 50, 11259–11290. <https://doi.org/10.1039/D1DT01326B>
- Dilruba, S., Kalayda, G.V., 2016. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 1103–1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Dömötör, O., Hartinger, C.G., Bytzek, A.K., Kiss, T., Keppler, B.K., Enyedy, E.A., 2013. Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 18, 9–17. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0944-6>
- Dougan, S.J., Sadler, P.J., 2007. The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents. *CHIMIA* 61, 704–704. <https://doi.org/10.2533/chimia.2007.704>
- Han, X., Sun, J., Wang, Y., He, Z., 2015. Recent Advances in Platinum (IV) Complex-Based Delivery Systems to Improve Platinum (II) Anticancer Therapy. *Med. Res. Rev.* 35, 1268–1299. <https://doi.org/10.1002/med.21360>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Huang, C., Chen, C., Zheng, F., Ni, X., Lin, J., Wu, W., Lai, X., 2021. ATF3 inhibits the growth and stem cells-like features of SW620 colorectal cancer cells in vitro. *J. Mens Health* 17, 287–294. <https://doi.org/10.31083/jomh.2021.072>
- Ishizu, K., Sunose, N., Yamazaki, K., Tsuruo, T., Sadahiro, S., Makuuchi, H., Yamori, T., 2007. Development and Characterization of a Model of Liver Metastasis Using Human Colon Cancer HCT-116 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1779–1783. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1779>
- Kai Yan, Y., Melchart, M., Habtemariam, A., J. Sadler, P., 2005. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* 0, 4764–4776. <https://doi.org/10.1039/B508531B>
- Kalyane, D., Raval, N., Maheshwari, R., Tambe, V., Kalia, K., Tekade, R.K., 2019. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Mater. Sci. Eng. C* 98, 1252–1276. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.066>
- Karmakar, S., Poetsch, I., Kowol, C.R., Heffeter, P., Gibson, D., 2019. Synthesis and Cytotoxicity of Water-Soluble Dual- and Triple-Action Satraplatin Derivatives: Replacement of Equatorial Chlorides of Satraplatin by Acetates. *Inorg. Chem.* 58, 16676–16688. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02796>
- Kartalou, M., Essigmann, J.M., 2001. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 478, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00142-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00142-7)
- Kilpin, K.J., Dyson, P.J., 2013. Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. *Chem. Sci.* 4, 1410–1419. <https://doi.org/10.1039/C3SC22349C>
- Kitada, N., Takara, K., Minegaki, T., Itoh, C., Tsujimoto, M., Sakaeda, T., Yokoyama, T., 2008. Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62, 577–584. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0640-3>
- Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., Watanabe, T., 2015. Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kumar Shah, P., Bhattacharjee, K., Kumar Shukla, P., 2016. Mechanisms of reactions of Ru(iii)-based drug NAMI-A and its aquated products with DNA purine bases: a DFT study. *RSC Adv.* 6, 113620–113629. <https://doi.org/10.1039/C6RA24251K>
- Lee, S.Y., Kim, C.Y., Nam, T.-G., 2020. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* 14, 5375–5392. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S275007>
- Liu, H.-K., Sadler, P.J., 2011. Metal Complexes as DNA Intercalators. *Acc. Chem. Res.* 44, 349–359. <https://doi.org/10.1021/ar100140e>

- Liu, J., Lai, H., Xiong, Z., Chen, B., Chen, T., 2019. Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy. *Chem. Commun.* 55, 9904–9914. <https://doi.org/10.1039/C9CC04098F>
- Louis, K.S., Siegel, A.C., 2011. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods, in: Stoddart, M.J. (Ed.), *Mammalian Cell Viability, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 7–12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
- McKeage, M.J., 2005. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin. Investig. Drugs*.
- Ngamwongsatit, P., Banada, P.P., Panbangred, W., Bhunia, A.K., 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J. Microbiol. Methods* 73, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.002>
- Ott, I., Gust, R., 2007. Preclinical and Clinical Studies on the Use of Platinum Complexes for Breast Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med. Chem.* 7, 95–110. <https://doi.org/10.2174/187152007779314071>
- Oun, R., E. Moussa, Y., J. Wheate, N., 2018. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 47, 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>
- Patel, A., 2020. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol.* 6, 1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>
- Peti, W., Pieper, T., Sommer, M., Keppler, B.K., Giester, G., 1999. Synthesis of Tumor-Inhibiting Complex Salts Containing the Anion trans-Tetrachlorobis(indazole)ruthenate(III) and Crystal Structure of the Tetraphenylphosphonium Salt. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1999, 1551–1555. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0682\(199909\)1999:9<1551::AID-EJIC1551>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0682(199909)1999:9<1551::AID-EJIC1551>3.0.CO;2-7)
- Piccart, M.J., Lamb, H., Vermorken, J.B., 2001. Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Ann. Oncol.* 12, 1195–1203. <https://doi.org/10.1023/A:1012259625746>
- Pierre, P.V., Wallin, I., Eksborg, S., Ehrsson, H., 2011. Quantitative liquid chromatographic determination of intact cisplatin in blood with microwave-assisted post-column derivatization and UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.028>
- Pluim, D., van Waardenburg, R.C.A.M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2004. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 71–78. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0773-6>
- Pongratz, M., Schluga, P., A. Jakupec, M., B. Arion, V., G. Hartinger, C., Allmaier, G., K. Keppler, B., 2004. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 46–51. <https://doi.org/10.1039/B309160K>
- Prewett, M., Deevi, D.S., Bassi, R., Fan, F., Ellis, L.M., Hicklin, D.J., Tonra, J.R., 2007. Tumors Established with Cell Lines Selected for Oxaliplatin Resistance Respond to Oxaliplatin if Combined with Cetuximab. *Clin. Cancer Res.* 13, 7432–7440. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1768>
- Puckett, C.A., Barton, J.K., 2010. Targeting a ruthenium complex to the nucleus with short peptides. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3564–3569. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.081>
- Rademaker-Lakhai, J.M., van den Bongard, D., Pluim, D., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2004. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clin. Cancer Res.* 10, 3717–3727. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>
- Rakoff-Nahoum, S., 2006. Cancer issue: Why Cancer and Inflammation? *Yale J. Biol. Med.* 79, 123.
- Rausch, M., Dyson, P.J., Nowak-Sliwinska, P., 2019. Recent Considerations in the Application of RAPTA-C for Cancer Treatment and Perspectives for Its Combination with Immunotherapies. *Adv. Ther.* 2, 1900042. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900042>

- Reddy B., V.P., Mukherjee, S., Mitra, I., Moi, S.Ch., 2017. A theoretical investigation on bio-transformation of third generation anti-cancer drug Heptaplatin and its interaction with DNA purine bases. *Chem. Phys. Lett.* 690, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.10.050>
- Renfrew, A.K., Phillips, A.D., Egger, A.E., Hartinger, C.G., Bosquain, S.S., Nazarov, A.A., Keppler, B.K., Gonsalvi, L., Peruzzini, M., Dyson, P.J., 2009. Influence of Structural Variation on the Anticancer Activity of RAPTA-Type Complexes: ptn versus pta. *Organometallics* 28, 1165–1172. <https://doi.org/10.1021/om800899e>
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.-L., 2005. Wound-Healing Assay, in: Guan, J.-L. (Ed.), *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology™*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 23–29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>
- Sava, G., Capozzi, I., Clerici, K., Gagliardi, G., Alessio, E., Mestroni, G., 1998. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 371–379. <https://doi.org/10.1023/A:1006521715400>
- Schmitt, F., Kasparkova, J., Brabec, V., Begemann, G., Schobert, R., Biersack, B., 2018. New (arene)ruthenium(II) complexes of 4-aryl-4H-naphthopyrans with anticancer and anti-vascular activities. *J. Inorg. Biochem.* 184, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.013>
- Scolaro, C., Bergamo, A., Brescacin, L., Delfino, R., Cocchietto, M., Laurency, G., Geldbach, T.J., Sava, G., Dyson, P.J., 2005. In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.* 48, 4161–4171. <https://doi.org/10.1021/jm050015d>
- Serova, M., Calvo, F., Lokiec, F., Koeppl, F., Poindessous, V., Larsen, A.K., Laar, E.S.Van., Waters, S.J., Cvitkovic, E., Raymond, E., 2006. Characterizations of irifulven cytotoxicity in combination with cisplatin and oxaliplatin in human colon, breast, and ovarian cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57, 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0063-y>
- Shah, P.K., Shukla, P.K., 2022. Formation of bifunctional cross-linked products due to reaction of NAMI-A with DNA bases – a DFT study. *Struct. Chem.* 33, 807–814. <https://doi.org/10.1007/s11224-022-01897-0>
- Shimada, M., Itamochi, H., Kigawa, J., 2013. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* 5, 67–76. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S35785>
- Sliesoraitis, S., Chikhale, P.J., 2005. Carboplatin hypersensitivity. *Int. J. Gynecol. Cancer* 7.
- Soliman, A.A., Attaby, F.A., Alajrawy, O.I., Majeed, S.R., Sahin, C., Varlikli, C., 2019. Soluble Cytotoxic Ruthenium(II) Complexes with 2-Hydrazinopyridine. *Russ. J. Inorg. Chem.* 64, 742–754. <https://doi.org/10.1134/S0036023619060020>
- Sonkar, C., Sarkar, S., Mukhopadhyay, S., 2022. Ruthenium(II)–arene complexes as anti-metastatic agents, and related techniques. *RSC Med. Chem.* 13, 22–38. <https://doi.org/10.1039/D1MD00220A>
- Śpiewak, K., Brindell, M., 2015. Impact of low- and high-molecular-mass components of human serum on NAMI-A binding to transferrin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 695–703. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1255-5>
- Süss-Fink, G., 2010. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.* 39, 1673–1688. <https://doi.org/10.1039/B916860P>
- Tan, C., Lai, S., Wu, S., Hu, S., Zhou, L., Chen, Y., Wang, M., Zhu, Y., Lian, W., Peng, W., Ji, L., Xu, A., 2010. Nuclear Permeable Ruthenium(II) β -Carboline Complexes Induce Autophagy To Antagonize Mitochondrial-Mediated Apoptosis. *J. Med. Chem.* 53, 7613–7624. <https://doi.org/10.1021/jm1009296>
- Tanaka, S., Hosokawa, M., Yonezawa, T., Hayashi, W., Ueda, K., Iwakawa, S., 2015. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Down-Regulation of miR-200c and miR-141 in Oxaliplatin-Resistant Colorectal Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 435–440. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00695>

- Todd, R.C., Lippard, S.J., 2009. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1, 280–291. <https://doi.org/10.1039/B907567D>
- Trondl, R., Heffeter, P., R. Kowol, C., A. Jakupec, M., Berger, W., K. Keppler, B., 2014. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci.* 5, 2925–2932. <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>
- Vacca, A., Bruno, M., Boccarelli, A., Coluccia, M., Ribatti, D., Bergamo, A., Garbisa, S., Sartor, L., Sava, G., 2002. Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *Br. J. Cancer* 86, 993–998. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600176>
- Vijgh, V.D., F, W.J., 1991. Clinical Pharmacokinetics of Carboplatin. *Clin. Pharmacokinet.* 21, 242–261. <https://doi.org/10.2165/00003088-199121040-00002>
- Wexselblatt, E., Yavin, E., Gibson, D., 2012. Cellular interactions of platinum drugs. *Inorganica Chim. Acta, Special Issue: Metals in Medicine* 393, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.07.013>
- Wolters, D.A., Stefanopoulou, M., Dyson, P.J., Groessl, M., 2012. Combination of metallomics and proteomics to study the effects of the metallodrug RAPTA-T on human cancer cells. *Metallomics* 4, 1185–1196. <https://doi.org/10.1039/c2mt20070h>
- Wu, Q., Qin, S.-K., Teng, F.-M., Chen, C.-J., Wang, R., 2010. Lobaplatin arrests cell cycle progression in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Hematol. Oncol.* 3, 43. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-43>
- Zander, T., Xue, J., Markson, G., Dahm, F., Renner, C., 2022. Satraplatin Demonstrates High Cytotoxic Activity Against Genetically Defined Lymphoid Malignancies. *Anticancer Res.* 42, 1821–1832. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.15658>
- Zeng, L., Gupta, P., Chen, Y., Wang, E., Ji, L., Chao, H., Chen, Z.-S., 2017. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 46, 5771–5804. <https://doi.org/10.1039/C7CS00195A>
- Zhang, H.-Y., Liu, Y.-R., Li, W., Li, H., Dou, S.-X., Xie, P., Wang, W.-C., Wang, P.-Y., 2014. Condensations of single DNA molecules induced by heptaplatin and its chiral isomer. *AIP Adv.* 4, 087128. <https://doi.org/10.1063/1.4893672>
- Zhang, J.-Q., Li, K., Jiang, K.-M., Cong, Y.-W., Pu, S.-P., Xie, X.-G., Jin, Y., Lin, J., 2016. Development of an oral satraplatin pharmaceutical formulation by encapsulation with cyclodextrin. *RSC Adv.* 6, 17074–17082. <https://doi.org/10.1039/C5RA27182G>