

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko–technologická**

**Analýza vlivu komplexů přechodných kovů na nádorové buněčné linie**

**Disertační práce**

**2021**

**Mgr. Lucie Melounková**

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza vlivu komplexů přechodných kovů na nádorové buněčné linie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 9. 2021

Mgr. Lucie Melounková v. r.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Jaromíru Vinklárkovi, Dr. za odborné vedení disertační práce, trpělivost, cenné rady a pomoc při řešení problémů. Poděkování patří týmu Katedry obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice za poskytnuté sloučeniny a Ústavu lékařské biochemie LF v Hradci Králové za poskytnutí pracovního zázemí, jmenovitě pak prof. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D a RNDr. Radimu Havelekovi, Ph.D za odbornou pomoc, rady a konzultace během experimentální práce.

V neposlední řadě děkuji svému milovanému manželovi a rodině za velké pochopení a podporu v průběhu mého celého studia.

## **ANOTACE**

V teoretické části byly shrnuty aktuální poznatky spojené s biologickou aktivitou komplexů přechodných kovů. V experimentální části byly sumarizovány a diskutovány výsledky sedmi uvedených odborných publikací, zabývajících se stanovením cytostatické aktivity nově připravených sloučenin vanadu, molybdenu a platiny, studiem mechanismu účinku vybraných komplexů a možností využití grafenových struktur pro cílený transport léčiv. Získané výsledky potvrdily vysokou cytotoxickou aktivitu studovaných komplexů proti širokému spektru nádorových linií, včetně linie rezistentní vůči působení *cis*-platiny, a vysokou cytotoxicitu testovaných nanočástic k nenádorovým buňkám.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

přechodné kovy, metaloceny, cytotoxicita, apoptóza, mechanismus účinku, grafen

## **TITLE**

Analysis of the effect of transition metal complexes on tumor cell lines

## **ANNOTATION**

The current knowledge connected with biological activity of complexes of transition metals was summarized in the theoretical part. In the experimental part, the results of seven mentioned expert publications concerning with determination of cytostatic activity of newly prepared compounds of vanadium, molybdenum and platinum, with study of mechanism of effect of chosen complexes and with study of possible use of graphene structures for aimed transport of drug were summarized and discussed. Obtained results confirmed high cytotoxic activity against wide spectrum of cancer lines, including line resistant against impact of *cis*-platin, and also high cytotoxicity of tested nanoparticles to non-cancer cells.

## **KEYWORDS**

transition metals, metallocenes, cytotoxicity, apoptosis, mechanism of action, graphene

# OBSAH

ÚVOD.....	12
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1. Molekulární regulace růstu buňky.....	13
1.2. Molekulární regulace p53 a p21.....	14
1.3. Mutace tumor supresorového genu p53.....	15
1.4. Nádorová onemocnění.....	17
1.5. Léčba <i>cis</i> -platinou.....	17
1.6. Přechodné kovy v léčbě nádorového onemocnění.....	20
1.6.1. Biologické účinky molybdenu.....	23
1.6.2. Cytotoxické účinky molybdenových komplexů.....	24
1.6.3. Biologické účinky vanadu.....	25
1.6.4. Cytotoxické účinky vanadu.....	26
1.6.5. Cytotoxicita vanadocenových komplexů.....	29
1.7. Využití grafenových nanostruktur jako nosiče léčiv.....	33
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	36
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1. Přístroje a zařízení.....	37
4.2. Použitý materiál.....	37
4.3. Chemikálie a roztoky.....	37
4.4. Testované komplexy.....	39
4.5. Buněčné linie.....	39
4.6. Kultivace buněčných linií.....	39
4.7. Počítání buněk.....	40
4.8. Stanovení cytotoxické aktivity pomocí mitochondriální dehydrogenázy.....	41

4.9.	Stanovení viability a proliferace buněk .....	42
4.10.	Stanovení laktát dehydrogenázy .....	42
4.11.	Stanovení apoptózy .....	43
4.12.	Stanovení kaspázové aktivity .....	43
4.13.	Stanovení buněčného cyklu.....	43
4.14.	qRT-PCR.....	44
4.15.	Analýza buněčných proteinů.....	44
4.16.	Statistická analýza.....	45
5.	VÝSLEDKY.....	46
5.1.	Výsledek 1 .....	46
5.2.	Výsledek 2 .....	59
5.3.	Výsledek 3 .....	68
5.4.	Výsledek 4 .....	82
5.5.	Výsledek 5 .....	89
5.6.	Výsledek 6 .....	104
5.7.	Výsledek 7 .....	114
6.	DISKUZE.....	124
6.1.	Srhnutí výsledků .....	124
6.2.	Stanovení cytotoxicity komplexů pomocí WST-1 testu .....	124
6.3.	Analýza mechanismu působení vybraných komplexů .....	127
7.	ZÁVĚR.....	133
8.	LITERATURA .....	134

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Role mutantní p53 (mutp53) v tumorigenezi.....	16
Obrázek 2 - Znárodnění mechanismu účinku cis-platiny .....	19
Obrázek 3 - Účinek titanocenových derivátů na buňku.....	22
Obrázek 4 - Účinky vanadových sloučenin na buněčné linie .....	28
Obrázek 5 - Struktura grafenových nanočástic .....	34
Obrázek 6 - Struktura lomeného vanadocenu .....	125
Obrázek 7 - Struktura monosendvičového idenylového komplexu molybdenu.....	126

## SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma 1 - Syntéza Titanocenu Y.....	21
Schéma 2 - Vanadocenové komplexy.....	31

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Složení kultivačních médií pro jednotlivé buněčné linie.....	43
--	----

## SEZNAM ZKRATEK

4,7-Ph <sub>2</sub> -phen	4,7-fenyl-fenantrolin (z ang. 4,7-phenyl-phenanthroline)
A2780	buňky lidského ovariálního karcinomu
A2780cis	buňky lidského ovariálního karcinomu rezistentní k <i>cis</i> -platině
A549	adenokarcinonová linie nádoru plic
AQP2	z ang. aquaporine 2
AIFM	z ang. apoptosis inducing factor mitochondria associated
AKT	z ang. thymomas of aldo-keto reductase
ATM	z ang. mutated in ataxia telangiectasia
ATR	z ang. mutated in ataxia telangiectasia-rad-3-related kinase
BAK	z ang. B-cell lymphoma antagonist/killer 1
BAX	z ang. B-cell lymphoma -2-associated X protein
Bcl	z ang. B-cell lymphoma
bda	benzen-1,2-diamin
Betain	<i>N, N, N</i> -trimethylglycin
bian	1,2-bis(fenylimino)acenaften
bpy	bipyridin, z ang. bipyridine
bq	2,2'-bichinolin
c-Abl	z ang. abelson tyrosine kinase
CCNB1	z ang. G2/mitotic-specific cyclin-B1
CDK	cyklin dependentní kináza (z ang. cycline dependent kinases)
CDKN1A	z ang. cyclin dependent kinase inhibitor 1A
c-Flip	z ang. cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein
CHK	z ang. check point kinase
cip1	z ang. cycline dependent kinases-interacting protein 1
CIP/KIP	z ang. cycline dependent kinases interacting protein/kinase inhibitory protein
<i>cis</i> -platina	<i>cis</i> -diamindichloroplatnatý komplex
c-myc	z ang. cancers myelocytomatosis
Cop1	z ang. constitutively photomor phogenic 1
cp	cyklopentadienyl
CTRL1	z ang. copper transporter 1
dafon	4,5-diazafluoren-9-one
DMEM	z ang. Dulbecco's modified eagle's medium composition

dppz	dipyridol[3,2-a:2',3'-c]fenazin
E2F	z ang. E2 transcription factor
ERK	z ang. extracellular signal-regulated kinases
FAS	z ang. first apoptosis signal
FAK	z ang. focal adhesion kinase
FBS	fetální hovězí sérum (z ang. fetal bovine serum)
G-fáze	z ang. Gap
glut	glutamin
GO	grafenoxid
GOF	onkogenní zisk z funkce (z ang. gain of function)
GO-F127	grafenoxid koutovaný Pluronic F127
GSH	glutathion
HDF	buňky lidských dermálních fibroblastů
HeLa	buňky nádoru děložního hrdla
HL-60	buňky lidské promyelocytární leukémie
HT-29	buňky kolorektálního karcinomu II. stupně
H-RAS	z ang. harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	z ang. horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	hodnota poloviční inhibiční koncentrace
IMDM	z ang. Iscove's modified dulbecco's medium
INK	z ang. inhibitors of cycline dependent kinases
JNK	z ang. c-Jun N-terminal kinase
Jurkat	buňky lidské T-lymfocytární leukémie
LDH	laktátdehydrogenáza
M-fáze	mitotická fáze
MAPK	mitogeny aktivované proteinové kinázy (z ang. mitogen-activated protein kinases)
MCF-7	prsní karcinom epiteliálních buněk
MDM2	z ang. mouse double minute 2
MDR1	z ang. multidrug resistance protein 1
miRNA	mikroRNA
MMP	z ang. matrix metalloproteinase
MOLT-4	buňky akutní T-lymfoblastické leukémie
Mpl	z ang. myeloproliferative leukemia protein

MRC-5	lidské buňky fibroblastů plicní tkáň
MRP	z ang. multidrug resistance-associated protein
mut	mutace
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NEAA	nenasyčené mastné kyseliny (z ang. non essential amino acids)
NF- $\kappa$ B	z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p	protein
PANC-1	buňky odvozené z karcinomu pankreatu
PBS	fosfátový pufr (z ang. phosphate buffered saline)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEG	polyethylenglykol
phen	fenantrolin (z ang. phenanthroline)
PI3K	z ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PNC	penicilin
pRb	z ang. retinoblastoma protein
pyma	(E)-N-((pyridin-2-yl)methylen)benzenamin
RAS	z ang. rat sarcoma
RAF	z ang. rapidly accelerated fibrosarcoma
RET/PTC1	z ang. proto-oncogene encodes a receptor tyrosine kinase associated with papillary thyroid carcinoma
rGO	redukovaný grafenoxid
ROS	reaktivní formy kyslíku (z ang. reactive oxygen species)
RPMI	z ang. Roswell Park Memorial Institute
rsw-GO	z ang. reduce salt-washed grafeneoxide
S-fáze	syntetická fáze
Saos2	buňky osteosarkomu
ser	serin
SLCs	z ang. solute carrier
STAT	z ang. signal transducer and activator of transcription protein
STR	streptomycin
sw-GO	z ang. salt-washed grafeneoxide
TA	z ang. transcriptional aktivator
thr	threonin
Titanocen Y	bis-[(p-methoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorotitaničitý komplex

TMEM z ang. transmembrane protein  
Trim32 z ang. tripartite motif-containing protein 32  
Vanadocen Y bis-[(p-methoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý komplex  
Waf1 z ang. wild type p53 activated factor  
WST-1 z ang. water-soluble tetrazolium-1

## ÚVOD

Navzdory neustálému poklesu úmrtnosti, souvisejícímu s rozvojem medicíny počátkem 90. let, obsazují nádorová onemocnění jedny z prvních příček nejčastějších příčin úmrtí na celém světě<sup>1</sup>. Chemoterapie, spolu se strategiemi, jako je chirurgické odstranění nádoru a radioterapie, představuje hlavní formu léčby rakoviny<sup>2</sup>.

Zájem o použití komplexů přechodných kovů jako chemoterapeutik vzrostl od objevu cytotoxické aktivity *cis*-diamendichloroplatinatého komplexu (*cis*-platiny) Rosenbergem a kol. v roce 1965<sup>3</sup>. Tyto komplexy mohou zaujmout celou řadu geometrií a mohou být dále modifikovány změnami ligandů, což umožňuje významnou kontrolu nad kinetickými, termodynamickými a strukturálními aspekty těchto systémů<sup>4,5</sup>. Modifikace ligandové sféry komplexů přechodných kovů může mít také podstatné účinky na důležité farmakologické vlastnosti, jako jsou rozpustnost, stabilita a cytotoxicita<sup>6,7</sup>.

Vývoj nových metaloterapeutik se v současné době ubírá dvěma směry. Na jedné straně byla do klinické praxe zavedena platinová cytostatika II. a III. generace a jsou vyvíjena stále nová platinová léčiva<sup>8</sup>. Na straně druhé jsou studovány komplexy obsahující také neplatinový přechodný kov. Na základě shodných geometrických parametrů s *cis*-platinou byly studovány i lomené metaloceny IV, V a VI skupiny periodického systému<sup>9-12</sup>. V *in vivo* testech na myších s implantovanými buňkami Ehrlichova ascitovaného tumoru byly nejúčinnějšími metalocendichloridy obsahující jako centrální atom Ti, V, Nb a Mo<sup>13-16</sup>.

Na základě výsledků těchto studií bylo navrženo i zadání předkládané disertační práce. Práce si vytkla za cíl stanovit cytotoxickou aktivitu nově připravených sloučenin vanadu, molybdenu, platiny a popsat mechanismus jejich cytotoxického působení.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Molekulární regulace růstu buňky

Vznik mnohobuněčného organismu z jednobuněčné zygoty je podmíněn mnoha koly dělení buňky s celou řadou událostí, které společně tvoří „buněčný cyklus“. Tento cyklus zahrnuje přesné zdvojení genomu během fáze syntézy DNA (S-fáze) a segregaci kompletních sad chromozomů do každé dceřiné buňky v mitotické fázi (M-fázi). Somatický buněčný cyklus také obsahuje fáze Gap, známé jako G1, která spojuje dokončení M-fáze s iniciací S-fáze a G2, která odděluje fáze S a M. V závislosti na okolních signálech mohou buňky buněčný cyklus v G1-fázi dočasně nebo trvale opustit a vstoupit do klidové fáze, známé jako G0<sup>17</sup>.

Přechod mezi jednotlivými fázemi z G1 do S a z G2 k M-fázi je regulován sekvenční aktivací a inaktivací proteinů rodiny cyklin dependentních kináz (CDK, z ang. cycline dependent kinases) serinu (ser) nebo threoninu (thr). Z více než 21 objevených CDK jsou nejznámější CDK2, CDK4 a CDK6 pro G1-fázi, CDK2 rovněž pro fázi S a CDK1 pro přechod z G2 do M-fáze. Tyto CDK jsou během buněčného cyklu stabilní. Regulační podjednotkou CDK jsou cykliny, které jsou syntetizovány nebo degradovány během buněčného dělení<sup>18,19</sup>. Cykliny D1, D2 a D3 jsou prvními cykliny snímající mitogenní signály a jako růstové faktory aktivují CDK4 a CDK6. Aktivace CDK2 je pod vlivem cyklinů E1, E2 a vede k přechodu G1/S-fáze. Během S-fáze dochází k degradaci a nahrazení cyklinových proteinů E cyklinem A, čímž je umožněn přechod z S-fáze k mitóze. Na konci G2-fáze CDK1 interaguje s cyklinem A, později s cyklinem B<sup>18,20</sup>. Aktivita CDK je řízena tvorbou komplexu s cyklinem, posttranslačními modifikacemi a interakcí s jejich inhibitory jako jsou CIP/KIP (z ang. cycline dependent kinases interacting protein/kinase inhibitory protein) a INK (z ang. inhibitors of cycline dependent kinases). Do rodiny CIP/KIP patří protein (p) p21, p27 a p57, k nejznámějším inhibitorům rodiny INK se řadí p15, p16, p18 a p19. Klíčovým místem inhibice proteinů INK je vazba s CDK4 a CDK6 a zábrana vazby s cyklinem D. Oproti tomu členové rodiny CIP/KIP se váží na komplexy cyklinu A, E, D/CDK a potlačují jejich katalytickou aktivitu<sup>19,21,22</sup>.

## 1.2. Molekulární regulace p53 a p21

Jedna z nejznámějších klíčových regulací, která odvrací šíření a existenci poškozených buněk, je řízena přes „strážce genomu“ protein p53.

Tradiční pohled na aktivaci p53 popisuje buněčnou odpověď v několika krocích. Jedná se o stabilizaci proteinu sekvenčně specifickou vazbu na DNA s transkripční aktivací cílových genů. Ty se podílejí na apoptóze, zástavě buněčného cyklu, indukci senescence, opravy DNA, antioxidantních funkcích nebo metabolických regulacích celkově přispívajících k potlačení nádorů<sup>23,24</sup>. Ke stabilizaci p53 přispívají posttranslační modifikace, zvláště pak fosforylace na serinových nebo threoninových zbytcích pomocí proteinových kináz, jako jsou ATM (z ang. mutated in ataxia telangiectasia), ATR (z ang. mutated in ataxia telangiectasia-rad-3-related kinase), CHK1 (z ang. check point kinase) a CHK2, p38 a další. Modifikacemi v blízkosti N-koncové domény p53, jako je fosforylace na ser15 a ser20, dochází k vychýlení rovnováhy zpětnovazebné regulace pomocí vazby proteinu MDM2 (z ang. mouse double minute 2), inhibici ubiquitinligázové aktivity nebo následné degradaci p53<sup>25,26</sup>. Posttranslační změny na C-konci proteinu p53, jako např. fosforylace p53 na ser392 stabilizující tvorbu tetrameru aktivního p53, čímž usnadňují vazbu tohoto transkripčního faktoru na specifické sekvence cílových genů<sup>27,28</sup>. Důležitým efektozem pro p53 je protein o 165 aminokyselinové sekvenci p21. Díky specifické vazbě na CDK se rovněž označuje jako p21<sup>waf1/cip1</sup> (z ang. wild type p53 activated factor/cyclin dependent kinases-interacting Protein 1), též pojmenovaný dle kódujícího genu jako p21<sup>CDKN1A</sup> (z ang. cyclin dependent kinase inhibitor 1A)<sup>29,30</sup>. Nicméně, protein p21 může být mimo p53 řízen i přes p53 nezávislé aktivace genů, jak popisuje např. studie od Mullan a kol. z roku 2006, kde u nádorů rakoviny prsu a vaječníků dochází k expresi p21 bez účasti p53<sup>31</sup>.

Při poškození DNA dochází k inhibici fosforylace pRb (z ang. retinoblastoma protein) CDK2,4/cyklinem D. Dochází k uvolnění E2F (z ang. E2 transcription factor), který aktivuje p16 s následnou up-regulací p53. E2F rovněž působí na regulaci p21<sup>32</sup>. Aktivace p21 inhibuje CDK2/cyklin E a brání přechodu buňky z G1-fáze do S a replikaci DNA. Stejně tak působí i inhibice kinázové aktivity komplexu CDK1 a 2/cyklin A. Nadměrná exprese p21 může eventuálně inhibovat CDK1 a zastavit přechod buněčného cyklu v G2/M fázi<sup>33</sup>.

Množství proteinu p53 a p21 je v buňkách down-regulováno signalizační dráhou STAT (z ang. signal transducer and activator of transcription proteins). STAT signalizační cesta

indukuje expresi několika proteinů, jako jsou Bcl-2 (z ang. B-cell lymphoma 2), Bcl-XL (z ang. B-cell lymphoma), cyklin D1, c-myc (z ang. cancers myelocytomatosis) a další, které antagonizují p53. Nadměrná exprese STAT blokuje zástavu buněčného cyklu v G1-fázi, potlačuje množství p21 v mnoha typech rakoviny a podporuje proliferační potenciál buněk. Pokud dojde k nadměrné aktivaci STAT u nádorových buněk, nastane nekontrolovatelné dělení a množení daného nádoru<sup>34</sup>.

Interakce p21 se STAT signální dráhou může mít ale i proapoptický účinek. Pozorovat ho můžeme po inhibici proteinů, jako je Bcl-2, c-Flip (z ang. cellular FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein), Bcl-XL, což vede k usnadnění apoptické smrti buněk. Bylo rovněž prokázáno, že protein p21 aktivuje štěpení buňky pomocí efektorové kaspázy 3 a tímto postupem přispívá k indukci apoptózy nádorových buněk<sup>35</sup>.

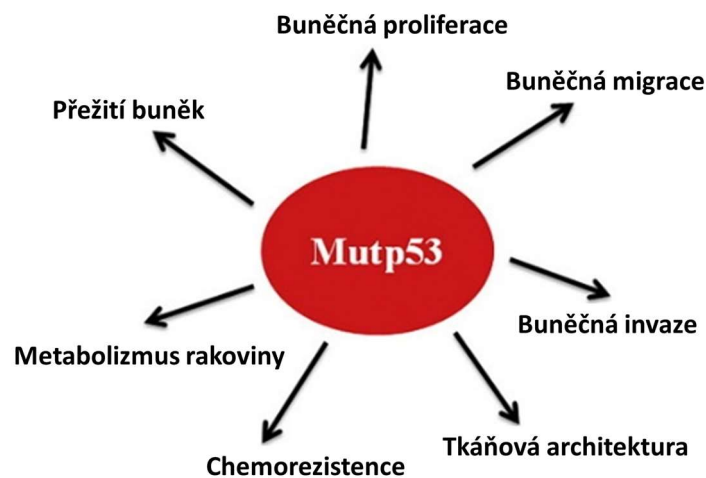
Protein p21 je negativně ovlivňován také skrz cestu RAS (z ang. rat sarcoma), jejím výkonným efektem je RAF (z ang. rapidly accelerated fibrosarcoma). V přítomnosti růstových faktorů RAF up-reguluje mitogeny aktivované proteinkinázy (MAPK, z ang. mitogen-activated protein kinases) a podporuje proliferaci buněk probuzením transkripčních faktorů. Nízké dávky RAF jsou dostatečné také pro aktivaci cyklinu D1 a reparaci DNA díky zvýšení fosforylace pRb a vstupu do S-fáze<sup>36</sup>. Další způsob inhibice p21 zahrnuje sníženou expresi E2F anebo chybějící funkčnost proteinu E2F<sup>37</sup>.

Při poruše buněčného dělení může dojít k rozvoji nádoru. Pro vznik nádorového onemocnění jsou definovány dvě třídy genů, podílející se na rozvoji karcinogeneze, a to onkogeny nebo tumor supresorové geny. Aktivace onkogenů se podílí na iniciaci, progresi a tumorigenezi. Geny potlačující nádory se podílejí na tvorbě nádorů po mutačních změnách nebo neaktivaci<sup>24</sup>.

### **1.3. Mutace tumor supresorového genu p53**

Nejčastější genetickou změnou spojenou s aktivací nádorového bujení je mutace (mut) supresorového genu pro protein p53<sup>38</sup>. Krom ztráty nádorové suprese získává buňka s mutp53 tzv. onkogenní zisk z funkce (GOF, z ang. gain of function) přispívající k maligní transformaci, zvýšení počtu buněk, invazi, chemorezistenci a metastatické schopnosti<sup>39</sup>. Akumulace mutp53

a GOF je pro mnoho aspektů tumorigeneze rozhodující<sup>40,41</sup>. Souhrnný účinek mutp53 na buněčné linie je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1 - Role mutantní p53 (mutp53) v tumorigenezi. Převzato a upraveno<sup>42</sup>.

Somatické mutace p53 jsou v téměř každém typu rakoviny v dávkách od 28 do 50 %, tak jako tomu je u karcinomu ovarii, esofagu, kolorekta, hlavy a krku a rakoviny plic. Z 5 % se somatické mutace vyskytují u primární leukémie, sarkomu, rakoviny varlat, maligního melanomu a rakoviny děložního čípku. Obecně jsou mutace častější v pokročilých fázích onemocnění nebo v subtypech rakoviny s agresivním chováním<sup>43-45</sup>. Somatické mutace jsou asi ze 3 – 5 % na cytozinu postreplikálně methylovány pomocí methyltransferázy. Vzniklý 5-methylcytozin je méně stabilní než cytozin a podléhá spontánní deaminaci na thymin a chybě v genetickém kódu. Rozvinutí vlastního nádorového bujení pak podporují také volné radikály kyslíku a dusíku, vznikající ze zánětlivých prekurzorů<sup>46</sup>.

Vlastností mutp53 je schopnost hromadit se v buňce v takových koncentracích, které dokonce dávají pozitivní výsledky při imunohistochemickém barvení. Mutp53 ztrácí ve srovnání s p53 transkripční aktivitu, ale bylo prokázáno, že prostřednictvím vazby na TAp63 a TAp73 (z ang. transcriptional aktivator) může dojít ke kompenzaci některých potlačených funkcí. Mutp53 se tak může podílet např. na regulaci struktury chromatinu pro regulaci exprese některých proteinů<sup>47</sup>. Jednou ze slibných strategií pro léčbu rakoviny se ukazuje destabilizace mutp53 a tím související redukce GOF v tumorigenezi<sup>48</sup>.

Na degradaci p53 panovalo do roku 2004 dogma, kdy převládala degradace vlivem E3 ubikvitinligázové aktivity díky proteinu MDM2. MDM2 je klíčový negativní regulátor pro p53.

Nicméně, samotný MDM2 protein spadá do rodiny proteinů, které jsou regulovány p53. U degradace p53 dochází k vytvoření zpětnovazebné smyčky MDM2 proteinu s p53. Mutace na p53 snižují interakční schopnost k MDM2. Narušení smyčky degradace mutp53 byla vysvětlována jako hlavní příčina akumulace mutp53 v nádorech<sup>48,49</sup>. Tento fenomén byl však zpochybněn po experimentu s „knock-in“ myšmi, kde bylo zjištěno, že k akumulaci mutp53 dochází nejen výhradně v nádorové tkáni, ale ke hromadění dochází i ve tkáni zdravé<sup>50</sup>, což podporuje GOF při samotném vývoji nádoru a snižuje přežití buněk<sup>51</sup>. K potvrzení došlo i po *in vivo* studii, která potvrzuje, že MDM2 může ubikvitinovat a degradovat i mutp53<sup>52</sup>.

Při nádorovém bujení kromě mutace p53 dochází k oslabení signalizace dalších mechanismů, včetně nadměrné exprese regulátorů, jako je zmiňovaná MDM2, pak MDM4, Cop1 (z ang. constitutively photomorphogenic 1), Trim32 (z ang. tripartite motif-containing protein)<sup>48,53</sup>. Je známo, že většina supresorů je deaktivována delecí, mutace na p53 jsou však způsobeny chybou, která vede ke vzniku mutp53 se substitucí jedné aminokyseliny<sup>54</sup>.

## 1.4.Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou celosvětovým problémem, který je druhou nejčastější příčinou úmrtí<sup>55</sup>. Během let 2005 až 2015 vzrostla incidence nádorového bujení o 33 %<sup>56</sup>. V roce 2015 byla rakovina diagnostikována na celém světě v 17,5 milionech případů, přičemž došlo k 8,7 milionům úmrtí osob. I přes klesající úmrtnost a vzestup pětileté relativní míry přežití jsou možnosti léčby stále omezené<sup>57</sup>.

## 1.5.Léčba *cis*-platinou

V roce 1978 schválil Úřad pro kontrolu potravin a léčiv *cis*-platinu jako první platinovou sloučeninu užívanou jako chemoterapeutikum a od té doby se začala hojně využívat při léčbě různého spektra rakoviny. Preklinickým hodnocením prošlo několik tisícovek analogů *cis*-platiny, avšak jen několik málo desítek prošlo klinickým testováním a pouze karboplatina s oxaliplatinou dosáhly celosvětového schválení pro léčbu rakoviny<sup>58,59</sup>.

Nejčastěji vyskytujícím se typem rakoviny je karcinom plic<sup>60</sup>. I navzdory nežádoucím účinkům, zahrnujícím renální poškození, je jeho klíčová léčba založena na *cis*-platině a karboplatině, zejména díky jejich silné antitumorové aktivitě proti tomuto typu nádoru<sup>61</sup>.

Nejčastějším nádorem, na který umírají ženy po celém světě, je rakovina prsu. I zde našla *cis*-platina své uplatnění při léčbě, kdy se soustřeďuje na cytotoxický efekt rychle se dělících buněk<sup>62,63</sup>.

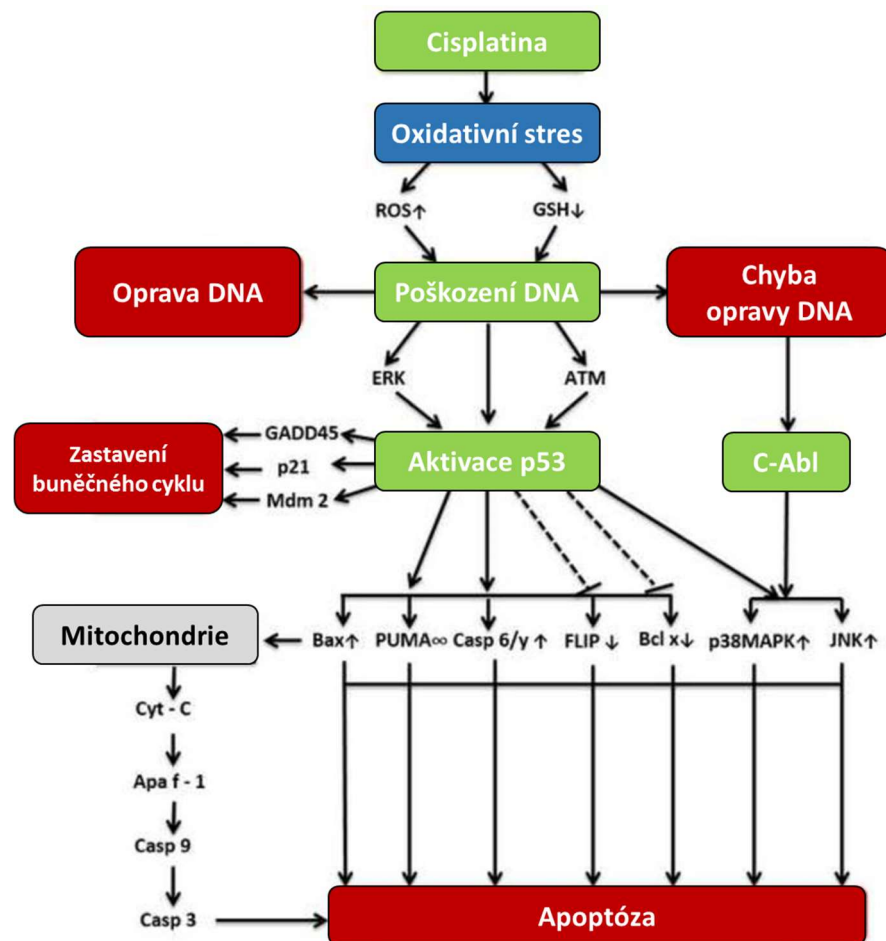
Léčení *cis*-platinou je užito u žen i při terapii karcinomu vaječníků, který patří mezi nejvíce mortalitní nádory z gynekologických nádorů a to hlavně z důvodu pozdní diagnostiky. V léčbě jako první dochází k chirurgickému odstranění nádoru a po něm následuje kombinace *cis*-platiny s taxanem. Tento model je pro první vlnu onemocnění velmi účinný, avšak léčba je omezena recidivou až u 75 % případů. Bohužel u recidivujících pacientek dochází k rezistenci na *cis*-platinu<sup>64</sup>. Jako hlavní léčba je pak, i přes nežádoucí účinky, použita znovu *cis*-platina, tentokrát ale v kombinaci s trichostatinem A nebo 5-aza-2'-deoxycitidinem<sup>65</sup>, s ferinem<sup>66</sup> nebo medonosným jedem<sup>67</sup>.

Dalším léčebným cílem *cis*-platiny je karcinom skvamozních buněk hlavy a krku s více než 600 000 novými pacienty ročně, přičemž celková míra přežití se během posledních desetiletí příliš nezměnila. Toto maligní onemocnění je stále spojeno s vysokou smrtností<sup>68</sup>. Samotná *cis*-platina není v léčbě účinná, proto se aplikuje v kombinaci s methotrexátem, vinblastinem, doxorubicinem a nebo gemcitabinem<sup>69,70</sup>.

Své místo našla i jako chemoterapeutikum u nádorů mozku, kde se používala pro léčbu rekurentních nádorů<sup>71</sup>, používá se u rakoviny žaludku<sup>72</sup> nebo rakoviny análního původu<sup>73</sup> a leukémie<sup>74</sup>. Uplatnění nachází také v boji proti sarkomům, rakoviny měkkých částí, kostí, svalů, solidních nádorů hlavy a krku. Díky svým vlastnostem si získala své místo v 70. letech také při léčbě rakoviny zárodečných buněk<sup>58,75</sup>.

Mechanismus působení *cis*-platiny je velmi dobře prozkoumán<sup>76-78</sup> a znázorněn na obrázku 2. V posledních letech je pozornost vědců zaměřena na objasnění mechanismu vzniku rezistence nádorových buněk k *cis*-platině a její inhibici. Je známo několik membránových transportérů platinových sloučenin, které jsou analogické s MDR1 (z ang. multidrug resistance protein 1), též zvaného jako p-glykoproteinu. Zahrnují se sem i efluxní ATPázy např. MRP (z ang. multidrug resistance-associated protein 1) a transportéry rozpuštěných látek, jako jsou CTRL1 (z ang. copper transporter 1), SLCs (z ang. solute carrier), AQP2 (z ang. aquaporine 2) a další<sup>79,80</sup>. Je prokázáno, že k rozvoji rezistence na *cis*-platinu přispívá degradace CTRL1

transportéru v lidských buňkách<sup>81</sup>. Naopak buňky se zvýšenou expresí CTRL1 vykazují zvýšenou akumulaci *cis*-platiny a zvýšenou citlivost k léčivu. Do mechanismu rezistence tumorů na *cis*-platinu zasahuje i transmembránový protein TMEM205 (z ang. transmembrane protein). U buněk na *cis*-platinu rezistentních bylo prokázáno, že jeho zvýšené množství inhibuje vstup *cis*-platiny do intracelulárního prostoru buňky. Z tohoto důvodu je TMEM205 identifikován jako biomarker v chemoterapii *cis*-platinou<sup>78</sup>.



Obrázek 2 - Znárodnění mechanismu účinku *cis*-platiny. Převzato a upraveno<sup>78</sup>.

Dalším problémem v léčbě pacientů *cis*-platinou je její toxicita vlivem reaktivních druhů kyslíku (ROS, z ang. reactive oxygen species), a to zejména vůči buňkám srdce, jater a ledvinám. Je ale prokázáno, že tvorba oxidačního stresu je pro *cis*-platinu jedním z mechanismů působení. Buňky mají za normálních podmínek vyvinutou kontrolu pro redukci vznikajících hydroxylových radikálů, na které se významně podílí redukovaný glutathion (GSH), superoxiddismutáza a kataláza. Za podmínek oxidačního stresu antioxidanty nestačí, nadměrné množství ROS poškozuje buněčné struktury (proteiny, lipidy, DNA), které vedou

k lézím přispívajícím karcinogenezi. Primárním cílem oxidačního stresu po *cis*-platině je mitochondriom. Dochází ke ztrátě mitochondriální sulfhydrylové skupiny proteinů, kdy dochází k inhibici absorpce vápníku, která se v důsledku projeví poklesem potenciálu mitochondriální membrány<sup>82</sup>. Tato role ROS ve vnitřní aktivační dráze apoptózy má za následek snadnější uvolnění cytochromu c a aktivaci stabilizujících bílkovin Bcl-2 a Bcl-XL stejně jako inhibici destabilizujících proteinů<sup>83</sup>. Po *cis*-platině mohou být do účinků ROS zahrnuty i procesy vedoucí k aktivaci dráhy vnější indukce apoptózy. Aktivace je zprostředkována po vazbě FAS ligandu (z ang. first apoptosis signal) a generaci ROS. Zapojením FAS dochází ke vzniku FAS-asociovaného proteinu s kaspázou 8 a aktivaci vnější apoptické kaskády<sup>84</sup>.

Toxicita *cis*-platiny, zejména pak nefrotoxicita, souvisí s poklesem intracelulární koncentrace GSH a proteinů vázaných na SH-skupiny. GSH musí být v buňce udržován v redukovaném stavu, tomu napomáhá nikotinamidadenindinukleotid (NADH), který ale s léčbou pomocí *cis*-platiny klesá. Vyčerpání GSH a NADH vede k inhibici některých dehydrogenáz, odpojení oxidativní fosforylace, tvorbě hydroxylových radikálů a oxidačnímu stresu. Nastává autolytický proces, který vážně poškozuje buněčnou membránu<sup>85</sup>. Příliš vysoké koncentrace ROS mohou vést v konečném důsledku k nekróze či autofágii<sup>86</sup>.

## 1.6. Přechodné kovy v léčbě nádorového onemocnění

Kvůli vzniku stále častějších nežádoucích účinků po léčbě *cis*-platinou a vzniku chemorezistence je velký prostor zkoumání věnován cytotoxického účinku sloučenin s jiným přechodným kovem než je platina. Jednou ze zkoumaných skupin jsou lomené metaloceny, které by mohly být vhodnou alternativou k *cis*-platině. Metaloceny jsou komplexy obsahující přechodný kov a dva cyklopentadienylové (cp) ligandy koordinované v sendvičové struktuře<sup>87</sup>. V dnešní době je známo, že cp kruh je aktivní fragment, který v biologických tekutinách vykazuje *in vitro* i *in vivo* protinádorové a antiproliferační schopnosti, navíc se ukázalo, že u buněk způsobuje také oxidační poškození<sup>88</sup>.

První významná sloučenina, která prošla slibným preklinickým hodnocením, byla sloučenina titanu, budotitan (komplex [*cis*-diethoxybis-(1-fenylbutan-1,3-dionato)titanicitý]). Bohužel se ale už nedostal do klinického testování<sup>89</sup>. Oproti tomu titanocendichlorid (Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub>) sice vykazoval střední antiproliferační aktivitu *in vitro*, ale velmi slibné výsledky *in vivo*<sup>90,91</sup>.

Klinické testování bylo zastaveno až ve II. fázi u pacientů s metastazujícím karcinomem ledvinných buněk<sup>92</sup>, nebo metastazující rakovinou prsu, kde odezva na léčbu byla velmi nízká<sup>93</sup>.

Titanocenové deriváty patří obecně k nejprozkoumanějším. Jsou u nich popsány substituce aminokyselinami<sup>94,95</sup>, byly syntetizovány a *in vitro* testovány benzyl-substituované<sup>96,97</sup> či *ansa*-titanocenové deriváty<sup>90</sup>. Připraveny byly také sloučeniny s modifikací na cp kruhu např. s alkylamoniovými substituenty<sup>98,99</sup>. Hydrolithiace 6-anisyl fulvenu a následné reakce s  $\text{TiCl}_4$  vedla k syntéze komplexu bis-[(*p*-methoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorotitaničitého (Titanocen Y, Schéma 1) s hodnotou poloviční inhibiční koncentrace ( $\text{IC}_{50}$ ) 21  $\mu\text{M}$  na buňkách renálního karcinomu<sup>100</sup>.

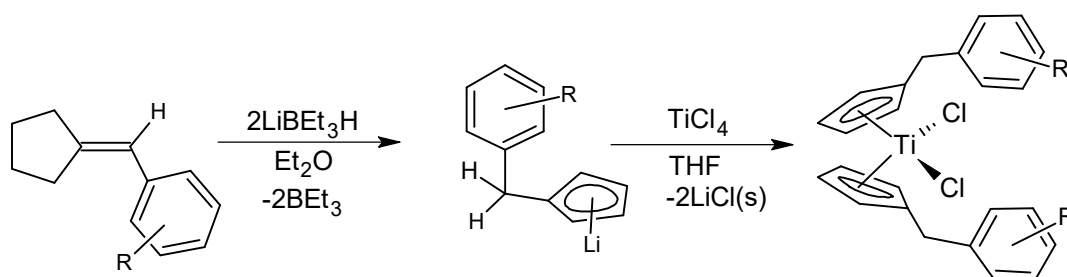
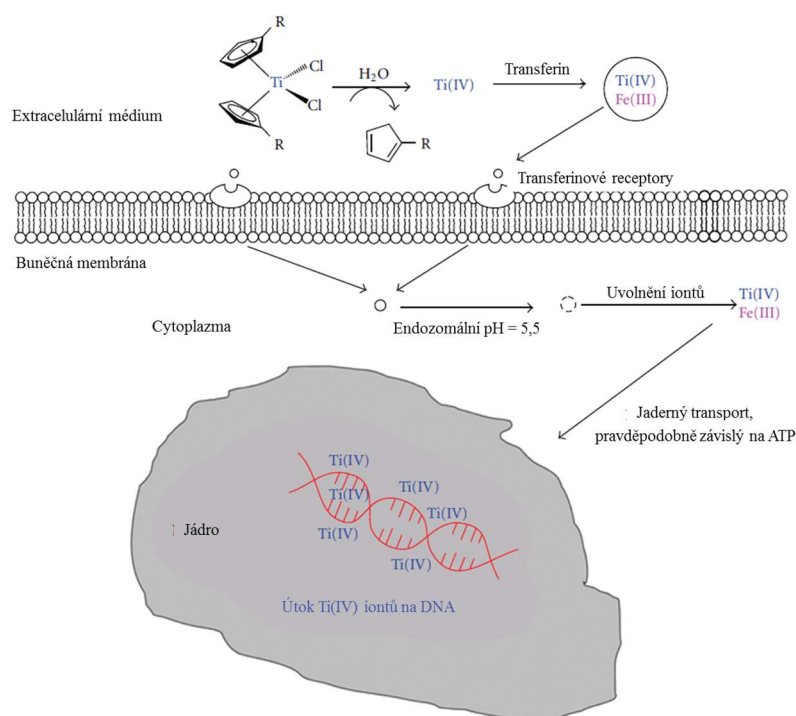


Schéma 1 - Syntéza Titanocenu Y. Převzato a upraveno<sup>100</sup>.

Cytotoxicita titanocenových komplexů je v korelaci s jejich strukturou. Naznačen je i mechanismus cytotoxického působení. Dle studií je prvním krokem v mechanismu účinku vstup do buňky zprostředkovaný přes transportní bílkovinu transferin<sup>101</sup>. V další fázi dochází k vazbě iontů titanu k DNA anebo k interakci s proteiny nebo enzymy (Obrázek 3), po kterých následuje buněčná smrt<sup>102,103</sup>.



Obrázek 3 - Účinek titanocenových derivátů na buňku. Převzato a upraveno<sup>104</sup>.

Společně s deriváty titanu byly za účelem zkoumání cytostatického účinku syntetizovány obdobné komplexy obsahující jiné kovové centrum.

Ve fázi preklinických testů byly deriváty zirkonu. Významné cytotoxické účinky na nádorové buňky byly nalezeny pouze u zirkonocenového derivátu s alkylamoniovým ligandem a komplexu Zirkonocenu Y<sup>105,106</sup>. Úplně nejvyššího antikarcinogenního účinku bylo dosaženo u derivátu *ansa*-zirkonocenového komplexu na linii buněk ovariálního karcinomu<sup>107</sup>.

Dále byly zkoumány i Cu(II) komplexy působící jako mimetika superoxiddismutázy, díky čemuž docházelo ke snížení oxidačního stresu<sup>108</sup>. Nicméně ve spojení s thiokarbamáty se zjistilo, že jejich účinek vede spíše k tvorbě proteazomů a apoptóze, případně u komplexů Cu(II) s kyselinou benzoovou nebo oxalovou byl i prokázán antiproliferativní efekt<sup>109</sup>.

Na počátku 80. let 20. stol. se ukázalo, že cytotoxické vlastnosti vykazují i antirevmatická činidla se zlatem jako centrálním kovem, jako je např. auranofin<sup>110</sup>. Od té doby byly studie rozšířeny o fosfinové, karbenové a dithiokarbamátové ligandové systémy<sup>111</sup>. I přes slibné cytotoxické výsledky komplexů zlata představují komplexy na bázi ruthenia úspěšnější třídu protinádorových látek<sup>112,113</sup>.

Vhodnými komplexy s cytotoxickou aktivou se ukázaly být komplexy Ru(II) a Ru(III). Do klinických studií se dostaly tři komplexy NAMI-A, KP1019 a KP1339<sup>113</sup>. Mechanismus působení těchto komplexů je připisován jejich vazbě na transferin, kde jim je přes transferinové receptory umožněn vstup do buněk<sup>114</sup>. Další studie popisuje jako vhodnou transportní bílkovinu pro rutheniové komplexy albumin<sup>115</sup>. V buňkách je popsán také mechanismus účinku Ru(II) komplexů obsahující jako ligandy areny a chloridy, kdy dochází k vazbě na histony a zábráně růstu nádoru<sup>116</sup>.

Velký úspěch znamenalo propojení cytotoxicky aktivního metabolitu tamoxifenu s ferrocenem<sup>117,118</sup>. Po ošetření buněk rakoviny prostaty se ukázaly být velmi účinné komplexy ferrocenu konjugované se steroidy nebo nesteroidními androgeny<sup>119</sup>. Mechanismus účinku bude pravděpodobně zaměřen opět na produkci ROS nebo se bude spoléhat na elektrofilní vlastnosti ferrocenu<sup>120</sup>.

### 1.6.1. Biologické účinky molybdenu

Molybden je pro lidské tělo esenciálním prvkem patřícím do VI skupiny přechodných prvků s elektronovou konfigurací  $[\text{Kr}]4d^55s^1$ . Nejčastěji se vyskytuje v oxidačním stavu II a VI, nicméně v organismu není zanedbatelný ani oxidační stav IV a V<sup>121</sup>. V těle je uložen v kostech, žlázách, játrech a ledvinách<sup>122</sup>. Nejnovější *in vitro* studie ukazuje, že by se také mohlo jednat o biorozložitelný materiál s postupnou ztrátou hmoty s konstantní degradací<sup>123</sup>. Molybden se fyziologicky v těle podílí na tvorbě aktivního místa metaloproteinů, jako je např. aldehydoxidáza nebo sulfidoxidáza, účastní se purinového katabolizmu, stimulace proteosyntézy a růstu těla. V těchto enzymatických reakcích přechází molybden mezi oxidačními stavy IV a VI<sup>122,124</sup>.

Do lékařských aplikací molybdenu spadá léčba anémií, posílení imunitních reakcí, uplatnění nachází v léčbě diabetu. Molybden disponuje také antibakteriální toxicitou, kdy bylo nově zjištěno, že i proti rezistentním bakteriím se zachováním biokompatibility podávaných přípravků. Pozornost je rovněž zaměřena i na protinádorovou léčbu<sup>122,125</sup>. Postupně byly vyzkoušeny halogenidy, oxidy, karbonyly a hybridy anorganicko-organických molybdenů<sup>126,127</sup>. Významnou skupinu pak tvoří koordinované sloučeniny molybdenocenu, jež svými mechanismy dokáží produkovat vysoké množství ROS. Ty jsou schopny porušit

rovnováhu systému vedoucí k poškození DNA, k tvorbě zesíťování proteinů, k peroxidaci lipidů a iniciaci signálních cest v buňce vedoucích k buněčné smrti<sup>128</sup>.

### 1.6.2. Cytotoxické účinky molybdenových komplexů

Po objevu antitumorové aktivity molybdenocendichloridu manžely Köpfovými se objevilo mnoho prací zkoumajících mechanismus působení na buněčné linie dané do souvislosti s hydrolyzou komplexu<sup>129,130</sup>. Oproti ostatním metalocenům vykazuje tento metalocenový fragment ve fyziologickém prostředí velkou stabilitu<sup>131</sup>.

V posledních dvou desetiletích bylo popsáno několik modifikovaných derivátů molybdenocenu. Tyto modifikace vykazují zlepšené vlastnosti významné pro biologické aplikace, nicméně přesný efekt mechanismu účinku není znám<sup>132</sup>. Výchozí sloučenina byla obohacena např. karboxylátovými skupinami<sup>132,133</sup>, byly připraveny benzyl-substituované molybdenoceny, které vykazovaly hodnoty  $IC_{50}$  podstatně vyšší, než byly naměřeny u titanocenových analogů. Začleněním jednoho či více halogenidových substituentů k těmto molybdocenovým komplexům dochází ale ke zlepšení hodnoty  $IC_{50}$ <sup>134</sup>. U alkyldihydraxonových derivátů komplexů Mo(IV) bylo prokázáno, že cytotoxicita je přímo úměrná dávce kovového komplexů. Na mechanismu působení se značně podílí chelatace s částečným kladným nábojem na kovovém iontu sdíleném s atomem donoru ligandu, kde dochází k delokalizaci chelátových prstenců  $\pi$ -elektronem, čímž se snižuje polarita kovového iontu. To může zvýšit lipofilitu kovového centra, která komplexům umožní účinně proniknout přes lipidovou vrstvu buněčné membrány a narušit dýchací proces v buňce<sup>135</sup>. U dioxomolybdenových komplexů s ONO-donorovými aroyldihydraxonovými ligandy byla prokázána slabá vazba k ct-DNA a *in vitro* cytotoxická aktivita proti buněčným liniím colorektálního karcinomu a buňkám cervikálního karcinomu<sup>136</sup>.

Objevují se také komplexy obsahující heterobimetalický systém, kde se předpokládá synergický cytotoxický účinek obou kovů. Jedny z nejvíce prozkoumávaných komplexů jsou sloučniny Au, Ru, Ag, Pt<sup>137-139</sup>, ale objevují se právě také i nové komplexy obsahující jako jeden z centrálních kovů molybden<sup>140,141</sup>.

Trendem dnešní doby je syntéza nanočástic s molybdenem, jako jsou např. křemíkové nanočástice s molybdenovými klastry  $Mo_6I_8^{4+}$ , u kterých dochází k tvorbě singletového kyslíku

a k cytotoxickému působení po fotosenzitivizaci na buňkách rakoviny hrtanu<sup>142</sup>. Další studie odhalily cytotoxicitu částic oxidu molybdenového proti buňkám rakoviny kůže. Bylo zjištěno, že nanočástice indukují mitochondriomem zprostředkovanou apoptózu řízenou apoptotickými geny, jako jsou BAX (z ang. B-cell lymphoma -2-associated X protein) a Bcl2. Molybden, který je kofaktorem většiny metabolických enzymů, mohl také vyvolávat selektivní internalizaci nanočástic, což by mohlo následně změnit granularitu cytoplazmy a následně vést opět k mitochondrialně zprostředkované apoptóze<sup>143</sup>. Další autoři potvzují cytotoxický účinek těchto částic až při vyšších koncentracích za produkce ROS a snížení antioxidantní aktivity antioxidantních enzymů<sup>144</sup>. U nanočástic obsahujících molybden ve formě MoS<sub>2</sub> byla pozorována zvýšená aktivita superoxiddismutázy a produktů peroxidace lipidů, zatímco aktivita katalázy a glutathiontransferázy společně s množstvím GSH byly sníženy. Množství ROS koreluje s velikostí, tvarem, povrchem a chemií částic se zapojením do buněčné smrti, proliferace a diferenciaci<sup>145</sup>.

### 1.6.3. Biologické účinky vanadu

Vanad je přírodní prvek 5. skupiny s elektronovou konfigurací [Ar]3d<sup>3</sup>4s<sup>2</sup> s výskytem ve dvou přírodních izotopech <sup>51</sup>V, <sup>50</sup>V.<sup>145</sup> Typické pro něj jsou oxidační stavy II až V, výjimečně I a -I. Vanad (V) má nestálé stereochemické vlastnosti a může tvořit koordinační komplexy v rozsahu geometrie od oktaedrální po trigonální bipyramidy či pentagonální pyramidy. Komplexy mohou vykazovat různou termodynamickou stabilitu a kinetickou inertnost<sup>146-148</sup>. Kovové ionty regulují celou řadu esenciálních buněčných procesů s vysokou specifičností a selektivitou. Vanad v anorganické podobě působí chemoprotektivním účinkem proti chemicky indukované tumorigenezi tím, že potlačuje tvorbu reaktivních metabolitů odvozených od karcinogenu, detoxikuje a eliminuje reaktivní meziprodukty specifickou indukcí antioxidantních a xenobiotických metabolizujících enzymů. Výhodou vanadu je chemická podobnost s fosfátem, schopnost vytvářet polyoxovanadáty a komplexy s molekulami biologického významu jako ATP, ribóza, GSH<sup>149</sup>.

Vanad vykazuje farmakologický potenciál spojený s léčbou diabetu mellitu při perorálním podání metavanadátu sodného, orthovanadátu sodného a vanadylsulfátu. Je zjištěno, že má inhibiční účinky na glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu, lipoproteinovou lipázu, tyrozinofosfatázu, glukóza-1-fosfátdehydrogenázu, glykogensyntetázu, adenylátcyklázu,

cytochromoxidázu. Naopak stimuluje funkci Na/K–ATPázy, H/K–ATPázy, myozinAPTázy, adenylátkinázu, fosfofruktokinázu a cholinesterázu. Těmito účinky nachází uplatnění jako antihyperlipidemikum, antiobezitikum, antihypertenzikum, disponuje diuretickým efektem a zvyšuje afinitu kyslíku ve tkáních<sup>150,151</sup>.

Výsledky ukazují, že vanad pozitivně ovlivňuje metabolismus buněk, glukózovou nesnášenlivost a jaterní glykogensyntetázu. Po ošetření vanadovými komplexy byl prokázán vliv na obnovení normálních hladin mRNA klíčových metabolických jaterních enzymů glykolýzy, jako je fosfoenolpyruvátcarboxykináza, glukokináza a L-pyruvátkináza<sup>152</sup>. Při ovlivnění diabetických myší komplexy obsahující V(IV) a V(V) byla pozorována up-regulace glutathionperoxidázy a katalázy. Výsledkem je podpora potlačení glykolýzy v játrech a glykogenogeneze. Mezi další enzymy, které byly vanadovou sloučeninou, konkrétně vanadátem sodným, ovlivněny, je plicní 6-fosfoglukonátdehydrogenáza, pyruvátkináza a glutathionperoxidáza. Vyšší dávky zvýšily i laktátdehydrogenázu (LDH) a glutathionreduktázu<sup>153</sup>. Zvýšení aktivity LDH má za následek inhibici Warburgova efektu, jehož princip je založen na odlišné utilizaci glukózy. Warburgův efekt spočívá u nádorových buněk ve zvýšení meziproductů glykolýzy a pyruvátu. Tato dráha je odkloněna od citrátového cyklu a vznikající pyruvát je udržován mimo oxidační metabolismus a z valné většiny přeměněn na laktát<sup>154</sup>. Vlivem mitochondriální poruchy metabolismu u nádorových buněk je nastavena preference anaerobní glykolýzy i za aerobních podmínek<sup>149</sup>.

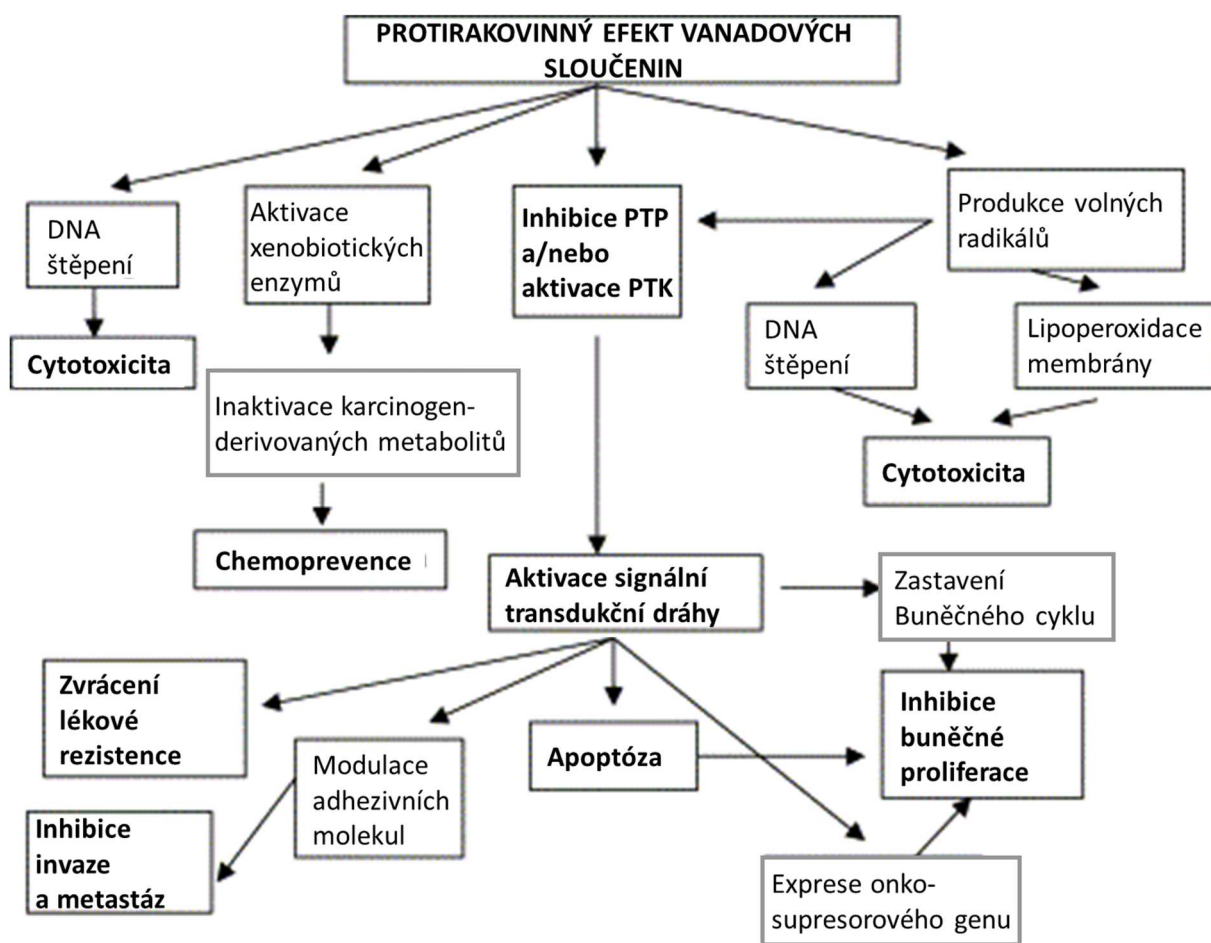
Další potvrzenou charakteristikou účinku vanadu je jeho vliv na kmenové buňky. Ve studiích byl ohlášen oxid N,N-bis(salicyliden)-o-fenylendiamin vanadičitý komplex, který zvyšuje schopnost diferenciací osteoblastů prostřednictvím aktivace signální dráhy ERK (z ang. extracellular signal–regulated kinases). Kromě toho tato aktivace souvisí se zvýšením transkripční aktivity NF- $\kappa$ B (z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)<sup>155</sup>. Stejný účinek byl pozorován i u bis(peroxo)vanadičnanu, inhibitoru fosfotyrozinfosfatázy, po kterém dochází k indukci myogenních buněk<sup>156</sup>.

#### 1.6.4. Cytotoxické účinky vanadu

Buněčná odpověď na použití vanadových komplexů je oproti např. molybdenovým komplexům více popsána a mechanismus jejich působení na buněčné linie je do jisté míry

částečně odhalen. Na základě rozsáhlého výzkumu se vanad jeví jako slibný prvek, který inhibuje karcinogenezi díky pleiotropním účinkům. Vanad má velký význam nejen při prevenci vzniku nádorového bujení, ale také při jeho samotné léčbě. Brání proliferaci nádorových buněk, indukuje apoptózu a omezuje invazi a metastatický potenciál neoplastických buněk. Na buněčných liniích endocervikálního adenokarcinomu spojeného s papilomavirem, na buňkách lidského hepatocelulárního karcinomu a epiteliárních buňkách lidského hepatocelulárního karcinomu bylo prokázáno, že mechanismus oxidovanadových sloučenin zasahuje do buněčného cyklu a blokuje jej v G0/S fázi, čímž dochází k depolarizaci mitochondriální membrány a následné apoptóze<sup>157</sup>. Shrnutí dosavadně zjištěných účinků vanadu je na obrázku 4.

I přes rozsáhlé účinky vanadu v maligních buňkách je jeho primárním cílem aktivace apoptické dráhy. Zkoumány byly vanadylové komplexy, u kterých bylo prokázáno zvýšení hladiny ROS doprovázené snížením množství poměru redukovaného glutathionu k jeho oxidované formě, podílející se na poškozování sarkomových buněk. Výsledkem je pak zástava buněčného cyklu a aktivace kaspázy 3 následovaná apoptózou<sup>158</sup>. Rovněž se ukázalo, že vanad má vliv na expresi proteinů regulujících apoptický proces, jako je Bcl-2 a BAX. Navíc u ortovanadátu byla zjištěna up-regulace fosforylované formy proteinu RET/PTC1 (z ang. proto-oncogene encodes a receptor tyrosine kinase associated with papillary thyroid carcinoma) a PI3K (z ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) signální dráhy. V souvislosti s popsányi změnami došlo k fragmentaci DNA a ztrátě potenciálu mitochondriální membrány<sup>159</sup>. Při zkoumání VOSO<sub>4</sub> na nádorových buňkách transformovaných keratinocytů z dospělé lidské kůže byla zastavena proliferace buněk zapříčiněná down-regulací cyklinu D1 a E, E2F a inhibitorů kináz závislých na cyklinech p21 a p27 společně s indukcí apoptózy, to vše v závislosti na použité koncentraci. K dalším účinkům patří opět spuštění apoptózy spojené s up-regulací onkoproteinu a změnou poměru antiapoptických k proapoptickým členům rodiny proteinů Bcl-2<sup>160</sup>.



Obrázek 4 - Účinky vanadových sloučenin na buněčné linie. Převzato a upraveno<sup>161</sup>.

Sloučeniny vanadu také snižují expresi proteinových tyrozinofosfatáz, což jsou geny určené pro opravu DNA genů spojených s mikrotubuly. Navíc dochází i ke zvýšení exprese proapoptických mediátorů, jako je BAK (z ang. B-cell lymphoma antagonist/killer 1), AIFM (z ang. apoptosis inducing factor mitochondria associated 1)<sup>162</sup>. Další studie popisuje *in vitro* indukci zástavy buněčného cyklu v G2/M-fázi, snížení mitochondriálního membránového potenciálu buněk lidského hepatocelulárního karcinomu, a tím navození apoptózy<sup>163</sup>. Častým cílem vanadových sloučenin jsou genové sekvence. Ve studii zaměřené na buňky adenokarcinomu plic A549 a buňky prsního karcinomu epiteliálních buněk MCF-7 výsledky ukazují, že vanad významně snižuje životaschopnost rakovinných buněk snížením exprese H-RAS (z ang. harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) a MMP2 (z ang. matrix metalloproteinase) vedoucí opět ke zvýšené indukci apoptózy zprostředkované díky ROS<sup>164</sup>. V souvislosti s tímto zjištěním může vanad regulovat signalizační dráhu STAT. Data ukazují, že aktivace této dráhy vanadem vede ke snížení receptoru Mpl (z ang. myeloproliferative

leukemia protein) a stavu srovnatelnému s esenciální trombocytémií. Pokles MMP2 zapříčiňuje zpětnovazebný mechanismus následovaný aktivací STAT.

Společně s indukcí apoptózy by vanad mohl *in vitro* i *in vivo* současně inhibovat autofágii v lidských buňkách hepatocelulárního karcinomu. Data ukazují, že efekt inhibice autofagie nahrává proapoptickému působení. Po přidavku ortovanadátu sodného k autofaginnímu inhibitoru 3-methylendiaminu byl zjištěn pokles autofaginního procesu a v buňkách byla indukována apoptóza<sup>164</sup>. Autofaginní inhibitor 3-methyladenin významně inhiboval zvýšení hemoxygenázy, mající roli v ochraně buněk ve stresových situacích, a zvýšil po ošetření vanadovými částicemi rychlost buněčné smrti v buňkách<sup>165</sup>.

Bylo prokázáno, že vanad má vliv na epitelomezenchiální tranzici neboli proces, při kterém epiteliární buňky ztrácejí polarizovaný potenciál a adhezivitu buňky k buňce, podstupují změny ve tvaru buněk a v organizaci jejich cytoskeletu, získávají mezenchymální vlastnosti, jako je zvýšená migrace a invaze. Na kolonii buněk osteosarkomu bylo zjištěno, že vanad inhibuje migraci a adhezi společně se zábranou tvorby kolonií. Výrazně inhibuje klíčovou diseminaci nádorových buněk, jejich adhezi, migraci a klonogenecitu<sup>166</sup>.

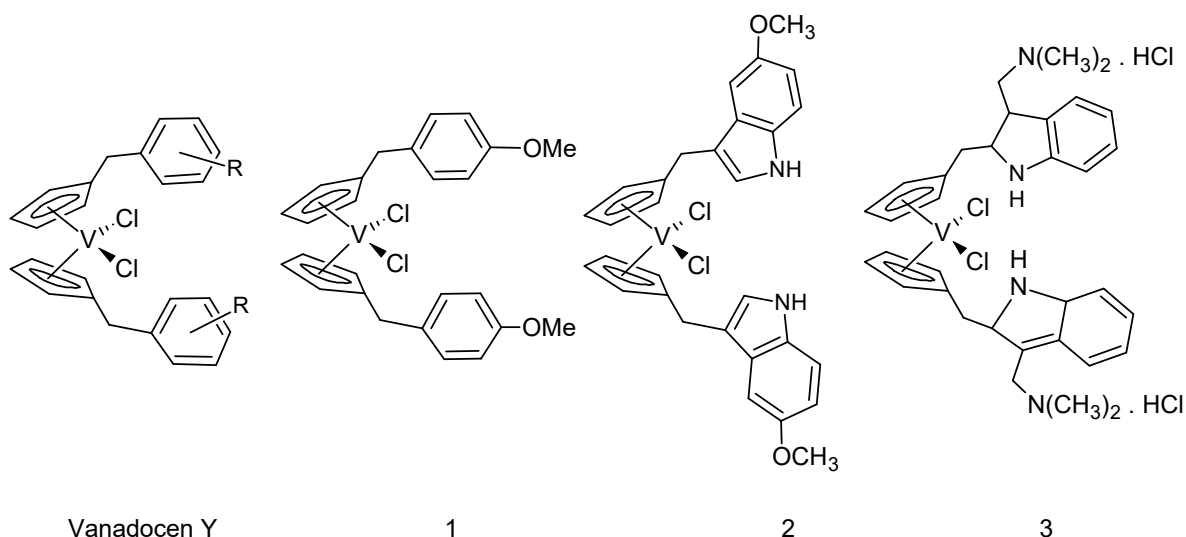
K doladění molekulárních mechanismů buňky se často stanovují mikroRNA (miRNA) neboli malé nekódující úseky RNA, které regulují a mění expresi genů po transkripci. Z 80 % jsou miRNA zaměřeny na proteiny kódující RNA, a proto jsou považovány za jedny z hlavních regulátorů vícečetných buněčných cest. Deregulace miRNA se tedy může uplatnit v zástavě šíření nádorového onemocnění. Ukázalo se, že (bis)peroxovanadičnan společně se sulfonylhydrazonem-1 v různých koncentracích pozitivně ovlivňuje kardiomyogenní expresi miRNA a diferenciaci kardiomyocytů v myších, u kterých pak dochází k indukci apoptózy přes aktivaci kaspázy 3<sup>167</sup>.

### **1.6.5. Cytotoxicita vanadocenových komplexů**

Použití kovových iontů vanadu jako prevence a léčba rakoviny je zdokumentováno případy datovanými až do 16. stol. Dříve byl protinádorový účinek založen zejména na primárně anorganických formách tohoto prvku, ale za poslední desetiletí bylo syntetizováno a zkoumáno jako potenciální terapeutické činidlo při léčbě různých druhů malignit velké množství komplexních sloučenin vanadu v oxidačním stavu (IV) a (V)<sup>168</sup>.

Počátek testování vanadocenových komplexů byl položen v roce 1979, kdy byl podrobně testován bis(cyklopentadienyl)dichlorovanadičitý komplex, vanadocendichlorid, ( $\text{Cp}_2\text{VCl}_2$ ), nejjednodušší derivát vanadocenu s cytotoxickou aktivitou vyšší při přímém srovnání s  $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2$ <sup>169</sup>. Po vzoru Titanocenu Y byl z vanadocendichloridu syntetizován Vanadocen Y, komplex bis-[(p-methoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý (Schéma 2)<sup>170</sup>. Jeho cytotoxický účinek je s hodnotou  $\text{IC}_{50}$  (hodnota poloviční inhibiční koncentrace) 3,0  $\mu\text{M}$  na buňkách renálního karcinomu totožný jako u Titanocenu Y. Kromě toho cytotoxicky účinný byl i methyl- a methoxy- substituovaný vanadocendichlorid na leukemické linii buněk akutní T-lymfoblastické leukémie MOLT-4<sup>171</sup>. Bylo zjištěno, že zavedením fluoroskupiny do komplexu dochází ke snížení hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Vanadoceny s fluoridovými deriváty vykazují velmi dobré výsledky, konkrétně pak bis[(4-trifluormethoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý komplex s hodnotou  $\text{IC}_{50}$  2,2  $\mu\text{M}$  na lidských ledvinných buňkách<sup>134</sup>.

Dále byly zkoumány benzylsubstituované komplexy, jako je bis-[(p-methoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý (Schéma 2, sloučenina 1), bis-[(3,4-dimethoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý a bis-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)cyklopentadienyl]dichlorovanadičitý. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  u komplexu 1 je  $\text{IC}_{50}$  3  $\mu\text{M}$ . Zavedením dalších methoxyskupin se cytotoxický účinek snižuje, pro druhý komplex byla naměřena  $\text{IC}_{50}$  9,1  $\mu\text{M}$  a u třetího je  $\text{IC}_{50}$  rovna 8,3  $\mu\text{M}$ <sup>170</sup>. Další použité vanadocenové sloučeniny byly deriváty s indolem. V literatuře je také popsána syntéza a cytotoxická aktivita indolfunvenylových sloučenin vanadocenu, z nichž nejúčinnější komplexy s hodnotou  $\text{IC}_{50}$  2,5 a 2,3  $\mu\text{M}$  jsou komplex bis-[(1-methyl-5-methoxyindol-3-yl)methylcyklopentadienyl]dichlorovanadičitý (Schéma 2, sloučenina 2) a jeho derivát bis-[(1-methyl-3-dimethylaminomethylindol-2-yl)methylcyklopentadienyl]dichlorovanadičitý komplex (Schéma 2, sloučenina 3)<sup>171,172</sup>. Indolové sloučeniny navíc vykazují slibnou antibakteriální a protiplísňovou aktivitu<sup>173</sup>.



*Schéma 2 - Vanadocenové komplexy.*

Sloučeniny vanadu s organickými ligandy, v oxidačním stavu vanadu III až V, mají cytotoxickou aktivitu doprovázenou inhibicí růstu buněk. První studie na antiproliferativní aktivitu byly uskutečněny pro vanadylové komplexy s  $[\text{VO}([\text{O}(\text{CH}_2\text{COO})_2]^{2-})(\text{H}_2\text{O})_2]$  obsahující *O,O,O*- donorový ligand<sup>174</sup>. Štěpením DNA využitím agarové elektroforézy se ukázalo, že nejsilnější protinádorovou aktivitu na buňkách lidských osteosarkomů má komplex s fenantrolinem (phen, z ang. phenanthroline), jako interkalátorem heterocyklických skupin k DNA. Interkalace může zvyšovat reaktivitu deformací dvoušroubovice DNA, čímž je náchylnější k útoku cytotoxického agens. Ukazuje se, že přítomnost interkalačního ligandu je rozhodující pro biologický účinek. Existuje vztah mezi generací ROS, interkalací do intercelulární DNA a antiproliferačním účinkem komplexů. Navíc se potvrzuje, že roli bude hrát rigidita a pružnost komplexů. Interkalační vlastnosti k DNA u fenantrolinu jsou efektivnější než u bipyridinu (bpy, z ang. bipyridine)<sup>175,176</sup>. Fenantrolinové komplexy se jeví jako slibná cytofarmaka díky své vysoké cytotoxicitě, rozpustnosti ve vodě a stabilitě v kultivačním médiu<sup>177</sup>. Jejich cytotoxické vlastnosti jsou snadno ovlivnitelné pomocí substituce na fenantrolinového skeletu<sup>104</sup>.

Jako dobrá myšlenka při vývoji nových metaloléciv se ukázalo použití peroxovanadičných sloučenin v binární i ternární kombinaci s vhodnými substráty. K tomuto účelu bylo navrženo a syntetizováno několik peroxovanadičných sloučenin jako potenciální protirakovinné látky. Peroxovanadičné komplexy jsou již dlouho známy pro svou protinádorovou aktivitu proti myši leukemii. Jako cytotoxické látky, u kterých se předpokládala

inhibice fosfotyrozinfosfatázy, byly identifikovány sloučeniny  $K[VO(O_2)_2(bpy)] \cdot 5H_2O$ ,  $K_2[VO(O_2)_2(\text{pyridin-2-karboxylato})] \cdot 2H_2O$  a  $K_2[VO(O_2)_2(3-OH \text{ pyridin-2-karboxylato})] \cdot 3H_2O$  s velmi dobrou účinností<sup>178</sup>.

Tvorba peroxovanadičných a vanadylových komplexů obsahujících karboxylové kyseliny vedla k přípravě sloučenin  $K_3[VO(O_2)(C_2O_4)_2] \cdot 1/2H_2O$  a  $K_3[VO(C_2O_4)_2] \cdot 3H_2O$ . Oba komplexy mají vliv na životaschopnost a mitochondriální metabolismus buněk lidského osteosarkomu. Ve skutečnosti, při koncentraci 100  $\mu M$ , zredukoval peroxo- komplex viabilitu buněk o cca 80 %. Výsledky tímto ukazují význam ligandu v koordinační sféře kovového iontu pro nárůst protinádorové aktivity<sup>179,180</sup>.

Jako ligandy u peroxovanadičného komplexu byly použity opět phen a bpy, konkrétně např. sloučenina (tetra(n-propyl)amonium)[VO(O<sub>2</sub>)(oxalato(2-))(phen)](Vphen), jejíž reaktivita byla testována na DNA. Absorpční hyperchromace a bathochromní posun v DNA spektru naznačují, že existuje silná interakce mezi DNA a komplexy. Zdá se, že komplex podporuje poškození DNA, vyjádřené jako praskliny v DNA. Tímto způsobem je upravena sekundární struktura DNA a dochází k trhání řetězců. Za tento efekt může pravděpodobně částečné začlenění phen do dvoušroubovice DNA. Kometový test ukazuje, že komplex účinně indukuje přerušování DNA řetězce lidských lymfocytů v závislosti na použité koncentraci. Hlubší screening jeho potenciální protinádorové aktivity k buněčné linii myši leukemie ukázal, že také vykazuje antiproliferační aktivitu závislou na koncentraci a času expozice. Léčba rakovinných buněčných linií s V(V) a peroxovanadičnanem výrazně zvýšila v *in vitro* experimentech proteintyrozínovou fosforylaci kombinovanou s pravděpodobnou selektivní inhibicí proteinové tyrosinfosfatázy a fosfotyrosinfosfatázy<sup>181</sup>.

Celosvětový zájem o vývoj nových metalofarmak neunikl ani ligandům z rodiny betainů (*N,N,N*-trimethylglycin). Betain je využit jako methyltransferové činidlo při syntéze aminokyselin. Vanad se v těchto komplexech vyskytuje ve zcela oxidované formě V(V) a žlutě zbarvené krystaly ukazují na přítomnost jednoho nebo více peroxidového ligandu. Biologická studie na humálních buňkách MCF-7 a A549 poukázala na to, že dochází k výraznému ovlivnění životaschopnosti buněk za současné aktivace apoptického procesu, produkci ROS, aktivaci signální dráhy RAS a zvýšené exprese MMP-2<sup>182</sup>.

Další zkoumanou rodinou komplexů vanadu jsou polyoxovanadáty, negativně nabitě agregáty přechodných kovů s kyslíkem. Protonizace oktaksooodekavanadátových aniontů dovoluje interakci pomocí vodíkových můstků s biologickými molekulami, např. bílkoviny.

Tato interakce může způsobovat vytvoření „klece“ bránící rozkladu komplexu<sup>183</sup>. Jako potencionální protinádorové činidlo byl na linii buněk rakoviny jater *in vitro* hodnocen komplex  $\text{Na}_4\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ <sup>184</sup>. Komplex zároveň způsobil *in vivo* supresi nádoru jater u myší. Další významný testovaný komplex s lipofilnějším charakterem byl komplex  $(\text{H}_2\text{N},\text{N},\text{N},\text{N}$ -tetramethylendiamonium $(3\text{V}_{10}\text{O}_{28})$ , u kterého se předpokládá snadnější prostup skrz lipidovou vrstvu membrány buněk, čímž zvyšuje protinádorovou aktivitu komplexu<sup>185</sup>.

V alkylačních studiích byly zaznamenány komplexy se smíšenou valencí V(IV) / V(V) jako např. u komplexu  $(\text{Me}_4\text{N})_6[\text{V}_{15}\text{O}_{36}\text{Cl}]$ . Studie interakcí s DNA potvrdila chemoprotektivní účinek proti alkylaci diethylsulfátem i dimethylsulfátem při testování alkylace s DNA<sup>186</sup>.

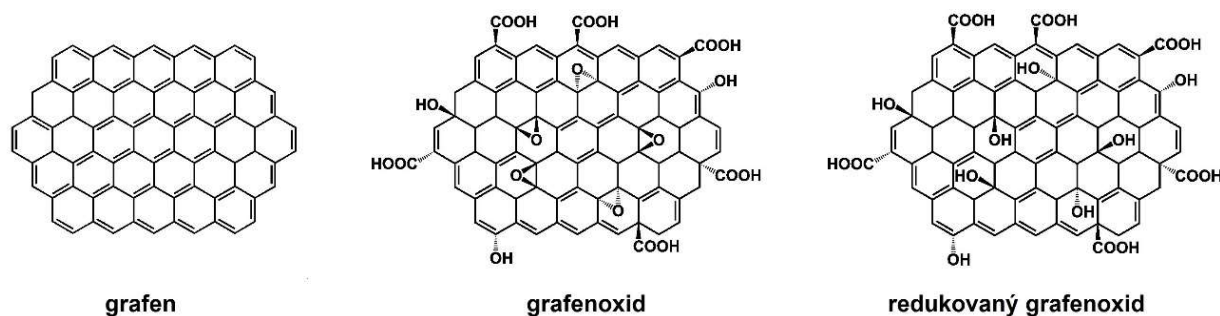
Do studií cytotoxické aktivity vanadičitých sloučenin jsou v dnešní době zahrnuty i komplexy s azobarvivy, vzájemně se lišící v substituentech na fenylovém kruhu. Testování cytotoxicity na buňkách nádoru děložního hrdla HeLa a buňkách kolorektálního karcinomu II. stupně HT-29 ukázalo, že cytotoxická aktivita je nejsilnější proti HeLa buňkám,  $\text{IC}_{50} = 1,92 \mu\text{M}$ <sup>187</sup>. Díky preferenčnímu vylučování vanadu nádorovými buňkami, variabilně konfigurovanému chemickému profilu a vznikající interakci s biomolekulárními cíli na buněčném povrchu se očekává, že tyto vlastnosti budou použity pro vývoj nových léčiv jako protinádorové látky<sup>149</sup>.

## 1.7. Využití grafenových nanostruktur jako nosiče léčiv

Organické i anorganické nanostruktury se stále častěji uplatňují v biomedicínských technologiích jako např. v biosenzorech<sup>188-189</sup>, v tkáňovém inženýrství nebo transplantační medicíně<sup>190,191</sup>. Často vykazují antibakteriální<sup>192,193</sup> nebo chemoprotektivní účinek<sup>194</sup>. O vhodnosti použití látky jako vhodného nosiče pro léčiva rozhodují zejména tři faktory. Prvním je konstrukce nosiče s optimální přenosovou kapacitou. Druhý faktor je spojen s ověřením jeho stupně toxicity a biokompatibility. Třetí aspekt spočívá v návrhu systému schopnosti uvolňovat lék kontrolovaným způsobem na určeném místě<sup>195</sup>.

Jednou ze zkoumaných látek, u které byl zjištěn potenciál možnosti využití jako nosiče pro léčiva, byly nanostruktury na bázi grafenu. Samotný grafen byl objevený teprve nedávno v roce 2004<sup>196</sup>. Optimální nosnost nosiče zajišťuje jeho konstrukce ve formě 2-rozměrného listu složeného z  $\text{sp}^2$  hybridizovaného uhlíku<sup>197</sup>. Pozornost zájmu byla postupně rozšířena i na

výrobu a hodnocení exfoliovaného ve vodě rozpustného oxidu grafenu (GO) a redukováného grafenoxidu (rGO) (Obrázek 5)<sup>198</sup>.



Obrázek 5 - Struktura grafenových nanočástic. Převzato a upraveno<sup>201</sup>.

Potvrzení stupně toxicity a biokompatibility u grafenových částic není prozatím jednoznačně vyřešeno. Literatura na jedné straně popisuje biokompatibilní účinek grafenových částic<sup>202</sup>. Na straně druhé jsou k dispozici práce prokazující toxicitu k buňkám, kde je možná příčina připisována epigenetickým změnám v buňce, zahrnujícím metylace DNA na specifických místech v regulačních oblastech genu, fosforylace, ubikvitinilace a ATP-ribozylace přispívající k remodelaci chromatinu<sup>203,204</sup>.

Z dostupné literatury vyplývá, že rozporuplnost v kompatibilním versus toxickém působení na buňky je ovlivněna chemickými a fyzikálními vlastnostmi umělých částic při styku s povrchem buněk. Roli u částic hraje tvar, povrch a jeho funkcionalizace, počet vrstev, velikost vloček, stabilita a následně pak i vlastnosti samotného substrátu<sup>205</sup>. Např. bylo zjištěno, že GO listy o velikosti submikronu vyvolaly vyšší toxicitu než agregované listy<sup>206</sup>. Navíc při použití středně velkých (500 nm) a větších (1-2  $\mu\text{m}$ ) částic do hodnot koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$  nebyla detekována žádná inhibice buněčné proliferace<sup>207</sup>. Změny biokompatibilních vlastností lze docílit po inkorporaci vhodných látek na povrch grafenových částic. Zejména lze využít hydrofilní charakter GO, jehož povrch je snadno modifikovatelný biokompatibilními polymery, jako jsou DNA, protilátky, proteiny a malé molekuly léčiv<sup>206</sup>. Příkladem je potažení GO chitosanem, který téměř eliminoval jeho toxicitu<sup>208</sup>. Z redukováného GO v kombinaci s fibroinem byla vytvořena kompozitní nanovláknina, která vykazovala biokompatibilitu, podporovala životaschopnost buněk a dokonce u kmenových buněk osteogenní diferenciaci<sup>209</sup>. Dále po použití polyethylenglykolu (PEG) u grafenových částic nebyla jejich cytotoxicita detekována až do hodnot 100  $\mu\text{g/ml}$ <sup>210</sup>. Na druhou stranu, po kombinaci GO s docetaxelem vázaného na molekuly PEG bylo docíleno velmi vysoké protinádorové aktivity na buňkách rakoviny prostaty<sup>211</sup>.

O mechanismu toxického působení grafenových částic na buněčné linie se toho ví zatím velmi málo. Bylo zjištěno, že grafen, GO i rGO mohou zvýšit expresi p53, Rad51 odrážející poškození chromozomů<sup>212</sup>. U GO modifikovaného pristinem došlo k přímé interakci s proteinovými receptory, které zabránily ROS závislé apoptóze. Nicméně tato dráha byla obejitá po použití GO-COOH, kdy byl předán pasivní apoptický signál do DNA nezávisle na ROS. V této studii je rozdílný účinek na buňky vysvětlen rozdílnou velikostí částic a také přítomností kontaminantů jako jsou ionty  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  a  $Cu^{2+}$ , které se při syntézách GO objevují velmi často a představují tak komplikace při bioaplikacích<sup>213</sup>.

Třetí faktor uvolnění léčiva z nosiče grafenových částic je definován několika způsoby. rGO i GO jsou charakterizovány velkou plochou reagující na infračervené záření tvorbou tepla využitelného při fototermitické terapii<sup>214</sup>. Dále jsou popsány případy, kdy lze pro cílené uvolnění léčiva použít ultrazvuk, elektrické či magnetické pole<sup>215,216</sup>. Další způsoby využívají chemické vlastnosti. Příkladem je vazba doxorubicinu s GO, kde v kyselém prostředí nádorové tkáně dochází k vyššímu uvolnění chemoterapeutika než v okolní zdravé tkáni<sup>217,218</sup>. Bylo zjištěno, že procento uvolněného léčiva závisí na pH a koncentraci solí pufovaného roztoku. Nádorové buňky navíc obsahují vyšší hladinu redukovatelného cysteinu a GSH<sup>219</sup>. Této skutečnosti bylo využito tehdy, kdy byla na nosič GO-PEG navázána cysteinová polymethakrylová kyselina a doxorubicin. Nosič pak uvolnil léčivo 6x rychleji při pH 5 v přítomnosti 10 mM GSH než při pH 7,4 s 10  $\mu$ M GSH, jako je ve zdravé tkáni<sup>220</sup>. Dalším příkladem je vazba již používaného chemoterapeutika 1,3-bis (2-chlorethyl)-1-nitrosomočoviny s GO obsahující polyakrylovou kyselinu. Po inkorporaci došlo ke zlepšení protinádorového působení a nastalo účinnější intracelulární vychytání rakovinnými buňkami<sup>221</sup>. K uvolnění léčiva lze využít také biodegradaci vlivem myeloperoxidázy, eosinofilperoxidázy s HRP (z ang. horseradish peroxidase) katalyzovanou oxidací<sup>222</sup>. Zbytky grafenových struktur jsou následně odklizeny makrofágy, jejichž schopnost tak přispívá ke zvýšení biokompatibility<sup>223</sup>.

Výhodou GO transportéru je užití nosnosti pro více než jedno léčivo. Příklad je popsán v kombinaci doxorubicinu a kamptotecinu na GO nosiči. Přítomnost obou léčiv vykazovala aditivní účinek na cytotoxicitu ve srovnání při použití pouze jednoho léčiva<sup>224</sup>. Navíc je popsáno, že užití systému GO vrstev s více léčivy odvrací také vznik mnoholékové rezistence<sup>225</sup>.

## 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- Shrňte současné poznatky cytotoxického účinku a mechanismu působení komplexů přechodných kovů (V, Mo, Pt) na nádorové linie
- Na základě výsledků WST-1 testu nově připravených komplexů, zhodnoťte vliv přítomnosti různého centrálního kovu a různých ligandů na cytotoxickou aktivitu
- Pro vybrané sloučeniny uskutečňte, za využití vhodných spektrálních metod, metod průtokové cytometrie, qRT-PCR a western blot metody s imunoanalytickou detekcí, studium biologického účinku vedoucí k nastínění mechanismu účinku tohoto typu komplexů
- Získané výsledky porovnejte s vlastními nebo publikovanými výsledky pro *cis*-platinu nebo nově připravenými platinovými komplexy

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **4.1. Přístroje a zařízení**

Laminární box Safe 1200 LC (Schoeller, ČR), inkubátor MCO-170AICUV (PHC, Japonsko), vodní lázeň Julabo Pura (GmbH, Německo), centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo), centrifuga Rotina 420R (Hettich, Německo), spektrofotometr Infinity 200 (Tecan, Švýcarsko), průtokový cytometr CyAn ADP (Beckman Coulter, USA), mikroskop TMS (Nikon, Japonsko), Real-Time PCR system Quantstudio 6 (Applied Biosystems, USA), miniProtean 3 (Biorad, USA), vyvolávací stanice PXi imaging systém (Syngene, UK), třepačka Vortex 3 (IKA, Německo), vortex Vornado (Benchmark Scientific, USA), suchá lázeň (Accublock, USA), analytické váhy MCE-125P-2S00-U (Sartorius, Německo), hlubokomrazicí box (Sanyo, Japonsko), výrobce demineralizované vody Synergy UV (Millipore, USA), výrobce ledu (Brema, Itálie), chladnička/lednička (Gorenje, Slovinsko), chladnička/lednička (Libherr, Švýcarsko), plynový kahan Fuego SCS basic (Trigon-Plus, ČR), Bürkerova komůrka (Meopta, USA), sada pipet (Eppendorf, Německo), sada pipet (Biohit, Finsko)

#### **4.2. Použitý materiál**

Sada plastových zkumavek (SPL, Korea), sada kultivačních lahví (SPL, Korea), sada špiček na pipety (Eppendorf, Německo), sada špiček na pipety Biohit (Sarstedt, Německo), mikrotitrační destička Corning 96 Flat Transparent (PPT, Nizozemí), mikrotitrační destička Nunc MicroWell F96 white (Trigon-Plus, ČR), sada zkumavek typu Eppendorf (Sarstedt, Německo), škrabka na buněčné linie (Sarstedt, Německo), sada serologických pipet (CAPP, Dánsko)

#### **4.3. Chemikálie a roztoky**

Kultivační médium IMDM z ang. Iscove's modified dulbecco's medium, kultivační médium RPMI z ang. Roswell Park Memorial Institute, kultivační médium DMEM z ang.

Dulbecco's modified eagle's medium composition, sterilní fosfátový pufr (PBS, z ang. phosphate buffered saline), glutamin, penicilin, streptomycin, nenasycené mastné kyseliny (NEAA, z ang. non essential amino acids), trypsin, trypanová modř, Cell proliferation Reagent WST-1, propidium jodid, Cytotoxicity detection KitPlus (LDH) (vše od Sigma-Aldrich, USA), fetální hovězí sérum (FBS, z ang. fetal bovine serum) (Biowest, USA), Caspase Glo3/7, 8, 9 (Promega, USA), ApoFlowEX FITC Kit (Exbio Diagnostics, ČR), citrátový pufr pH 7,8: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lach-ner, ČR) a 0,1 M kyselina citronová (Lach-ner, ČR); Vindelův roztok: 1 ml 1 M TRIS (Sigma-Aldrich, USA), 1 mg RNása (Sigma-Aldrich, USA) v 1 ml fosfátového pufru, 60 mg NaCl (Lach-ner, ČR), 5 mg propidia jodidu v 5 ml PBS – doplněno do 100 ml; RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany), cDNA Reverse Transcription Kit, TagMan Gene Expression Assays, CCNB1 Hs01030097\_m1, MDM2 Hs00234753\_m1, CDKN1A Hs00355782\_m1, p53(TP53) Hs\_00153349\_m1 (vše z Applied Biosystems, USA), Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, USA): před použitím naředěno 1:10 destilovanou vodou na objem 10 ml, 1 tableta PhosSTOP Easy (Sigma-Aldrich, USA), 1 tableta Complete Mini (Sigma-Aldrich, USA); roztok bicinchoninové kyseliny, 4% roztok pentahydrátu síranu měďnatého, proteinový standard, akrylamid, N'N'- metylenbisakrylamid, TEMED, 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8, TRIS-HCl pH 6,8, amonium persulfát: 0,1 g v 1 ml dH<sub>2</sub>O (vše z Sigma-aldrich, USA), 10% dodecylsulfát sodný (Serva, USA), vzorkový pufr: 7,5 ml 0,5M TRIS-HCl pH 6,8, 6 ml glycerolu (Serva, USA), 1,38 g SDS (Serva, USA), 0,6 ml 10% bromfenolové modři (Sigma-Aldrich, USA), doplnit do 17 ml dH<sub>2</sub>O; Precision plus protein<sup>TM</sup> standards, Prestained SDS-PAGE standards (Bio-Rad, USA), 10x koncentrovaný TBS pH 7,6: 48,4 g TRISbase (Sigma-aldrich, USA), NaCl (Lach-ner, ČR), úprava pH konc. HCl (Serva, USA); TBS: 1:9 10x TBS:dH<sub>2</sub>O, TBS + 0,05% TWEN (Sigma-aldrich, USA); TBS + 0,1% TWEN (Sigma-aldrich, USA), dělicí pufr: 6 g TRISbase (Sigma-aldrich, USA), 28,8 g glycin (Serva, USA), 1 g SDS (Serva, USA), do 1 l doplnit dH<sub>2</sub>O; pufr pro přenos proteinů: 3,03 g TRISbase (Sigma-aldrich, USA), 14,4 g glycin (Serva, USA), 200 ml methanol (Penta, ČR), doplnit do 1 l destilovanou vodou; Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, USA), hovězí sérový albumin (Sigma-aldrich, USA), sada primárních protilátek (Cell Signaling Technology, USA), polyclonal Swine Anti-Rabbit Iminoglobulins/HRP (Dako Denmark, Dánsko), polyclonal Goat Anti-Mouse immunoglobulins/HRP (Dako Denmark, Dánsko), ECL Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Applied Science, Švýcarsko), SuperSignal<sup>TM</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, USA), etanol (Penta, ČR), fyziologický roztok (Sigma-Aldrich, USA).

#### 4.4. Testované komplexy

Testované komplexy byly poskytnuty katedrou Obecné a anorganické chemie, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice. Jejich seznam, vč. strukturních vzorců, je uveden v příložených publikacích. *Cis*-platina byla zakoupena z Sigma-Aldrich, USA.

#### 4.5. Buněčné linie

Experimenty byly prováděny na nádorových buňkách MOLT-4, buňkách lidské promyelocytární leukémie HL-60, buňkách lidské T-lymfocytární leukémie Jurkat, buňkách A549, buňkách osteosarkomu Saos-2, buňkách kolorektálního karcinomu HT-29, buňkách nádoru děložního hrdla HeLa, buňkách karcinomu pankreatu PANC-1, buňkách lidského ovariálního karcinomu A2780, na buňkách lidského ovariálního karcinomu rezistentní k *cis*-platině A2780cis a na nenádorové linii buněk fibroblastů plicní tkáně MRC-5. Všechny linie byly zakoupeny z American type culture collection, USA.

#### 4.6. Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány za aseptických podmínek vždy v příslušném kompletním kultivačním médiu zhotoveném dle tabulky 1. Růst buněk probíhal v inkubačním boxu s hlídanou atmosférou, tj. 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Při kultivaci buněk byl pro zachování optimální denzity a rychlosti růstu buněk jejich počet pro každou linii individuálně optimalizován. Suspenzní buňky MOLT-4, HL-60 a Jurkat byly pasážovány v laminárním boxu za aseptických podmínek 2x týdně, ostatní adherentní buňky byly pasážovány 1x týdně a dle potřeby jim bylo měněno kultivační médium. Optimální počet buněk jednotlivých linií je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 - Složení kultivačních médií pro jednotlivé buněčné linie, kde FBS je fetální hovězí sérum, GLUT je glutamin, PNC/STR je penicilin/streptomycin. NEAA jsou nenasycené mastné kyseliny, IMDM je zkratka z Iscove's modified dulbecco's medium je, RPMI je zkratka z Roswell Park Memorial Institute, DMEM je zkratka z Dulbecco's modified eagle's medium composition.

Buněčná linie	Počet buněk při pasáži	Suplementy				Kultivační médium
<b>MOLT-4</b> <b>HL-60</b>	5 x 10 <sup>5</sup> /5 ml média	20% FBS 10 ml	GLUT 0,5 ml	PNC/STR 0,5 ml		IMDM 39 ml
<b>A2780</b> <b>A2780cis</b> <b>Jurkat</b>	2 x 10 <sup>5</sup> /5 ml média 4 x 10 <sup>5</sup> /5 ml média 5 x 10 <sup>5</sup> /5 ml média	10% FBS 5 ml	GLUT 0,5 ml	PNC/STR 0,5 ml		RPMI 34 ml
<b>MRC-5</b> <b>MCF-7</b>	4 x 10 <sup>5</sup> /5 ml média 1 x 10 <sup>6</sup> /5 ml média	10% FBS 5 ml	GLUT 0,5 ml	PNC/STR 0,5 ml	NEAA 0,5 ml	DMEM 33,5 ml
<b>A549</b> <b>Saos2</b> <b>HT-29</b> <b>PANC-1</b> <b>HeLa</b>	2 x 10 <sup>4</sup> /5 ml média 1 x 10 <sup>6</sup> /5 ml média 1 x 10 <sup>6</sup> /5 ml média 1 x 10 <sup>6</sup> /5 ml média 1 x 10 <sup>6</sup> /5 ml média	10% FBS 5 ml	GLUT 0,5 ml	PNC/STR 0,5 ml		DMEM 34 ml

#### 4.7. Počítání buněk

Princip stanovení při počítání buněk pomocí Trypanové modři je založen na schopnosti životaschopných buněk nepřítat do buněčné membrány barvivo trypanové modři. Buňky jsou pod optickým mikroskopem neobarveny. U poškozených buněk s narušenou integritou buněčné membrány nebo u buněk mrtvých barvivo prostupuje skrze necelistvou buněčnou membránu do buňky a pod mikroskopem jsou viděny obarvené modře.

Aktuální počet buněk byl stanoven vždy před pasážováním nebo před vlastním experimentem. Suspenzní buňky MOLT-4, HL-60 a Jurkat byly zcentrifugovány, bylo

odstraněno původní kultivační médium a buňky byly resuspendovány v 5 ml čerstvého kompletního kultivačního média. Z takto připravené důkladně promíchané suspenze buněk bylo odebráno 50  $\mu$ l a v poměru 1:1 smícháno s roztokem trypanové modři. Vzniklým roztokem buněk byla naplněna Bürkerova komůrka a bylo provedeno kvantitativní stanovení počtu živých a mrtvých buněk v 50 středních čtvercích při zachování zásady dvou stran. Výsledné množství bylo po přepočtu na plochu Bürkerovy komůrky vyjádřeno jako počet buněk  $\times 10^4$  v 1 ml kultivačního média.

Před počítáním adherentních buněk bylo nutné jejich uvolnění z povrchu kultivační láhve pomocí trypsinu. Po oplachu buněk pomocí PBS byl k buňkám přidán 1 ml trypsinu, který se nechal v inkubačním boxu, tj. při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>, působit 5 – 10 min, dle předem stanovené optimalizace pro každou buněčnou linii. Po uplynutí inkubační doby byly k buňkám s trypsinem přidány 4 ml kompletního kultivačního média, ve kterém FBS působil jako inhibitor trypsinu. Buňky byly zcentrifugovány, šetrně rozmíchány v 5 ml kultivačního média a další postup byl analogický s buňkami suspenzními.

Před vlastním experimentem bylo nutné adherentní buňky připravit v optimálním množství kultivačního média, napipetovat je do kultivační láhve nebo mikrotitrační destičky a nechat přisednout přes noc k povrchu. Poté bylo možno buněčnou linii ovlivnit testovaným komplexem a provést stanovení. Suspenzní buňky byly v optimálním množství napipetovány do kultivační láhve nebo mikrotitrační destičky a ovlivněny testovaným komplexem rovnou.

#### **4.8. Stanovení cytotoxické aktivity pomocí mitochondriální dehydrogenázy**

Metabolická aktivita mitochondriální dehydrogenázy byla stanovena pomocí komerčního WST-1 testu (z ang. Water-soluble tetrazolium-1). Stanovení je založeno na redukci 2-(4-jododofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium sodné soli mitochondriální dehydrogenázou viabilních buněk na stabilní formazan vhodný k fotometrickému stanovení při vlnové délce 440 nm.

Testované komplexy byly rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a ve výsledné koncentraci 0; 0,1; 0,4; 0,7; 1,5; 2,5 4; 9; 15; 27; 50  $\mu$ M byly napipetovány do 96-jamkové

mikrotitrační destičky k předem napipetovým buňkám o vhodné denzitě. Po uplynutí požadované doby inkubace bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu$ l roztoku WST-1 soli, připraveného naředěním WST-1 činidla v poměru 1:4 s PBS. Po uplynutí 3 h inkubační doby při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub> byla změřena absorbance vzniklého formazanu při 440 nm pomocí spektrofotometru Tecan. Každý testovaný komplex byl měřen ve třech navzájem na sobě nezávislých experimentech, z nichž byl stanoven průměr měření. Za využití statistické metody „ANOVA“ byl sestrojen graf životaschopnosti buněk v závislosti na použité koncentraci testovaného komplexu. Jednotlivé body byly proloženy křivkou, kde typ křivky vychází z analýzy směrodatných odchylek a následně byla odečtena hodnota IC<sub>50</sub>.

#### **4.9. Stanovení viability a proliferace buněk**

Viabilita a proliferace buněk byla stanovena počítáním v Bürkerově komůrce za využití barvení Trypanovou modří. Optimální počet buněk byl ovlivněn požadovanou koncentrací testovaného komplexu a inkubován po dobu 24, 48 a 72 h. Buňky byly následně spočítány po obarvení Trypanovou modří v Bürkerově komůrce. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. Ze třech na sobě nezávislých experimentů byl spočítán průměr měření  $\pm$  směrodatná odchylka, v závěru byly sestrojeny grafy % viability a % proliferace buněk v závislosti na inkubační době.

#### **4.10. Stanovení laktát dehydrogenázy**

Poškození integrity buněčné membrány bylo také hodnoceno stanovením úniku intracelulárního enzymu LDH. Aktivita LDH byla stanovena komerčním kitem po inkubační době v kultivačním médiu (s obsahem max 1 % FBS) po ovlivnění buněk požadovanou koncentrací testovaného komplexu. Neovlivněné buňky byly použity jako kontrola. Celková aktivita byla stanovena po sonifikaci buněk. Enzymová aktivita byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan při vlnové délce 340 nm. Uniklá aktivita LDH byla hodnocena vzhledem ke kontrolním buňkám ze tří na sobě nezávislých experimentů, ze kterých byl stanoven průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

#### **4.11. Stanovení apoptózy**

Buňky byly v optimálním množství ovlivněny požadovanými koncentracemi testovaného komplexu, inkubovány a analyzovány. Jako kontrola byly použity neovlivněné buňky. Pro analýzu apoptického procesu byl použit komerční kit ApoFlowEX FITC Kit, jehož měření je založeno na identifikaci apoptických buněk. V časně fázi apoptózy u buněk dochází k translokaci fosfatidylerinu a jeho zpřístupnění k detekci pomocí fluoresceinthioizokyanátu za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů. Během pozdní fáze apoptózy a nekrózy, kdy se membrána buněk stává permeabilní, dochází k interkalaci propidia jodidu do DNA. Každá koncentrace testovaného komplexu byla měřena pomocí průtokového cytometru CyAn ADP ve třech na sobě nezávislých experimentech. Data byla analyzována pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow systems, USA), ze kterých byl spočítán průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

#### **4.12. Stanovení kaspázové aktivity**

Indukce programované buněčné smrti byla stanovena skrz aktivitu kaspáz 3/7, 8, 9 pomocí komerčního kitu Caspase-Glo Assays. Buňky byly ovlivněny požadovanými koncentracemi testovaného komplexu a po uplynutí inkubační doby byly sklizeny a spočítány. Množství buněk  $10^4$  bylo napipetováno do mikrotitrační destičky a přidáno 50  $\mu\text{l}$  reagentie. Generovaný luminiscenční signál byl měřen na spektrofotometru Tecan po inkubační době 30 min při  $37^\circ\text{C}$ . Výsledek byl vyhodnocen jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří na sobě nezávislých experimentů a srovnán s kontrolními, neovlivněnými buňkami.

#### **4.13. Stanovení buněčného cyklu**

Po uplynutí inkubační doby buněk s požadovanými koncentracemi testovaných komplexů byly buňky sklizeny a promyty ve vychlazeném PBS, následně byly nejméně po dobu 48 h fixovány v 70% ethanolu. Pro detekci nízkomolekulárních fragmentů DNA byly buňky inkubovány 5 min v citrátovém pufru a potom byly 1 hod vystaveny vazbě s propidium jodidem ve Vindelově pufru. Distribuce buněk v různých fázích buněčného cyklu byla

stamovena pomocí průtokového cytometru CyAn ADP, data byla analyzována pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow systems, USA). Výsledek byl spočítán jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří na sobě nezávislých měření a srovnán s neovlivněnými, kontrolními buňkami.

#### **4.14. qRT-PCR**

Ovlivněné buňky požadovanými koncentracemi testovaných komplexů byly sklizeny a promyty sterilním PBS. Extrakce RNA byla provedena za využití RNeasy Mini Kitu dle pokynů výrobce. Následně bylo množství 1  $\mu$ g RNA reverzně transkribováno pomocí cDNA Reverse Transcription Kit a kvantifikováno s TagMan Gene Expression Assays. Relativní exprese byla měřena pomocí Quantstudio 6 Real-Time PCR systém. Množství mRNA bylo spočítáno pomocí komparativní Ct metody ( $\Delta\Delta$ Ct method). Výsledky byly následně hodnoceny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka ze tří na sobě nezávislých experimentů.

#### **4.15. Analýza buněčných proteinů**

Buňky byly po inkubaci s požadovanými koncentracemi testovaných komplexů sklizeny a promyty ve fosfátovém pufru. Využitím lyzovacího pufru byly připraveny celobuněčné lyzáty, ve kterých bylo stanoveno celkové množství proteinů pomocí stanovení s bicinchoninovou kyselinou. 20  $\mu$ g proteinu z každého lyzátu bylo nadávkováno do 12% polyakrylamidového gelu obsahující dodecylsírán sodný. Po elektroforetické separaci byly proteiny transferovány na polyvinilidenilovou membránu. Volná místa byla blokována pomocí 10% mléka v TBS pufru s 0,05% tween po dobu nejméně 60 min. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4°C. Po promytí byla membrána s proteiny inkubována 1 h se sekundární protilátkou při pokojové teplotě. Pro detekci signálu byl použit chemiluminiscenční detekční kit za využití měřicí stanice PXi imaging systém. Pro kontrolu ekvimolárního množství proteinu bylo na každé membráně stanoveno množství  $\beta$ -aktinu. Výsledky jsou udány jako reprezentativní imunoblotty ze tří na sobě nezávislých experimentů.

## 4.16. Statistická analýza

Hodnocení WST-1 testu bylo provedeno pomocí statistické metody ANOVA“ v softwaru Origin Pro (verze 8, Microcal Software, Inc., Northampton, USA). K analýze exprese RNA byl využit program GraphPad Prism verze 6.00 pro Windows, GraphPad Software, USA. Ostatní výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2003, USA. K porovnání dvou skupin skládajících se z normálně distribuovaných intervalových dat byl použit Studentův t-test.

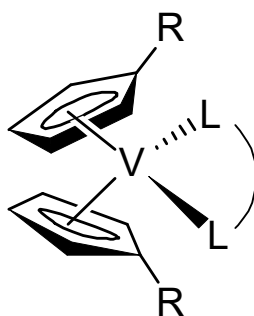
## 6. DISKUZE

### 6.1. Shrnutí výsledků

Vývoj nových metaloterapeutik se v současné době ubírá dvěma hlavními směry. Na jedné straně jsou vyvíjena nová platinová cytostatika. Na straně druhé jsou stejně intenzivně studovány komplexy obsahující neplatinový přechodný kov. Již od 90. let minulého století pracuje na Katedře obecné a anorganické chemie skupina chemiků zabývajících se přípravou organokovových sloučenin s katalytickou a aktuálně i biologickou aktivitou. V roce 2005 byl publikován jejich první článek popisující mikrobiologické působení lomených metalocenových sloučenin na buňkách *Escherichia coli*<sup>245</sup>. Další odborná sdělení mapující cytostatickou aktivitu komplexů kovů již vznikly ve spolupráci s Ústavem klinické chemie a biologie Univerzity Karlovi v Hradci Králové. Od roku 2010 jsem v této výzkumné skupině začala aktivně pracovat i já. Moje pozornost byla orientována na zavedení standardní metodiky a hodnocení cytotoxického účinku připravených komplexů pomocí WST-1 testu. V rámci své bakalářské a následně diplomové práce jsem otestovala a vyhodnotila více než 100 vzorků. Získané a publikované výsledky<sup>226,227,230,238,246-248</sup> se staly podkladem pro další pokračování tohoto výzkumu a zadání tématu předkládané disertační práce. Disertační práce se tak zaměřuje na cíleně připravené a dosud nepopsané komplexy vanadu, molybdenu a platiny, u kterých byla stanovena cytostatická aktivita, a u nejperspektivnějších komplexů byl studován mechanismus působení na vybrané buněčné linie. Pozornost byla zaměřena i na možnost využití uhlíkových nanostruktur pro transport těchto komplexů do organismu.

### 6.2. Stanovení cytotoxicity komplexů pomocí WST-1 testu

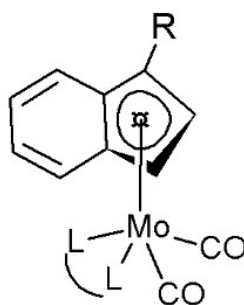
V případě lomených metalocenů byla, na základě předchozích výsledků, pozornost zaměřena na studium vanadocenových komplexů stabilizovaných N,N- nebo S,S- chelátovými ligandy, obsahující nesubstituovaný nebo methyl- substituovaný cyklopentadienylový ligand (Obrázek 6).



Obrázek 6 - Struktura lomeného vanadocenu, kde R je různý substituent, L je N,N- případně S,S- chelátově vázaný ligand.

Nově získané výsledky ukázaly, že substituce na cyklopentadienylovém kruhu nemá na cytostatickou aktivitu tohoto typu komplexů podstatný vliv. Naopak zásadní vliv má přítomnost a typ stabilizujícího chelátového ligandu. Velice slibné výsledky byly prokázány jak v případě dithiokarbamatů s piperidinovým kruhem  $IC_{50}$  (MOLT-4)  $\sim 1,0 \mu M$ ), tak v případě komplexů obsahující N,N-chelátově vázaný bis(fenylimino)acenaften a jeho substituovaný analog bis(4-methoxyfenylimino)acenaften. Tyto N,N-chelátové komplexy byly vysoce účinné nejen proti standardně používané leukemické linii MOLT-4, ale velmi dobrý inhibiční účinek byl také pozorován pro epiteliální buňky HeLa a A549 nebo buňky Saos2, na lidské buňky karcinomu prsu MCF-7, rakovinu vaječníků A2780 nebo karcinomu pankreatu PANC-1. Na základě těchto povzbudivých výsledků byly dva zástupci této skupiny vybrány pro studium mechanismu cytotoxického účinku.

Další sérií zkoumaných komplexů, které na rozdíl od předchozí skupiny nejsou zatím v odborné literatuře tak dobře prostudovány, byly monosendvičové komplexy molybdenu. Cíleně byla připravena série sloučenin obsahujících centrální atom molybdenu (II), které v bazální rovině obsahují dva karbonylové ligandy a dva další monodentátní ligandy nebo jeden N,N- chelátově vázaný ligand. Pozice ve vrcholu deformované pyramidy je pak obsazena  $\eta^5$ -vázaným cyklopentadienylovým nebo indenylovým ligandem (Obrázek 7).



Obrázek 7 - Struktura monosendvičového indenylového komplexu molybdenu, kde *R* je různý substituent, *L* je *N,N*-chelátově vázaný ligand.

Z výsledků vyplývá, že není výrazný rozdíl v aktivitě cyklopentadienylových nebo indenylových sloučenin. Stejně tak substituce na těchto ligandech nevede k jednoznačným závěrům. Oproti tomu substituce thiofenovou nebo terciální amino- skupinou cytostatickou aktivitu zvýšila. Naopak substituce karboxylovou skupinou, která měla zajistit vyšší rozpustnost v aplikačním i terapeutickém prostředí, aktivitu připravených komplexů snížila. Jednoznačně příznivý vliv na biologickou aktivitu mělo zavedení *N,N*-chelátujícího ligandu. Aktivita oproti nechelátovému analogu se ve většině případů zvýšila více než 50x. Bylo testováno 7 typů *N,N*-ligandů. Vysokou aktivitu ukázaly především fenantrolinové komplexy obsahující amin  $IC_{50}$  (MOLT-4)  $\sim 1,0 \mu\text{M}$  a 4,7-fenyl<sub>2</sub>-fenantrolin  $IC_{50}$  (MOLT-4)  $\sim 1,0 \mu\text{M}$ . Tyto strukturální typy byly vybrány pro další pokročilá studia související s odhalením mechanismu účinku.

Právě možnosti porovnání metod vedoucích k popsání mechanismu účinku nás vedly k zařazení nově připravených heterobimetalických Pt-Sn a Pt-Ag komplexů obsahujících dva stericky náročné PNH ligandy. Pt(II) komplexy s intramolekulárně koordinovanými fosfíny a chelatačními ligandy již byly zkoumány v práci od Řezníčka a kol. z roku 2012, kdy u těchto komplexů byla naměřena hodnota  $IC_{50}$  několikanásobně vyšší než pro *cis*-platinu<sup>250</sup>. Zavedení druhého kovu do těchto typů komplexů může mít aditivní efekt při léčbě nádorového onemocnění se zlepšenými farmakochemickými vlastnostmi<sup>251</sup>. Naše výsledky ukázaly, že v případě Pt-Sn komplexů je cytotoxická aktivita proti všem testovaným liniím potlačena, kdežto u komplexů Pt-Ag byla nalezena vysoká cytotoxická aktivita, a to i u *cis*-platina rezistentních buněk A2780cis. Nespornou výhodou těchto komplexů je selektivita účinku, kdy pro nenádorové buňky MRC-5 byly získány hodnoty  $IC_{50}$  až téměř 30x vyšší než pro nádorové buňky.

Komplex, který byl vybrán pro další studium, vykazoval vysokou cytostatickou aktivitu  $IC_{50}$  (A2780) =  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$  a pro A2780cis byla hodnota  $IC_{50}$  =  $1,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$ . Cytotoxická účinnost na nenádorové linii buněk MRC-5 je  $23,9 \pm 1,9 \mu\text{M}$ .

### 6.3. Analýza mechanismu působení vybraných komplexů

Pro studium mechanismu účinku sledovaných metaloterapeutik byly vybrány komplexy s vysokou cytostatickou aktivitou, rozdílným centrálním kovem, strukturou a stabilizujícími N,N- chelátovými ligandy. Použity byly dostupné moderní techniky spektrofotometrické analýzy, průtokové cytometrie, qRT-PCR a western blot metody s imunoanalytickou detekcí.

Z odborné literatury při popisu působení *cis*-platiny na nádorové linie plyne, že k objasnění mechanismu působení nelze použít žádný obecný koncept pro všechny typy nádoru, potažmo buněčných kultur. Její účinek je připisován zejména intracelulárnímu odštěpení chloridů a hydrataci s následnou ireverzibilní kovalentní vazbou na DNA N7-guaninu a adeninu<sup>249,252</sup> za vzniku vnitřetězcových zesíťovaných aduktů<sup>253</sup>. Nicméně až z 95 % dochází k preferenční vazbě na nukleofilní složky v buňce, jako jsou peptidy, proteiny, enzymy a RNA<sup>254,255</sup>. Celkový antikarcinogenní účinek je velmi často kombinací více mechanismů a je ovlivněn specifitou dané nádorové buňky. I přes to pak nádorové buňky zpravidla v závěru odpovědi na *cis*-platinu reagují zástavou replikace a transkripce, blokem v G2-fázi buněčného cyklu a navozením apoptické smrti<sup>75,256</sup>, zpravidla se zapojením dráhy AKT (z ang. thymomas of aldo-keto reductase mice), c-Abl (z ang. abelson tyrosine kinase), p53 a aktivací MAPK, zejména JNK (z ang. c-Jun N-terminal kinase) a p38<sup>257-261</sup>.

Literatura dále popisuje, že např. v léčbě leukemických atak pomocí *cis*-platiny se uplatňuje tvorba ROS se zvýšenou peroxidací lipidů a poklesem negativního náboje na povrchu buněk narušujícího množství fosfolipidů v buněčné membráně<sup>262,263</sup>.

Z výsledků popsaných v naší dřívější odborné publikaci<sup>230</sup> je známo, že komplexy s N,N- cheláty  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{V}(5\text{-NH}_2\text{-phen})]\text{OTf}$  a  $[(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Mo}(\text{CO})_2(\text{phen})\text{Cl}]$  obsahující vanad a molybden jako centrální přechodný kov, působí na leukemické linie MOLT-4 a HL-60 mechanismem velmi podobným *cis*-platině, a to bez ohledu na přítomnost odlišného centrálního atomu. Dochází ke snížení proliferační aktivity v závislosti na vzrůstající použité koncentraci komplexu a délce inkubační doby. Tento efekt je doprovázen aktivací cytotoxické

dráhy u buněk MOLT-4 indukovanou přes protein p53, která má za následek indukci kaspázového řetězce iniciovaného přes vnitřní dráhu uvedením v činnost kaspázu 9. Ta v závěru kaskádové reakce aktivuje kaspázy 3 a 7, které vedou k navození apoptické buněčné smrti a vzrůstu počtu mrtvých buněk MOLT-4 a HL-60.

Bylo zjištěno, že leukemické buňky reagují velmi obdobným mechanismem i po ovlivnění molybdenovým komplexem **20** [ $\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{O}\}\text{Mo}(\text{CO})_2(4,7\text{-Ph}_2\text{-phen})\}[\text{BF}_4]_2$  obsahujícím prostorově náročnější N,N- ligand a terciální aminoskupinu. Cytotoxický účinek ukazuje koncentrační a časovou závislost inhibující buněčnou proliferaci s nárůstem mrtvých buněk v pozdní fázi apoptózy. Vlivem aktivace p53 u buněk MOLT-4 dochází k zástavě buněčného cyklu v G1-fázi doprovázené buňkami v časné fázi apoptózy. Z literatury je známo, že tento tumor supresorový gen p53 výjimečně není přítomen v lidských nádorových buňkách HL-60<sup>264</sup>. Nicméně apoptóza v těchto buňkách, spojená s cytotoxickým účinkem testovaných komplexů, může být indukována nezávisle na proteinu p53, např. jak je uvedeno v literatuře, kde vlivem nadměrné exprese E2F, dochází k uvolnění cyklinu D1, E a indukci apoptózy díky hyperfosforylaci pRB<sup>28</sup>.

V cytotoxických testech se buněčná linie MOLT-4 odvozená od T-lymfocytární leukémie ukázala být pro svoje vlastnosti (krátký doubling time 29 h<sup>265</sup>, pasážování bez nutnosti trypsinizace buněk, okamžité ovlivnění bez nutnosti adheze buněk nebo nenáročnost na suplementy obsažené v kultivačním médiu) vhodným modelem první volby pro studium cytotoxické aktivity nově připravených komplexů. Nicméně, pro získání podrobnějších znalostí o analýze mechanismu cytotoxického působení je nezbytné znát míru selektivity k více buněčným typům rakoviny a zaměřit se na studium perspektivních sloučenin k nejvíce citlivé nádorové linii buněk. Jednou z nejvíce senzitivních linií nejen u našich testovaných komplexů jsou buňky A549. Jedná se o lidské buňky odvozené z adenokarcinomu alveolárních bazálních epiteliárních buněk plic. Tento typ rakoviny spadá do histologického subtypu adenokarcinomu nemalobuněčného karcinomu plic. Z důvodů pozdní diagnostiky je míra přežití 5 let pro adenokarcinom plic stále velmi nízká, v rozmezí od 4 – do 17 % v závislosti na stádiu nemoci a regionálních rozdílech<sup>266,267</sup>. Buňky A549 tvoří splývavé monovrstvy s charakteristickou morfologií a disponují cytochromy P450 IA1 a P450 IIB6 důležitými pro biotransformaci léčiv<sup>231</sup>.

Pro analýzu reakce buněk A549 na molybdenový komplex byl vybrán komplex **6** [ $(\eta^5\text{-C}_9\text{H}_6\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\text{Mo}(\text{CO})_2(4,7\text{-Ph}_2\text{-phen})\}[\text{BF}_4]$ , obsahující, stejně jako komplex **20**, 4,7-

Ph<sub>2</sub>-phen N,N-chelát a indenyl, tentokrát avšak substituovaný thiofenem. Bylo zjištěno, že na nádorové buňky komplex **6** působí zástavou proliferační aktivity bez indukce apoptického procesu. Pro srovnání citlivosti působení k nádorové tkáni bylo testování komplexem **6** provedeno i pro nenádorové buňky plicních fibroblastů MRC-5. Působení komplexu **6** na nenádorové buňky je odlišné, vykazuje shodné znaky s působením předchozího testovaného komplexu **20** a *cis*-platiny na buňky nádorové. U buněk MRC-5 dochází k indukci apoptózy přes aktivaci vnitřní apoptické dráhy skrz kaspázu 9, snížení množství proteinu MDM2, důležitého pro stabilizaci p53. Pokles proliferace buněk A549 je dán snížením S-fáze doprovázený G2-blokem buněčného cyklu s up-regulací p21, CHK1 a down-regulací PCNA. U buněk MRC-5 nejsou změny v regulaci buněčného cyklu pozorovány. Pouze u nižší testované koncentrace komplexu **6** nastává aktivace p21 a mírně dochází ke zvýšení množství CHK1 fosforylované na ser345. Tato značná výhoda komplexu **6** v odlišném účinku na nádorovou linii oproti buňkám zdravé plicní tkáně je velmi důležitá pro budoucí výzkum, která by mohla odhalit možnosti selektivního protinádorové terapie.

Plicní adenokarcinální buňky A549 byly ošetřeny také komplexy obsahujícími jako centrální atom vanad. Konkrétně byly vybrány vysoce účinné komplexy  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{Me})_2\text{V}(\text{bian})][\text{OTf}]_2$  **3b**,  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{Me})_2\text{V}(4\text{-MeO-bian})][\text{OTf}]_2$  **4b**. Mechanismus působení **3b** a **4b** je ve srovnání s molybdenovým komplexem **6** závislý na proteinu p53 po způsobu působení *cis*-platiny. Ve shodě s účinkem *cis*-platiny v MAP kinázové aktivitě na A549 byly nalezeny shodné buněčné odpovědi i po působení **3b** a **4b**. Zvýšení p38 koreluje s proapoptickou dráhou, oproti tomu při up-regulaci proteinů JNK a ERK1/2 dochází spíše k protiapoptické reakci. Apoptóza je ale stejně jako u *cis*-platiny na buňkách A549 podpořena aktivací MAP kinázové aktivity přes protein p38<sup>268</sup>. Nicméně, bylo zpozorováno, že apoptóza u testovaných komplexů je částečně inhibována zvýšením množství antiapoptického faktoru Bcl-2. A549 buňky ovlivněné **3b** a **4b** vykazovaly také up-regulaci proteinu ERK1/2, čímž se zvyšuje procento buněk ve fázi S. Snížení životaschopnosti A549 a uvolnění LDH je dáno aktivací apoptického procesu tentokrát se zapojením vnější apoptické dráhy kaspázy 8 s následnou aktivací výkonných kaspáz 3/7. Oba testované komplexy **3b** a **4b** mají značný antiproliferativní účinek závislý na dávce s up-regulací p21. Společně s aktivací CHK1 a CHK2 vedou k akumulaci buněk ve fázi G2. Každopádně, cytotoxického účinku obou komplexů je dosaženo ve srovnání s *cis*-platinou při nižších koncentracích a nastává již po 24 h inkubace, čehož lze efektivně využít v terapii nádorového onemocnění plicního adenokarcinomu.

Zvýšené množství ERK1/2 proteinu po léčbě buněk A549 *cis*-platinou je také v literatuře popsáno ve spojitosti s rozvojem rezistence buněk A549 k *cis*-platině<sup>268</sup>. Tento efekt je umocněn rovněž nedostatečnou aktivací p38<sup>269</sup>. Stejná závislost MAP kinázové aktivity je popsána i při účinku tohoto léčiva na *cis*-platina rezistentní buňky ovariálního karcinomu A2780cis<sup>270</sup>. Z tohoto důvodu byla naše pozornost zaměřena při mapování pohledu mechanismu účinku nových organokovových komplexů právě i na buňky ovariálního karcinomu. Krom toho pacientky s tímto karcinomem trpí relapsem onemocnění během 6 - 24 měsíců ovšem již spojeným s rozvojem chemorezistence k *cis*-platině. S tím souvisí i velmi nízká míra pětiletého přežití okolo 20 – 25%<sup>271</sup>.

Při vývoji metaloterapeutik, i v současné době, nadále zůstávají snahy o vývoj analogu *cis*-platiny ve snaze minimalizovat rozvoj chemorezistence při zachování silné protinádorové aktivity. V naší další práci byly připraveny heterobimetalické komplexy Pt-Sn a Pt-Ag obsahující aminofosfinový ligand. Ve srovnání s *cis*-platinou je v literatuře popsán odlišný mechanismus účinku fosfinových komplexů platiny<sup>272-276</sup>. U většiny z nich dochází k cytotoxickému působení bez zástavy proliferace buněk, pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti<sup>276</sup>. Popsaná protinádorová aktivita spočívá v indukci apoptózy, ztrátou mitochondriálního potenciálu a akumulací buněk v G1-fázi buněčného cyklu. U dalších Pt(II) komplexů obsahující fosfinové skupiny byl zjištěn protinádorový účinek s vmezeřením do DNA a aktivitou, která štěpila DNA. Biologicky aktivní komplexy byly nalezeny převážně v cytoplazmě. Cytotoxická aktivita byla funkcí lipofility a buněčné akumulace komplexů, která vedla k apoptóze buněk usnadněné tvorbou ROS<sup>277</sup>.

U našeho testovaného heterobimetalického Pt-Ag komplexu **4** s aminofosfinovým ligandem na buňkách A2780 a A2780cis dochází k antiproliferativnímu účinku s aktivací apoptózy buněk již po 24 h působení. Apoptóza však oproti *cis*-platině není závislá na proteinu p53. Nicméně, dochází k aktivaci proapoptického proteinu p38, a to i u *cis*-platina rezistentních buněk A2780cis, což může být pravděpodobně jeden z faktorů snížení rezistence k *cis*-platinovému komplexu a indukce apoptózy. Zvýšené množství p38 je dále spojeno s depolarizací membrány mitochondrií a aktivací BAX proteinu, s následným uvedením kaspázy 9 do činnosti, což má vliv na zvýšenou aktivitu efektorové kaspázy 3 a 7. Vlivem zvýšeného množství p21 a check point kinázové aktivity v buňkách A2780 dochází ke G2-bloku buněk, buňky A2780 reagují akumulací v S-fázi buněčného cyklu. Pro srovnání nenádorové buňky MRC-5 reagují cytotoxičky na komplex **4** pouze za použití vyšší

koncentrace a až za delší čas po ovlivnění. Při použití krátkodobého ovlivnění není apoptická smrt v buňkách nenádorových fibroblastů aktivována.

Získané výsledky naznačují, že i v případě platinového komplexu **4** dochází k selektivnímu účinku na nádorové buňky již po krátkodobém působení. Navíc, s vysokou cytotoxicitou komplex **4** působí i na buňky rezistentní vůči účinkům *cis*-platiny. Analýza mechanismu působení dále ukazuje, že v mnoha ohledech je buněčná odpověď obdobná k účinkům *cis*-platiny. Přítomnost fosfinových skupin v molekule sebou přináší ale rozdíly, které mohou mít na léčbu nádorového onemocnění kladný efekt a mohou být využity v perspektivě komplexu jako nového potenciálního protinádorového léčiva.

Otázka selektivního působení chemoterapeutik pro zajištění maximálního účinku při současné minimalizaci jejich nežádoucích vedlejších účinků by mohla být vyřešena pomocí jejich cíleného transportu. Touto problematikou se zabývá poslední část předkládané disertační práce. Grafenové nanostruktury jsou jedním z perspektivních materiálů, jež by se mohly v budoucnu využít jako nosiče pro cílený transport léčiv. Bohužel literatura uvádí několik prací popisujících jejich vysokou cytotoxicitu<sup>203,204</sup>.

Ve spolupráci s Institutem anorganické chemie Akademie věd ČR bylo zjištěno, že cytotoxicita grafenových částic může souviset i s přítomností různých kontaminantů. Cytotoxická studie na buňkách získaných ze zdravých plicních a dermálních fibroblastů MRC-5 a HDF ukázala, že v našem příspěvku popsáný promývací proces má pozitivní efekt na snížení cytotoxického účinku. Bylo zjištěno, že oproti standardně připravenému grafenoxidu (GO), došlo v případě upraveného grafenoxidu (rswGO) k řádovému poklesu cytotoxicity.

Nicméně, bylo pozorováno, že cytotoxicita bude pravděpodobně vlastností samotných grafenoxidových částic. Ukázalo se, že u kontaminantů zbaveného grafenoxidu a i při použití stabilizujícího polymeru Pluronic-F127 (bránícího agregaci částic na povrchu buněk, a tím bránícího jejich přímému poškození) dochází přesto ke značnému ovlivnění životaschopnosti buněk.

O tvrzení, že toxicita nanočástic bude znamenat velmi značné omezení v biomedicině, se opíráme i v poslední studii<sup>278</sup>, která vznikla na Ústavu chemie a biologie, Univerzity Karlovy v Hradci Králové ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd Univerzity v Pardubicích. Studovány byly na nádorové linii A549 nanočástice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> potažené křemičitanem s thiolovou funkcionalizací. Studie odhalila, že tyto nanočástice budou negativně ovlivňovat růst a adhezi buněk. Bylo prokázáno zhroucení sítě aktinových mikrofilament

a narušení mikrotubulárního cytoskeletu v přímé interakci s aktivací FAK proteinu (z ang. focal adhesion kinase) up-regulující ERK a p38.

Tato zjištění mohou představovat vážné omezení při použití grafenoxidu a dalších nanočástic jako transportního média léčiv pro použití v biomedicínských aplikacích.

## 7. ZÁVĚR

Chemoterapie otevřela v 90. letech minulého století další cestu k léčbě rakoviny. Bohužel dosud používané chemoterapeutické látky zatím nedokáží rozlišovat mezi buňkami rakovinnými a rychle se množícími buňkami zdravými. Proto neustává snaha hledat nová lepší cytostatika. Tímto tématem se zabývá i předkládaná disertační práce.

V teoretické části jsou shrnuty poznatky o cytotoxickém účinku a mechanismu působení komplexů přechodných kovů. Na základě těchto informací se naše pozornost zaměřila na komplexy obsahující centrální kov vanad a molybden.

V praktické části byla pomocí WST-1 testu stanovena cytostatická aktivita různých strukturních typů organokovových komplexů vanadu a molybden. Výsledky potvrdily, že tyto komplexy jsou vhodnými adepty pro léčbu nádorového působení. Jednoznačně bylo prokázáno, že vysoká cytotoxicita je spojená s přítomností stabilizujícího S,S- nebo N,N- chelátového ligandu. Nejúčinnějšími pak byly fenantrolinové komplexy obsahující amin nebo fenyl fenantrolin. Účinnost těchto sloučenin byla řádově vyšší oproti standardně využívanému léčivu *cis*-platině. Vyšší terapeutický účinek byl pozorován i u nově připravených heterobimetalických Pt-Ag komplexů s fosfinovými ligandy. Nejúčinnější komplex byl použit i pro následné studium mechanismu účinku.

Molekulární změny v nádorových buňkách po působení vybraných komplexů vanadu, molybden a nového platinového komplexu byly srovnatelné s účinkem *cis*-platin. Dochází k antiproliferačnímu efektu s vyvoláním apoptického procesu doprovázeného akumulací buněk v G1-fázi buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že cytotoxický účinek je vyvolaný nezávisle na použitých nádorových buňkách, avšak je závislý na použité koncentraci a době působení komplexů. Signifikantní rozdíl byl nalezen u thiofenového komplexu molybden, který na linii buněk adenokarcinomu vyvolal inhibici růstu buněk s G2 blokem buněčného cyklu bez indukce apoptické smrti. U tohoto komplexu bylo prokázáno preferenční působení k nádorové tkáni ve srovnání s buněčnou linií odvozenou od zdravé tkáně. Obdobná selektivita účinku byla potvrzena i u Pt-Ag komplexu s fosfinovými ligandy, který svůj potenciál uplatnil i při testování s buňkami rezistentními k *cis*-platině.

Nad rámec vytčených cílů disertační práce byla studována možnost snížení nežádoucích vlivů cytostatik pomocí cíleného transportu potenciálních léčiv vázaných na povrch nanočástic na bázi grafenoxidu. Při analýze biokompatibilního účinku bylo bohužel prokázáno, že testované nanočástice samy disponují vysokou cytotoxicitou k nenádorovým buňkám a nejsou prozatím pro toto použití v biomedicíně vhodné.

## 8. LITERATURA

1. SIEGAL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. *CA a Cancer Journal for Clinicians*. 2019, **69**(1), 7-34.
2. KONKANKIT, C. C., MARKER, S. C., KNOPF, K. M., WILSON, J. J. Anticancer activity of complexes of the third row transition metals, rhenium, osmium, and iridium. *Dalton Transactions*. 2018, **47**(30), 9934-9974.
3. ROSENBERG, B., CAMP, L., KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965, **205**, 698-699.
4. NOFFKE, A. L., HABTEMARIAM, A., PIZARRO, A. M., SADLER, P. J. Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chemical Communication*. 2012, **48**(43), 5219-5246.
5. LIANG, J. X., ZHONG, H. J., YANG, G., VELLAISAMY, K., MA, D. L., LEUNG, C. H. Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017, **177**, 276-286.
6. BRUIJNINCX, P. C., SADLER, P. J. Controlling platinum, ruthenium and osmium reactivity for anticancer drug design. *Advances in Inorganic Chemistry*. 2009, **61**, 1-62.
7. GELDMACHER, Y., OLESZAK, M., SHELDRIK, W. S. Rhodium (III) and iridium (III) complexes as anticancer agents. *Inorganica Chimica Acta*. 2012, **393**, 84-102.
8. O'DWYER, P. J., STEVENSON, J. P., JOHNSON, S. W. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*. 2000, **59**, 19-27.
9. SIMOVIĆ, A. R., MASNIKOSA, R., BRATSOS, I., ALESSIO, E. Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. *Coordination Chemistry Reviews*. 2019, **398**, 113011.
10. TSHUVA, E. Y., MILLER, M., SIGEL, A., SIGEL, H., FREISINGER, E., SIGEL, R. Coordination complexes of titanium(IV) for anticancer therapy. *MetalloDrugs: Develop and Action of Anticancer Agents*. 2018, **18**, 219-249.
11. TORTI, S. V. and TORTI, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature Reviews Cancer*. 2013 **13**(5), 342-355.
12. KIM, J. H., REEDER, E., PARKIN, S., AWUAH, S. G. Gold(I/III)-phosphine complexes as potent antiproliferative agents. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 12335.
13. KÖPF-MAIER, P. and KÖPF, H. Non-platinum group metal antitumor agents. History, current status, and perspectives. *Chemical Reviews*. 1987, **87**(5), 1137-1152.
14. KÖPF-MAIER, P. and KÖPF, H. Vanadocene Dichloride - Another Antitumor Agent from the Metallocene Series *Z. Naturforsch. B*. 1979, **34**, 805-807.
15. KÖPF-MAIER, P., LEITNER, M., KÖPF, H. Tumor inhibition by metallocenes: antitumor activity of niobocene and tungstocene dichlorides. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1980, **42**(12), 1789-1791.
16. KÖPF-MAIER, P. and KLAPÖTKE, T. J. Antitumor activity of ionic niobocene and molybdenocene complexes in high oxidation states. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1992, **118**(3), 216-221.
17. SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*. 1998, **35**(6), 461-478.
18. PAVLIDES, S. C., LECANDA, J., DAUBRIAC, J., PANDYA, U. M., GAMA, P., BLANK, S. TGF-activates APC through Cdh1 binding for Cks1 and Skp2 proteasomal destruction stabilizing p27kip1 for normal endometrial growth. *Cell Cycle*. 2016, **15**(7), 931-947.

19. LEE, E. W., LEE, M. S, CAMUS, S., GHIM, J., YANG, M. R., OH, W. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO Journal*. 2009, **28**(14), 2100–2113.
20. HYDBRING, P., MALUMBRES, M., SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016, **17**(5), 280–292.
21. YAGI, A., HASEGAWA, Y., XIAO, H., HANEDA, M., KOJIMA, E., NISHIKIMI, A. GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003, **90**(6), 1242–1249.
22. WU, S., CETINKAYA, C., MUNOZ-ALONSO, M. J., VON DER LEHR, N., BAHRAM, F., BEUGER, V. Myc represses differentiation-induced p21<sup>CIP1</sup> expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*. 2003, **22**(3), 351–360.
23. VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, **408**(6810), 307–340.
24. YEE, K. S. and VOUSDEN, K. H. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*. 2020, **26**(8), 1317–1322.
25. BITOMSKY, N., CONRAD, E., MORITZ, CH., POLONIO-VALLON, T., SOMBROEK, D., SCHULTHEISS, K., GLAS, K., GREINER, V. Autophosphorylation and Pin1 binding coordinate DNA damage-induced HIPK2 activation and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 2013, **110**(45), 4203–4212.
26. CHEHAB, N. H., MALIKZAY, A., STAVRIDIS, E. S., HALAZONETIS, T. D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 1999, **96**(24), 777–782.
27. FURIHATA, M., KURABAYASHI, A., MATSUMOTO, M., SONOBE, H., OHTSUKI, Y., TERAOKA, N. Frequent phosphorylation at serine 392 in overexpressed p53 protein due to missense mutation in carcinoma of the urinary tract. *Journal of Pathology*. 2002, **197**(1), 82–88.
28. LIU, Y., LAGOWSKI, J. P., VANDERBEEK, G. E., KULESZ-MARTIN, M. F. Facilitated search for specific genomic targets by p53 C-terminal basic DNA binding domain. *Cancer of Biologic Therapy*. 2004, **3**(11), 1102–1108.
29. JUNG, Y. S., QIAN, Y., CHEN, X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signalling*. 2010, **22**(7), 1003–1012.
30. GARTEL, A. L. Is p21 oncogene? *Molecular Cancer Therapy*. 2006, **5**(6), 1385–1386.
31. MULLAN, P., QUINN, J., HARKIN, D. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control, *Oncogene*. 2006, **25**(43), 5854–5863.
32. ZALDUA, N., LIAVERO, F., ARTASO, A., GÁLVEZ, P., LACERDA, H. M., PARADA, L. A., ZAGUZA, J. L. Rac1/p21-activated kinase pathway controls retinoblastoma protein phosphorylation and E2F transcription factor activation in B lymphocytes. *FEBS Journal*. 2016, **283**(4), 647–661.
33. CHOI, W. I., KIM, M. Y., JEON, B. N., KOH, D. I., YUN, C. O., LI, Y. Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21<sup>WAF/CDKN1A</sup>) gene repression. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, **289**(27), 18625–18640.
34. AACHMANN, F. L., FOMENKO, D. E., SORAGNI, A., GLADYSHEV, V. N., DIKIY, A. Solution structure of selenoprotein W and NMR analysis of its interaction with 14-3-3 proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(51), 37036–37044.

35. SORIA, G. and GOTTIFREDI, V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: the exception that confirms the rule? *DNA Repair*. 2010, **9**(4), 358-364.
36. BARD-CHAPEAU, E. A., JEYAKANI, J., KOK, C. H., MULLER, J., CHUA, B. Q., GUNARATNE, J. Ecotopic viral integration site 1 (EVI1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* 2012, **109**, 2168–2173.
37. WU, Z., ZHENG, S., YU, Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009, **41**(12), 2389–2397.
38. OLIVIER, M., GOLDFAR, D. E., SODHA, N., OHGAKI, H., KLEIHUES, P., HAINAUT, P., EELES, R. A. Li-Fraumeni and related syndromes: Correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research*. 2003, **63**(20), 6643–6650.
39. BROSH, R. and ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer*. 2009, **9**(10), 701–713.
40. ZERDOUMI, Y., AURY-LANDAS, J., BONAÏTI-PELLIÉ, C., DERAMBURE, C., SESBOÛÉ, R., RENAUX-PETEL, M. Drastic effect of germline TP53 missense mutations in Li-Fraumeni patients. *Human Mutation*. 2013, **34**(3), 453–461.
41. YAN, W., LIU, G., SCOUMANNE, A., CHEN, X. Suppression of inhibitor of differentiation 2, a target of mutant p53, is required for gain-of-function mutations. *Cancer Research*. 2008, **68**(16), 6789–6796.
42. YUE, X., ZHAO, Y., XU, Y., ZHENG, M., FENG, Z., HU, W. Mutant p53 in cancer: Accumulation, Gain-of-function, and Therapy. *Journal of Molecular Biology*. 2017, **429**(11), 1595-1606.
43. WANG, Y., HELLAND, A., HOLM, R., SKOMEDAL, H., ABELER, V.M., DANIELSEN, H. E., TROPE, C. G., BORRESEN-DÁLE, A. L., KRISTENSEN, G. B. TP53 mutations in early-stage ovarian carcinoma, relation to long-term survival. *British Journal of Cancer*. 2004, **90**, 678–685.
44. WANG, Y., KRINGEN, P., KRISTENSEN, G. B., HOLM, R., BAEKELANDT, M. M., OLIVIER, M., SKOMEDAL, H., HAINAUT, P., TROPE, C. G., ABELER, V. M. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G.C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Human Mutation*. 2004, **24**(1), 21–34.
45. LANGEROD, A., ZHAO, H., BORGAN, O., NESLAND, J. M., BUKHOLM, I. R., IKDAHL, T., KARESEN, R., BORRESEN-DALE, A. L., JEFFREY, S. S. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2007, **9**(3), R30.
46. VANINETTI, N. M., GELDENHUYS, L., PORTER, G. A., RISCH, H., HAINAUT, P., GUERNSEY, D. L., CASSON, A. G. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Molecular Carcinogenesis*. 2008, **47**(4), 275–285.
47. BELYI, V., A., AK, P., MARKERT, E., WANG, H., HU, W., PUZIO-KUTER, A. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, **2**(6), 001198.
48. FREED-PASTOR, W. A. and PRIVES, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes and Development*. 2012, **26**(12), 1268–1286.
49. BROOKS, C. L. and GU, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular Cell*. 2006, **21**(3), 307–315.
50. LANG, G. A., IWAKUMA, T., SUH, Y. A., LIU, G., RAO, V. A., PARANT, J. M. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li–Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004, **119**(6), 861–872.

51. TERZIAN, T., SUH, Y. A., IWAKUMA, T., POST, S. M., NEUMANN, M., LANG, G. A. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes and Development*. 2008, **22**, 1337–1344.
52. ZHENG, T., WANG, J., ZHAO, Y., ZHANG, C., LIN, M., WANG, X. Spliced MDM2 isoforms promotemutant p53 accumulation and gain-of-function in tumorigenesis. *Nature Communication*. 2013, **4**, 2996.
53. HARRIS, S. L. and LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005, **24**(17), 2899–2908.
54. SIGAL, A. and ROTTER, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*. 2000, **60**(24), 6788–6793.
55. SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer*. 2017, **67**(1), 7-30.
56. FITZMAURICE, Ch. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*. 2017, **3**(4), 524-548.
57. ALLEMANI, C., WEIR, H. K., CARREIRA, H., HAREWOOD. R., SPIKA, D., WANG, X. S., AHN, J. V., JOHNSON, C. J. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015, **385**, 977-1010.
58. DESOIZE, B. and MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002, **42**, 317-325.
59. WEISS, R. B. and CHRISTIAN, M. C. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs*. 1993, **46**(3), 360-377.
60. SHER, T., DY, G. K., ADJEI, A. A. Small cell lung cancer. *Mayo Clinic Proceeding*. 2008, **83**(3), 355–367.
61. CHEN, G., HUYNH, M., FEHRENBACHER, L., WEST, H., LARA, P. N., YAVORKOVSKY, L. L., RUSSIN, M., GOLDSTEIN, D., LAU, D. Phase II trial of irinotecan and carboplatin for extensive or relapsed small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, **27**(9), 1401-1404.
62. DECATRIS, M. P., SUNDAR, S., O'BYRNE, K. J. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treatment Reviews*. 2004, **30**(1), 53-81.
63. TSIMBERIDOU, A. M., BRAITEH, F., STEWART, D. J., KURZROCK, R. Ultimate fate of oncology drugs approved by the us food and drug administration without a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, **27**(36), 6243–6250.
64. AGARWAL, R. and KAYE, S. B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews in Cancer*. 2003, **3**, 502-516.
65. MENG, F., SUN, G., ZHONG, M, YU, Y., BREWER, M. A. Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 2013, **108**(3), 579-586.
66. KAKAR, S. S., JALA, V. R., FONG, M. Y. Synergistic cytotoxic action of cisplatin and withaferin A on ovarian cancer cell lines. *Biochemical Biophysical Research in Communication*. 2012, **423**(4), 819-825.
67. ALIZADEHNOHI, M., NABIUNI, M., NAZARI, Z., SAFAEINEJAD, Z., IRIAN, S. The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp. *Journal of Venom Research*. 2012, **3**, 22–27.
68. PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J., PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2005, **55**(2), 74–108.

69. SCHER, H. I. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *Journal of Urology*. 1992, **148**(5), 1625–1626.
70. MATSUKI, M., TAKAHASHI, A., KATOU, S., TAKAYANAGI, A., TAKAGI, Y., KAMATA, K. Pathological complete response to gemcitabine and cisplatin chemotherapy for advanced upper tract urothelial carcinoma: a case report. *Nih Hin Gak Zasshi*. 2013, **104**(1), 33–37.
71. KHAN, A. B., D'SOUZA, B. J., WHARAM, M. D., CHAMPION, L. A., SINKS, L. F., WOO, S. Y. McCullough D.C., Leventhal B.G.: Cisplatin therapy in recurrent childhood brain tumors. *Cancer Treatment Reports*. 1982, **66**(12), 2013–2020.
72. KOIZUMI, W., NARAHARA, H., HARA, T., TAKAGANE, A., AKIYA, T., TAKAGI, M., MIYASHITA, K., NISHIZAKI, T., KOBAYASHI, O., TAKIYAMA, W., TOH, Y., NAGAIE, T., TAKAGI, S., YAMAMURA, Y., YANAOKA, K., ORITA, H., TAKEUCHI, M. S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncology*. 2008, **9**(3), 215–221.
73. AJANI, J. A., WINTER, K. A., GUNDERSON, L. L., PEDERSEN, J., BENSON, A. B., THOMAS, C. R., MAYER, R. J., HADDOCK, M. G., RICH, T. A., WILLETT, C. Fluorouracil, mitomycin, and radiotherapy vs fluorouracil, cisplatin, and radiotherapy for carcinoma of the anal canal: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008, **299**(16), 1914–1921.
74. PREVIATI, M., LANZONI, I., CORBACELLA, E., MAGOSSO, S., GUARAN, V., MARTINI, A., CAPITANI, S. Cisplatin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Internation Journal of Molecular Medicine*. 2006, **18**(3), 511–516.
75. KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews in Cancer*. 2007, **7**(8), 573–584.
76. AGGARWAL, S. K., BROOMHEAD, J. A., FAIRLIE, D. P., WHITEHOUSE, M. W. Platinum drugs: combined anti-lymphoproliferative and nephrotoxicity assay in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1980, **4**(4), 249–258.
77. BECK, D. J. and BRUBAKER, R. R: Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1973, **116**(3), 1247–1252.
78. DASARI, S., TCHOUNWOU, P. D. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014, **5**, 364–378.
79. SHEN, D. W., POULIOT, L. M., HALL, M. D., GOTTESMAN, M. M., Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacology Reviews*. 2012, **64**(3), 706–721.
80. JOHNSON, S. W., SHEN, D., PASTAN, I., GOTTESMAN, M. M., HAMILTON, T. C. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. *Experimental Cell Research*. 1996, **226**(1), 133–139.
81. HOLZER, A. K., MANOREK, G. H., HOWELL, S. B. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular Pharmacology*. 2006, **70**(4), 1390–1394.
82. SAAD, S. Y., NAJJAR, T. A., ALASHARI, M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004, **31**(12), 862–867.
83. HAMPTON, M. B. and ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*. 1997, **414**(3), 552–556.

84. GUPTA, S. C., HEVIA, D., PATCHVA, S., PARK, B., KOH, W., AGGARWAL, B. B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2012, **16**(11), 1295–1322.
85. AGGARWAL, S. K. Calcium modulation of toxicities due to cisplatin. *Met. Based. Drugs*. 1998, **5**(2), 77–81.
86. SHRIVASTAVA, A., KUZONTKOSKI, P. M., GROOPMAN, J. E., PRASAD, A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapy*. 2011, **10**(7), 1161–1172.
87. LONG, N. J. *Metallocenes*, Blackwell Science, Oxford, UK, 1998.
88. NAVARA, C. S., BENYUMOV, A., VASSILEV, A., NARLA, R. K., GHOSH, P., UCKUN, F. M. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-cancer Drugs*. 2001, **12**(4), 369–376.
89. SHILLING, T., KEPPLER, K. B., HEIM, M. E., NIEBCH, G., DIETZFELBIGER, H., RASTETTER, J., HANAUSKE, A. R. Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane. *Investigation New Drugs*. 1996, **13**(14), 327–332.
90. MELÉNDEZ, E. Titanium complexes in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2002, **42**(3), 309–315.
91. CARUSO, F. and ROSSI, M. Antitumor titanium compounds. *Mini Review in Medicinal Chemistry*. 2004, **4**(1), 49–60.
92. LÜMMEN, G., SPERLING, H., LUBOLDT, H., OTTO, T., RÜBBEN, H. Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1998, **42**, 415–417.
93. KRÖGER, N., KLEEBERG, U. R., MROSS, K., EDLER, L., SAB, G., HOSSFELD, D. K. Phase II clinical trial of titanocene dichloride in patients with metastatic breast cancer. *Onkologie*. 2000, **23**, 60–62.
94. OLSZEWSKI, U. and HAMILTON, G. Mechanisms of cytotoxicity of anticancer titanocenes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2010, **10**(4), 302–311.
95. DABROWIAK, J. C. *Metals in medicine*, JohnWiley & Sons, West, Sussex, UK, 2009.
96. HERNÁNDEZ, R., LAMBOY, J., GAO, L. M., MATTA, J., ROMÁN, F. R., MELÉNDEZ, E. Structure-activity studies of Ti(IV) complexes: aqueous stability and cytotoxic properties in colon cancer HT-29 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2008, **13**(5), 685–692.
97. HERNÁNDEZ, R., MÉNDEZ, J., LAMBOY, J., TORRES, M., ROMÁN, F. R., MELÉNDEZ, E. Titanium(IV) complexes: cytotoxicity and cellular uptake of titanium(IV) complexes on caco-2 cellline. *Toxicology in Vitro*. 2010, **24**(1), 178–183.
98. ALLEN, O. R., GOTT, A. L., HARTLEY, J. A., HARTLEY, J. M., KNOX, R. J., MCGOWAN, P. C. Functionalised cyclopentadienyl titanium compounds as potential anticancer drugs. *Dalton Transaction*. 2007, **21**(43) 5082–5090.
99. POTTER, G. D., BAIRD, M. C., COLE, S. P. C. A new series of titanocene dichloride derivatives bearing chiral alkylammonium groups; Assessment of their cytotoxic properties. *Inorganica Chimica Acta*. 2010, **364**(1), 16–22.
100. SWEENEY, N. J., MENDOZA, O., MÜLLER-BUNZ, H., PAMPILLÓN, C., REHMANN, F.-J. K., STROHFELDT, K., TACKE, M. Novel benzyl substituted titanocene anti-cancer drugs. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2005, **690**, (21–22), 4537–4544.
101. GUO, M. and SADLER, P. J. Competitive binding of the anticancer drug titanocene dichloride to N,N-ethylenebis(o-hydroxyphenylglycine) and adenosine triphosphate: a model for TiIV uptake and release by transferrin. *Dalton Transaction*. 2000, **1**, 7–9.

102. PAVLAKI, M., DEBELI, K., TRIANTAPHYLLIDOU, I. E., KLOURAS, N., GIANNOPOULOU, E., ALETRAS, A. J. A proposed mechanism for the inhibitory effect of the anticancer agent titanocene dichloride on tumour gelatinases and other proteolytic enzymes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2009, **14**(6), 947–957.
103. OLSZEWSKI, U., CLAFFEY, J., HOGAN, M., TACKE, M. Anticancer activity and mode of action of titanocene C. *Investigation New Drugs*. 2011, **29**(4), 607–614.
104. GÓMEZ-RUIZ, S., MAKSIMOVIC-IVANIC, D., MIJATOVIC, S., KALUDEROVIĆ, G. N. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Application*. 2012, **2012**, 1–14.
105. ALLEN, O. R., KNOX, R. J., MCGOWAN, P. C. Functionalised cyclopentadienyl zirconium compounds as potential anticancer drugs. *Dalton Transaction*. 2008, **39**, 5293–5295.
106. WALLIS, D., CLAFFEY, J., GLEESON, B., HOGAN, M., MÜLLER-BUNZ, H., TACKE, M. Novel zirconocene anticancer drugs? *Journal of Organometallic Chemistry*. 2009, **694**(6), 828–833.
107. GÓMEZ-RUIZ, S., KALUDEROVIĆ, G. N., POLO-CERÓN, D. A novel alkenyl-substituted ansa-zirconocene complex with dual application as olefin polymerization catalyst and anticancer drug. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2009, **694**(18), 3032–3038.
108. KHALID, H., HANIF, M., HASHMI, M., MAHMOOD, T. Copper Complexes of Bioactive Ligands with Superoxide Dismutase Activity. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*. 2013, **13**(13), 1944–1956.
109. LIAN, W.-J., WANG, X.-T., XIE, CH.-Z., TIAN, H. Mixed-ligand copper (II) Schiff base complexes: the role of the co-ligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity. *Dalton Translation*. 2016, **45**(22), 9073–9087.
110. MARZANO, C., GANDIN, V., FOLDA, A., SCUTARI, G., BINDOLI, A., RIGOBELLO, M. P. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology and Medicin*. 2007, **42**(6), 872–881.
111. OTT, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination of Chemistry Reviews*. 2009, **253**(11–12), 1670–1681.
112. ANTONARAKIS, E.S. and EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer of Chemotherapy and Pharmacology*. 2010, **66**(1), 1–9.
113. ALESSIO, E. and MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry. *Molecules*. 1995, **24**(10).
114. ALESSIO E. Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2017, **12**, 1549–1560.
115. BYTZEK, A. K., KOELLENSPERGER, G., KEPPLER, B. K., HARTINGER, C. G. Biodistribution of the novel anticancer drug sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] KP-1339/IT139 in nude BALB/c mice and implications on its mode of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2016, **160**, 250–255.
116. ALLAEDYCE, C. S. and DYSON P.J. Metal-based drugs that break the rules. *Dalton Transaction*. 2016, **45**(8), 3201–3209.
117. TOP, S., VESSIÉRES, A., LECLERCQ, G. Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormonedependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chemistry*. 2003, **9**(21), 5223–5236.

118. JAOUEN, G., TOP, S., VESSIÉRES, A., LECLERCQ, G., MCGLINCHEY, M. J. The first organometallic selective estrogen receptor modulators (SERMs) and their relevance to breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 2004, **11**(18), 2505–2517.
119. HILLARD, E. A., VESSIÉRES, A., JAOUEN, G. Ferrocene functionalized endocrine modulators as anticancer agents. *Medicinal in Organometallic Chemistry*. 2010, **32**, 81–117.
120. BUCK, D. P., ABEYSINGHE, P., M., CULLINANE, C. A., DAY, I., COLLINS, J. G., HARDING, M., M. Inclusion complexes of the antitumour metallocenes Cp<sub>2</sub>MCl<sub>2</sub> (M = Mo, Ti) with cucurbit[n]urils. *Dalton Transitions*. 2008, **7**(17), 2328–2334.
121. ODULATU, A. T., AJIBADE, P., A., MBESE, J. Z. Impact of Molybdenum Compounds as Anticancer Agents. *Bioinorganic Chemistry and Application*. 2019, **2019**, 6416198.
122. BHATTACHARYA, P. T., MISRA, S. R., HUSSAIN, M. Nutritional aspects of essential trace elements in oral health and disease: an extensive review. *Scientifica*. 2016, **2016**, 5464373.
123. REDLICH, K., QUADBECK P., THIEME, M., KIEBACK, B. Molybdenum – A biodegradable implant material for structural applications? *Acta Biomaterialia*. 2020, **104**, 241–251.
124. VRDOLIJAK, V., PRUGOVĚCKI, B., MATKOVÍČ-CALOGOVÍČ, D., NOVAK, P., CINDRÍČ, M. Synthesis and characterization of dinuclear oxomolybdenum(V) complexes with thienyl carboxylate ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2010, **363**(13), 3516–3522.
125. MUKHEEM, A., SHAHABUDDIN, S., AKBAR, N., ANWAR, A., SARIH, N. M., KHAN, N. A., SRIDEWI, N. Fabrication of biopolymer polyhydroxyalkanoate/chitosan and 2D molybdenum disulfide-doped scaffolds for antibacterial and biomedical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, **104**(7), 3121–3131.
126. LUNK, H. and HARTI, H. Discovery, properties and applications of molybdenum and its compounds. *Materials Science*. 2017, **3**, 1218.
127. HADDAD, S. F., ALI, B. F., AL-FAR, R. H., DAWOUD, J. N., ALOMARI, M. I. Density functional theory calculations of pentabromidooxomolybdate(V) anion with 2,2'-bipyridinium cation: comparison between the calculated geometry and the crystal structure determination at 293 and 90K. *Polyhedron*. 2010, **29**(3), 1109–1115.
128. NAIR, M. L. and ANKAMANI, D. Synthesis and characterization of oxomolybdenum (V) and dioxomolybdenum (VI) complexes with schiff base derived from isonicotinoylhydrazide. *Indian Journal of Chemistry*. 2009, **48A**, 1212–1218.
129. TONEY, J. H. and MARKS, T. J. Hydrolysis chemistry of the metallocene dichlorides M( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, M=Ti, V, Zr. Aqueous kinetics, equilibria, and mechanistic implications for a new class of antitumor agents. *Journal of the American Chemical Society*. 1985, **107**(4), 947–953.
130. BALZAREK, C., WEAKLEY, T. J. R., KUO, L. Y. TYLER, D. R. Investigation of the monomer-dimer equilibria of molybdocenes in water. *Organometallic*. 2000, **19**(15), 2927–2931.
131. WAERN, J. B. and HARDING, M. M. Coordination Chemistry of the Antitumor Metallocene Molybdocene Dichloride with Biological Ligands. *Inorganic Chemistry*. 2004, **43**(1), 206–213.
132. ABEYSINGHE, P. M. and HARDING, M. M. Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. *Dalton Transitions*. 2007, **32**, 3474–3482.

133. HARDING, M. M. and MOKDSI, G. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Currunt Medicinal Chemistry*. 2000, **7**(12), 1289–1303.
134. GLEESON, B., CLAFFEY, J., DEALLY, A., HOGAN, M., MÉNDEZ, L. M. M., MÜLLER-BUNZ, H., PATIL, S., WALLIS, D., TACKE, M. Synthesis and cytotoxicity studies of fluorinated derivatives of vanadocene Y. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2009, **2009**(19), 2804-2810.
135. KURIAKOSE, D. and KURU, P. M. R. P.: Mononuclear and binuclear dioxidomolybdenum(VI) complexes of ONO appended aroylhydrazone: Crystal structures, interaction energy calculation and cytotoxicity. *Journal of Molecular Structure*. 2020, **1204**.
136. DINDA, R., PANDA, A., BANERJEE, A., MOHANTY, M., PASAYAT, S., TIEKINK, E. R. T. Investigation of DNA interaction and antiproliferative activity of mixed ligand dioxidomolybdenum(VI) complexes incorporating ONO donor aroylhydrazone ligands. *Polyhedron*. 2020, **183**, 114533.
137. FERNÁNDEZ-GALLARDO, J., ELIE, B. T., SANAÚ, M., CONTEL, M. Versatile synthesis of cationic N-heterocyclic carbene–gold(I) complexes containing a second ancillary ligand. Design of heterobimetallic ruthenium–gold anticancer agents. *Chemical Communication*. 2016, **52**(15), 3155-3158.
138. LI, W. and GUST, R. Update on metal N-Heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016, **329**, 191-213.
139. ALTAF, M., MONIM-UL-MEHBOOB, M., ISAB, A. A., DHUNA, V., BHATIA, G., DHUNA, K., ALTUWAIJRI, S. The synthesis, spectroscopic characterization and anticancer activity of new mono and binuclear phosphane-gold (I) dithiocarbamate complexes. *New Journal of Chemistry*. 2015, **39**, 377-385.
140. BRAUNSTEIN, P., DE MERIC DE BELLEFON, C., OSWALD, B. Carbonylmetalate-induced phosphorus migration and bis(diphenylphosphino)methane (dppm-) assisted synthesis of bimetallic complexes and clusters of palladium and platinum with molybdenum, tungsten, manganese and cobalt. *Inorganic Chemistry*. 1993, **32**(9), 1649-1655.
141. CANO, M., HERAS, J., OVEJERO, P., PINILLA, E., MONGE, A. Heterobimetallic group 6 rhodium complexes: I. Formation of tribridges derivatives [(OC)<sub>3</sub>M(μ-Cl)(μ-CO)(μ-dppm)Rh(NBD)](M= Mo, W) by ring opening of [(OC)<sub>4</sub>M(dppm-PP)]. Crystal structure of [(OC)<sub>3</sub>Mo(μ-Cl)(μ-CO)(μ-dppm)Rh(NBD)]. *Journal of Organometallic Chemistry*. 1991, **410**(1), 101-110.
142. SOLOVIERA, A., VOROTNIKOV, Y. A., TRIFONOVA, K. E., EFREMOVA, O. A., KRASILNIKOVA, A. A., BRYLEV, K. A., VORONTOVA, E. V., AVTOTOV, P. A., SHESTOPALOVA, L. V., POVESHCHENKO, A., MIRONOV, Y., SHESTOPALOV, M. A. Cellular internalisation, bioimaging and dark and photodynamic cytotoxicity of silica nanoparticles doped by {Mo<sub>6</sub>I<sub>8</sub>}<sup>4+</sup> metal clusters: *Journal of Materials Chemistry B*. 2016, **4**(28), 4839–4846.
143. INDRAKUMAR, J. and KORRAPATI, P. S. Steering Efficacy of Nano Molybdenum Towards Cancer: Mechanism of Action. Janani Indrakumar & Purna Sai Korrapati. *Biological Trace of Element Research*. 2020, **194**(1), 121–134.
144. TERPIŁOWSKA, S., SIWICKA-GIEROBA, D., SIWICKI, A. K. Cytotoxicity of iron (III), molybdenum (III), and their mixtures in BALB/3T3 and HepG2 cells. *Journal of Veterinary Research*. 2018, **62**, 527-533.
145. SHEEJA, C. C., AMBALI, A., CHACKO, L., ANEESH, P. M., DIVYA, L. MoS<sub>2</sub> nanoparticles induce behavioral alteration and oxidative stress mediated cellular toxicity

- in the social insect *Oecophylla smaragdina*. *Journal of Hazardous Materials*. 2020, **385**, 121624.
146. BAHARUM, H., CHU, W. C., TEO, S. S., NG, K. Y., RAHIM, R. A., HO, C. L. Molecular cloning, homology modeling and site-directed mutagenesis of vanadium-dependent bromoperoxidase (GcVBPO1) from *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *Phytochemistry*. 2013, **92**(49-59), 49–59.
147. CRANS, D. C., AMIN, S. S., KERAMIDAS, A. D. Vanadium in the environment. Chemistry and Biochemistry, Part I, Wiley, New York, 1988. ISBN: 978-0-471-17778-4.
148. STANKIEWICZ, P. J. and TRACEY, A. S. Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes. *Metal Ions in Biological System*. 1995, **31**, 287–324.
149. KIOSEIGLOU, E., PETANIDIS, S., GABRIEL, C., SALIFOGLU, A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015, **301-302**, 87-105.
150. CRANS, D. C., SMEE, J. J., GAIDAMAUSKAS, E., YANG, L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*. 2004, **104**(2), 849–902.
151. CUESTA, S., FRANCÉS, D., GARCÍA, G. B. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011, **33**(2), 297–302.
152. XIE, M., CHEN, D. CH., ZHANG, F., WILLSKY, G. R., CRANS, D. C., DING, W. Effects of vanadium (III, IV, V)-chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2014, **136**, 47-56.
153. KACEW, S., PARULEKAR, M. R., MERALI, Z. Effects of parenteral vanadium administration on pulmonary metabolism of rats. *Toxicology Letters*. 1982, **11**(1-2), 119–124.
154. LU, J., TAN, M., CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*. 2015, **356**(2), 156-164.
155. SRIVASTAVA, S., KUMAR, N., ROY, P. Role of ERK/NFκB in vanadium (IV) oxide mediated osteoblast differentiation in C3H10t1/2 cells. *Biochemistry*. 2014, **101**, 132–144.
156. CASTALDI, L., SERRA, C., MORETTI, F., MESSINA, G., PAOLETTI, R., SAMPAOLESI, M., TOR-GOVNICK, A., BAIOCCHI, M., PADULA, F., PISANIELLO, A., MOLINARO, M., COSSU, G., LEVRERO, M., BOUCHÉ, M. Bisperoxovanadium, a phospho-tyrosine phosphatase inhibitor, reprograms myogenic cells to acquire a pluripotent, circulating phenotype. *FASEB Journal*. 2007, **21**(13), 3573–3583.
157. ZHANG, Y. L., WANG, X. S., FANG, W., CAI, X. Y., LI, H. Z., MAO, J. W., JIN, X. B., BAI, Y. L., LU, J. Z. In vitro study of the cytotoxicities of two mixed-ligand oxovanadium complexes on human hepatoma cells. *Pharmazie*. 2013, **68**(10), 827–834.
158. ANGELOS, M. and EVANGELOU, M. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*. 2002, **42**(3), 249-265 74.
159. LEON, I. E., PORRO, V., DI VIRGILIO, A. L., NASO, L. G. Williams, P. A., Bollati-Fogolin, M., Etcheverry, S. B., Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014, **19**(1), 59–74.

160. GONCALVES, A. P., VIDEIRA, A., SOARES, P., MÁXIMO, V. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Science*. 2011, **89**(11-12), 371–377.
161. MARKOPOULOU, S., KONTARGIRIS, E., BATSI, C., TZAVARAS, T., TROUGAKOS, I., BOOTH-MAN, D. A., GONOS, E. S., KOLETTAS, E. Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. *FEBS Journals*. 2009, **276**(14), 3784–3799.
162. AJEAWUNG, N. F., FAURE, R., JONES, C., KAMNASARAN, D. Preclinical evaluation of dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate V for the treatment of pediatric low-grade gliomas. *Future Oncology*. 2013, **9**(8), 1215–1229 773.
163. WU, Y., MA, Y., XU, Z., WANG, D., ZHAO, B., PAN, H., WANG, J., XU, D., ZHAO, X., PAN, S., LIU, L., DAI, W., JIANG, H. Validation of residual SYNTAX score with second-generation drug-eluting stents: one-year results from the prospective multicentre SEEDS study. *EuroIntervention*. 2014, **10**(1), 65–73.
164. PETANIDIS, S., KIOSEOGLU E., HADZOPOULOU, M. C., SALIFOGLOU, A. In vitro and ex vivo vanadium antitumor activity in (TGF- $\beta$ )-induced emt. Synergistic activity with carboplatin and correlation with tumor metastasis in cancer patients. *Cancer Lettets*. 2016, **74**, 121–134.
165. ZHOU, W., MIAO, Y., ZHANG, Y., LIU, L., LIN, J., YANG XIE, J. Y., WEN, L. Induction of cyto-protective autophagy by paramontroseite VO<sub>2</sub> nanocrystals. *Nanotechnology*. 2013, **24**(16), 9.
166. MOLINUEVO, M. S., CORTIZO, A. M., ETCHEVERRY, S. B. Vanadium (IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2008, **61**(5), 767–773.
167. QUATTROCELLI, M., PALAZZOLO, G., AGNOLIN, I., MARTINO, S., BOUCHÉ, M., ANASTASIA, L., SAMPAOLESI, M. Synthetic sulfonyl-hydrazone-1 positively regulates cardiomyogenic microRNA expression and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011, **112**(8), 2006–2014.
168. FREZZA, M., HINDO, S., CHEN, D., DAVENPORT, A., SCHMITT, S., TOMCO, D., DOU, Q. P. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, **16**(16), 1813–1825.
169. GHOSH, P., D'CRUZ, O. J., NARLA, R. K., UCKUN, F. M. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000, **6**(4), 1536-1545.
170. HONZÍČEK, J., KLEPALOVÁ, I., VINKLÁREK, J. Synthesis, characterization and cytotoxic effect of ring-substituted and ansabridged vanadocene complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 2011, **373**(1), 1–7.
171. GLEESON, B., CLAFFEY, J., HOGAN MÜLLER-BRUNZ, H., WALLIS, D., TACKE, M. Novel benzyl-substituted vanadocene anticancer drugs. *Journal of Inorganic Chemistry*. 2009, **694**(9-10), 1369-1374.
172. GLEESON, G., HOGAN, M., MÜLLER-BUNZ, H., TACKE, M. Synthesis and preliminary cytotoxicity studies of indole-substituted vanadocenes. *Transition Metals Chemistry*. 2010, **35**, 973-983.
173. LEBHOHO, T. C., MICHAEL, J. P., VAN OTTERLO, W. A., VAN VUUREN, S. F., DE KONING, C. B. The synthesis of 2- and 3-aryl indoles and 1,3,4,5-tetrahydropyrano[4,3-b]indoles and their antibacterial and antifungal activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 2009, **19**(17), 4948-4951.

174. KIOSEOGLOU, E., PETANIDIS, S., GABRIEL, C., SALIFOGLU, A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015, **301-302**, 87-105.
175. REHDER D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*. 2012, **4**(14), 1823–1837.
176. RAY, R. S., GHOSH, B., RANA, A., CHATTERJEE, M. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *International Journal of Cancer*. 2007, **120**(1), 13–23.
177. GHOSH, P., KOTCHEVAR, A. T., DUMEZ, D. D., GHOSH, S., PEITERSON, J., UCKUN, F. M. Synthesis and structure of bis( $\pi$ -cyclopentadienyl)vanadium(IV) 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine compounds and their interactions with artificial membranes. *Inorganic Chemistry*. 1999, **38**(16), 3730–3737.
178. SHAVER, A., NG, J. B., HALL, D. A., LUM, B. S., POSNER, B. I. Insulin mimetic peroxovanadium complexes: preparation and structure of potassium oxodiperoxo(pyridine-2-carboxylato)vanadate(V),  $K_2[VO(O_2)_2(C_5H_4NCOO)] \cdot 2H_2O$ , and potassium oxodiperoxo(3-hydroxypyridine-2-carboxylato)vanadate(V),  $K_2[VO(O_2)_2(OHC_5H_3NCOO)] \cdot 3H_2O$ , and their reactions with cysteine. *Inorganic Chemistry*. 1993, **32**(14), 3109–3113.
179. DJORDJEVIC, C. Antitumor activity of vanadium compounds. *Metals Ions in Biological System*. 1995, **31**, 595–616.
180. LEÓN, I. E., ETCHEVERRY, S. B., PARAJÓN-COSTA, B. S., BARAN, E. J. Bis(oxalato)dioxovanadate(V) and bis(oxalato)oxoperoxo-vanadate(V) complexes: spectroscopic characterization and biological activity. *Biological Trace Elements Research*. 2013, **155**(2), 295–300.
181. ANDREZALOVA, L., GBELCOVA, H., DURACKOVA, Z. DNA damage induction and antiproliferative activity of vanadium(V) oxido monoperoxido complex containing two bidentate heteroligands. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology*. 2013, **27**(1), 21–26.
182. GABRIEL, C., KALIVA, M., VENETIS, I., BARAN, P., RODRIGUEZ-ESCUADERO, I., VOYIATZIS, G., ZERVOU, M., SALIFOGLU, A. Electron transfer in metal-dioxygen adducts. *Inorganic Chemistry*. 2009, **48**, 476–487.
183. JELIKIĆ-STANKOVA, M., USKOKOVIĆ-MARKOVIĆ, S., HOLCLAJTNER-ANTUNOVIĆ, I., TODOROVIĆ, M., DJURDJEVIĆ, P., TRACE, J. Compounds of Mo, V and W in biochemistry and their biomedical activity. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology*. 2007, **21**(1), 8–16.
184. ZHAI, F., WANG, X., LI, D., ZHANG, H.E., LI, R., SONG, L. Synthesis and biological evaluation of decavanadate  $Na_4Co(H_2O)_6V_{10}O_{28} \cdot 18H_2O$ . *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2009, **63**(1), 51-55.
185. LI, Y. T., ZHU, C. Y., WU, Z. Y., JIANG, M., YAN, C. W. Synthesis, crystal structures and anticancer activities of two decavanadate compounds. *Transitional Metal Chemistry*. 2010, **35**, 597–603.
186. ABAKUMOVA, O. Y., PODOBED, N. O. V., BELAYEVA, F., TOCHILKIN, A. I. Anticancer activity of oxovanadium compounds. *Biomeditsinskaia khimiia*. 2013, **59**(3), 305–320.
187. ROY, S., BÖHME, M., DASH, S. P., MOHANTY, M., BUCHHOLZ, A., PLASS, W., MAJUMDER, S., KULANTHAIVEL, S., BANERJEE, I., REAUTER, H., KAMINSKY, W., DINDA, R. Anionic dinuclear oxidovanadium(IV) complexes with azo functionalized tridentate ligands and  $\mu$ -ethoxido bridge leading to an unsymmetric twisted arrangement: Synthesis, x-ray structure, magnetic properties, and cytotoxicity. *Inorganic Chemistry*. 2018, **57**(10), 5767-5781.

188. GU, Y., JU, C., LI, Y., SHANG, Z., WU, Y., JIA, Y., IU, Y. Detection of circulating tumor cell in prostate cancer based on carboxylated graphene oxide modified light addressable potentiometric sensor. *Biosensors Bioelectronics*. 2015, **66**, 24–31.
189. YAO, Y. and XUE, Y. Impedance analysis of quartz crystal microbalance humidity sensors based on nanodiamond/graphene oxide nanocomposite film. *Sensors and Actuators B Chemical*. 2015, **211**, 52–58.
190. MUDAVATH, S. L., TALAT, M., RAI, M., SRIVASTAVA, O. N., SUNDAR, S. Characterisation and evaluation of amine modified graphene amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis: in vivo and in vitro studies. *Drug Design and Development Therapy*. 2014, **8**, 1235–1247.
191. PRAJAPATI, V. K., AWASTHI, K., YADAV, T. P., RAI, M., SRIVASTAVA, O. N., SUNDAR, S. An oral formulation of amphotericin B attached to functionalized carbon nanotube is an effective treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2012, **205**(2), 333–336.
192. LIM, H. N., HUANG, N. M., LIM, S. S., HARRISON, I., CHIA, C. H. Fabrication and characterization of graphene hydrogel via hydrothermal approach as a scaffold for preliminary study of cell growth. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, **6**, 1817–1823.
193. SHIN, S. R., AGHAEI-GHAREH-BOLAGH, B., GAO, X., NIKKHAH, M., JUNG, S. M., DOLATSHAHI-PIROUZ, A., KIM, S. B., KIM, S. M., DOKMECI, M. R., TANG, X. S., KHADEMHOSEINI, A. Layer-by-layer assembly of 3d tissue constructs with functionalized graphene. *Advanced Functional Materials*. 2014, **24**(39), 6136–6144.
194. NGUYEN, P. and BERRY, V. Graphene interfaced with biological cells: opportunities and challenges. *Journal of Physical and Chemistry Letters*. 2012, **3**(8), 1024–1029.
195. LIU, J., CUI, L., LOSIC, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia*. 2013, **9**(12), 9243–9257.
196. LIANGZHU, F. and ZHUANG, L. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges, *Nanomedicine*. 2011, **6**(2).
197. ALLEN, M. J., TUNG, V. C., KANER, R. B. Honeycomb carbon: a review of graphene, *Chemical Reviews*. 2010, **110**(1), 132–145.
198. DREYER, D. R., PARK, S., BIELAWSKI, C. W., RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide, *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(1), 228–240.
199. PARK, W., HU, J., JAUREGUI, L. A., RUAN, R., CHEN, Y. P. Electrical and thermal conductivities of reduced graphene oxide/polystyrene composites, *Applied Physics Letters*. 2014, **104**, 1131-01.
200. SMOLKOVA, B., YAMANI, N. E., COLLINS, A. R., GUTLEB, A. C., DUSINSKA, M. Nanoparticles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **77**, 64–73.
201. GEIM, A. K. and NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. *Nature Materials*. 2007, **6**(3), 183–19.
202. PINTO, A. M., MOREIRA, S., GONÇALVES, I. C., GAMA, F. M., MENDES, A. M., MAGALHÃES, F. D. Biocompatibility of poly(lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Colloids Surfaces B*. 2013, **104**, 229–238.
203. RUIZ, O. N., FERNANDO, K. A., WANG, B., BROWN, N. A., LUO, P. G., MCNAMARA, N., D., VANGSNESS, M., SUN, Y., BUNKER, C. E. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano*. 2011, **5**(10), 8100–8107.
204. SASIDHARAN, A., PANCHAKARLA, L. S., SADANANDAN, A. R., ASHOKAN, A., CHANDRAN, P., GIRISH, C. M., MENON, D., NAIR, S. V., RAO, C. N. R., KOYAKUTT, M. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small*. 2012, **8**(8), 1251–1263.

205. YANG, K., ZHANG, S., ZHANG, G., SUN, X., LEE, S. T., LIU, Z. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Letters*. 2010, **10**(9), 3318–3323.
206. LIAO, K. H., LIN, Y. S., MACOSKO, C. W., HAYNES, C. L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2011, **3**(7), 2607–2615.
207. MU, Q., SU, G., LI, L. Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2012, **4**(4), 2259–2266.
208. FAN H., WANG J., WU H. Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites. *Biomacromolecules*. 2010, **11**(9), 2345–2351.
209. NALVURAN, H., ELCIN, A. E., ELCIN, Y. M. Nanofibrous silk fibroin/reduced graphene oxide scaffolds for tissue engineering and cell culture applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **114**, 77–84.
210. FENG L. and LIU Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*. 2011, **6**(2), 317–324.
211. TAS, A. and CAKMAK, N. K. Synthesis of PEGylated nanographene oxide as a nanocarrier for docetaxel drugs and anticancer activity on prostate cancer cell lines. *Human and Experimental Toxicology*. 2020, **40**(1), 172–182.
212. AHLUWALIA, A., BORASCHI, D., BYRNE, H. J., FADEEL, B., GEHR, P. The bio-nano interface as a basis for predicting nanoparticle fate and behavior in living organisms: towards grouping and categorizing of nanomaterials and nanosafety by design. *Bio-Nano Materials*. 2013, **14**, 195–216.
213. LIU, Y., LUO, Y., WU, J. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis. *Scientific Reports*. 2013, **3**, 3469.
214. XIONG, H., GUO, Z., ZHANG, W., ZHONG, H., LIU, S., JI, Y. Redox-responsive biodegradable PEGylated nanographene oxide for efficiently chemo-photothermal therapy: a comparative study with non-biodegradable PEGylated nanographene oxide. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2014, **138**, 191–201.
215. ZHOU, K., ZHU, Y., YANG, X., LI, C. One-pot preparation of graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composites by a solvothermal reaction. *New Journal of Chemistry*. 2010, **34**, 2950–2955.
216. LIU, H. W., HU, S. H., CHEN, Y. W., CHEN, S. Y. Characterization and drug release behavior of highly responsive chip-like electrically modulated reduced graphene oxide poly(vinyl alcohol) membranes. *Journal of Material Chemistry*. 2012, **22**, 17311–17320.
217. YANG, X. Y., ZHANG, X. Y., LIU, Z. F., MA, Y. F., HUANG, Y., CHEN, Y. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *Journal of Physical Chemistry C*. 2008, **112**(45), 17554–17558.
218. DEPAN, D., SHAH, J., MISRA, R. D. K. Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: synthesis, loading efficiency, and drug release response. *Materials Science and Engineering: C*. 2011, **31**(7), 1305–1312.
219. BAI, H., LI, C., WANG, X. L., SHI, G. Q. A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel. *Chemical Communication*. 2010, **46**(14), 2376–2378.
220. ZHAO, X., YANG, L., LI, X. Functionalized graphene oxide nanoparticles for cancer cell specific delivery of antitumor drug. *Bioconjugate Chemistry*. 2015, **26**(1), 128–136.

221. LU, Y. J., YANG, H. W., HUNG, S. C. Improving thermal stability and efficacy of BCNU in treating glioma cells using PAA functionalized graphene oxide. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, **7**, 1737–1747.
222. ZHU, L., CHANG, D. W., DAI, L., HONG, Y. DNA damage induced by multi-walled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cell. *Nano Letters*. 2007, **7**, 3592–2597 4021.
223. YUE, H., WEI, W., YUE, Z. The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*. 2012, **33**(16), 4013–4021.
224. ZHANG, L., XIA, J., ZHAO, Q., LIU, L., ZHANG, Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*. 2010, **6**(4), 537–544.
225. ZHI, F., DONG, H., JIA, X. Functionalized graphene oxide mediated adriamycin delivery and miR-21 gene silencing to overcome tumor multidrug resistance in vitro. *Plos One*. 2013, **8**(3), 60034.
226. VINKLÁREK, J., HURYCHOVA, H., HONZÍČEK, J., ŠEBESTOVÁ, L., PADĚLKOVA, Z., ŘEZAČOVÁ, M. Can Substitution of Chlorides Enhance the Cytotoxicity of Vanadocene Dichloride? *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2013, **2013**(14), 2665–2672.
227. HONZÍČEK, J., VINKLÁREK, J., PADĚLKOVA, Z., ŠEBESTOVÁ, L., FOLTÁNOVÁ, K., ŘEZAČOVÁ, M.: The effect of substitution on the cytotoxicity of molybdenum(II) and tungsten(II) compounds. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2012, **716**, 258–268.
228. MRÓZEK, O., ŠEBESTOVÁ, L., VINKLÁREK, J., ŘEZAČOVÁ, M., EISNER, A., RŮŽIČKOVÁ, Z., HONZÍČEK, J. Highly Water-Soluble Cyclopentadienyl and Indenyl Molybdenum(II) Complexes – Second Generation of Molybdenum-Based Cytotoxic Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2016, **2016**(4), 519–529.
229. ŠEBESTOVÁ, L. *Cytotoxická aktivita organokovových komplexů přechodných kovů V, Nb a Mo*. Pardubice, 2014. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Katedra chemie a biologie. Vedoucí diplomové práce Jaromír Vinklárek.
230. ŠEBESTOVÁ, L., HAVELEK, R., ŘEZAČOVÁ, M., HONZÍČEK, J., KROČOVÁ, Z., VINKLÁREK, J. Study of antitumor effect of selected vanadium and molybdenum organometallic complexes in human leukemic T-cells. *Chemical and Biological Interaction*. 2015, **242**, 61–70.
231. FOSTER, K. A., OSTER, C. G., MAYER, M. M., AVERY, M. A., AUDUS, K. L. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. 1998, **243**(2), 359–366.
232. TAYLOR, E. T., WALKER, E. M., BARTELT, M., DAY, S., PAPPAS, A. A. In vitro antimicrobial activity of diethyldithiocarbamate and dimethyldithiocarbamate against methicillin-resistant *Staphylococcus*, *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1987, **17**(3), 171–177.
233. MANOUSSAKIS, G., BOLOS, C., ECATERINIADOU, L., SARRIS, C. Synthesis, characterization and anti-bacterial studies of mixed-ligand complexes of dithiocarbamate—thiocyanato and iron(III), nickel(II), copper(II) and zinc(II) Synthèse, caractérisation et étude anti-bactérienne du complexe de Fe(III), Ni(II), Cu(II) et Zn(II) avec des ligands mixtes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1987, **22**(5), 421–425.
234. GHOSH, P., GHOSH, S., D'CRUZ O. J., UCKUN, F. M. Structural and biological characterization of a novel spermicidal vanadium(IV) complex: bis(pi-cyclopentadienyl)-N,N-diethyl dithiocarbamate vanadium(IV) tetrafluoro borate, [VCp2(DeDtc)](BF4). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1998, **72**(1), 89–98.

235. D'CRUZ, O. J. and UCKUN, F. M. Vaginal contraceptive activity of a chelated vanadocene. *Contraception*. 2005, **72**(2), 146–156.
236. D'CRUZ, O. J. and UCKUN, F. M. Intravaginal toxicity studies of a gel-microemulsion formulation of spermicidal vanadocenes in rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001, **170**(2), 104–112.
237. MELOUNKOVÁ, L., MACHÁLKOVÁ, A., HAVELEK, R., HONZÍČEK, J., ŘEZÁČOVÁ, M., CÍSAŘOVÁ, I., PETEROVÁ, E., VINKLÁREK, J. Vanadocene complexes bearing N,N'-chelating ligands: Synthesis, structures in vitro cytotoxic studies on the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019, **195**, 182-193.
238. ŠEBESTOVÁ, L., VINKLÁREK, J., HONZÍČEK, V., RŮŽIČKOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ, M. Synthesis, characterization and cytotoxic effect of vanadocene complexes bearing substituted 2,2'-bipyridines and 4,5-diazafluoren-9-one. *Inorganica Chimica Acta*. 2015, **427**, 211-218.
239. HONZÍČKOVÁ, I., VINKLÁREK, J., RŮŽIČKOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ, M., HONZÍČEK, J. Modified cyclopentadienyl molybdenum compounds with enhanced cytotoxic activity towards MOLT-4 leukaemia cells. *Applied Organometallic Chemistry*. 2017, **31**(11), 3759.
240. CHORоба, K., MACHURA, B., RAPOSO, L. R., MALECKI, J. G., KULA, S., PAJAK, M., ERFURK, K., MORÓN, A. M., FERNANDES, A. R. Platinum(II) complexes showing high cytotoxicity toward A2780 ovarian carcinoma cells. *Dalton Transaction*. 2019, **48**(34), 13081-13093.
241. GABANO, E., RAVERA, M., PERIN, E., ZANELLATO, I., RANGONE, B., MCGLINCHEY, M. J., OSELLA, D. Synthesis and characterization of cyclohexane-1R,2R-diamine-based Pt(IV) dicarboxylato anticancer prodrugs: their selective activity against human colon cancer cell lines. *Dalton Transaction*. 2019, **48**(2), 435-445.
242. SAMPER, K. G., MARKER, S. C., BAYÓN, P., MACMILLAN S. N., KERESZTES, I., PALACIOS, Ó., WILSON, J. J. Reprint of "Anticancer activity of hydroxy- and sulfonamide-azobenzene platinum(II) complexes in cisplatin-resistant ovarian cancer cells". *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017, 335-343.
243. CHEN, J., SOLOMIDES, C., PAREKH, H., SIMPKINS, F., SIMPKINS, H. Cisplatin resistance in human cervical, ovarian and lung cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2015, **75**(6), 1217-1227.
244. ADAMS, J. M. and CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion Immunology*. 2007, **19**(5), 488-496.
245. VINKLÁREK, J., HONZÍČEK, J., HOLUBOVÁ, J. Inclusion compounds of cystostatic active  $(C_5H_5)_2VCl_2$  and  $(CH_3C_5H_4)_2VCl_2$  with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrines: Synthesis, EPR study and microbiological behavior toward *Escherichia coli*. *Central European Journal of Chemistry*. 2005, **3**(1), 72–81.
246. HONZÍČKOVÁ, I., HONZÍČEK, J., VINKLÁREK, V., PADĚLKOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠEBESTOVÁ, L. Ring-functionalized niobocene complexes. *Applied Organometallic Chemistry*. 2014, **28**(14), 252-258.
247. HONZÍČEK, J., VINKLÁREK, J., ERBEN, M., PADĚLKOVÁ, Z., ŠEBESTOVÁ, L., ŘEZÁČOVÁ, M. Tetrafluoro-4-pyridyl substituted cyclopentadienyl molybdenum(II) compounds. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2014, **749**, 387-393.
248. KLEPALOVÁ, I., HONZÍČEK, J., VINKLÁREK, J., PADĚLKOVÁ, Z., ŠEBESTOVÁ, L., ŘEZÁČOVÁ, M. Vanadocene and niobocene dihalides containing electron-withdrawing substituents in the cyclopentadienyl rings: Synthesis, characterization and cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta*. 2013, **402**, 109-115.

249. KNOX, R. J., FRIEDLOS, F., LYDALI, D. A., ROBERTS, J. J. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Research*. 1986, **46**(4), 1972–1979.
250. ŘEZNÍČEK, T., DOSTÁL, L., RŮŽIČKA, A., VINKLÁREK, J., ŘEZÁČOVÁ, M., JAMBOR, R. Synthesis and cytostatic activity of Pt(II) complexes of intramolecularly coordinated phosphine and stibine ligands. *Applied Organometallic Chemistry*. 2012, **26**(5), 237–245.
251. GONZÁLEZ-PANTOJA, J. F., STERN, M., JARZECKI, A. A., ROYO, E., ROBLES-ESCAJEDA, E., VALERA-RAMÍREZ, A., AGUILERA, J. A., CONTEL, M. Titanocene-Phosphine Derivatives as Precursors to Cytotoxic Heterometallic TiAu<sub>2</sub> and TiM (M = Pd, Pt) Compounds. Studies of Their Interactions with DNA. *Inorganic Chemistry*, 2011, **50**, 11099–11110.
252. MUNCHAUSEN, L. L. and RAHN, R. O. Physical studies on the binding of cis dichlorodiamine platinum(II) to NA and homopolynucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1975, **414**(3), 242–255.
253. EGGER, A. E., HARTINGER, C. G., HAMIDANE, H. B., TSYBIN, Y. O., KEPPLER, B. K., DYSON, P. J. High resolution mass spectrometry for studying the interactions of cisplatin with oligonucleotides. *Inorganic Chemistry*. 2008, **47**(22), 10626–10633.
254. FUERTES, M. A., ALONSO, C., PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical Reviews*. 2003, **103**(3), 645–662.
255. TIMERBAEV, A. R., HARTINGER, C. G., ALEKSENKO, S. S., KEPPLER, B. K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chemical Reviews*. 2006, **106**(6), 2224–2248.
256. SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003, **22**(47), 7265–7279.
257. CEPEDA, V., FUERTES, M. A., CASTILLA, J., ALONSO, C., QUEVEDO, C., PÉREZ, J. M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2007, **7**(1), 3–18.
258. HAMDI, M., POPEIJUS, H. E., CARLOTTI, F., JANSSEN, J. M., VAN DER BURGT, C., CORNELISSEN-STEIJGER, P., VAN DEWATER, B., HOEBEN, R. C., MATSUO, K., VAN DAM, H. ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. *DNA Repair*. 2008, **7**(3), 487–496.
259. LU, D., CHEN, J., HAI, T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *The Biochemical Journal*. 2007, **401**(2), 559–567.
260. MANIC, S., GATTI, L., CARENINI, N., FUMAGALLI, G., ZUNINO, F., PEREGO, P. Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: role of p53 and DNA mismatch repair. *Current Cancer Drug Targets*. 2003, **3**(1), 21–29.
261. SEDLETSKA, Y., GIRAUD-PANIS, M. J., MALINGE, J. M. Cisplatin is a DNA damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*. 2005, **5**, 251–265.
262. SCHWEYER, S., SORUR, I. A., HEINTZE, A., RADZUN, H. J., FAYYAZI, A. The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines. *International Journal of Oncology*. 2004, **25**, 1671–1676.
263. LI, L., KEATING, M. J., PLUNKETT, W., YANGET, L. Y. Fludarabine-mediated repair inhibition of cisplatin-induced DNA lesions in human chronic myelogenous

- leukemia-blast crisis K562: induction of synergistic cytotoxicity independent of reversal of apoptosis resistance. *Molecular Pharmacology*. 1997, **52**(5), 798–806.
264. WOLF, D. and ROTTER, V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1985, **82**, 790-794.
265. KANG, M. H., SMITH, M. A., MORTON, C. L., KESHELAVA, N., HOUGHTON, P. J., REYNOLDS, C. P. National Cancer Institute pediatric preclinical testing program: model description for in vitro cytotoxicity testing. *Pediatric Blood Cancer*. 2011, **56**(2), 239-249.
266. HIRSCH, F. R., SCAGLIOTTI, G. V., MULSHINE, J. L., KWON, R., CURRAN, W. J., WU, Y. L., PAZ-ARES, L. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017, **389**(10066), 299–311.
267. CHALELA, R., CURUL, L. V., ENRIQUEZ, C., PIJUAN, L., BELLOSILLO, B., GEA, J. Lung adenocarcinoma: From molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. *Journal of Thoracic Disease*. 2017, **9**(7), 2142–2158.
268. BROZOVIC, A. and OSMAK, M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Letters*. 2007, **251**(1), 1–16.
269. STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007, **63**(1), 12–31.
270. GERMAIN, S. T., NIKNEJAD, N., LAURIE, M. L., GARBUIO, K., HAI, T., DIMITROULAKOS, J. Cisplatin Induces Cytotoxicity through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Activating Transcription Factor 31. *Neoplasia*. 2010, **12**(7), 527 – 538.
271. TAPIA, G. and DIAZ-PADILLA I. Molecular mechanisms of platinum resistance in ovarian cancer. Iván Díaz-Padilla, book editor. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*. 2013, **10**.
272. XUE, Z. Q., LIN, M., ZHU, J., ZHANG, J., LI, Y. Z., GUO, Z. Platinum(II) compounds bearing bone-targeting group: synthesis, crystal structure and antitumor activity. *Chemical Communication*. 2010, **46**(8), 1212-1214.
273. ZUTPHEN, S. V. and REEDIJK, J. Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. *Coordination Chemistry Reviews*. 2005, **249**(24), 2845-2853.
274. SASANELLI, R., BOCCARELLI, A., GIORDANO, D., LAFORGIA, M., ARNESANO, F., NATILE, G., CARDELLICCHIO, C., CAPOZZI, M. A., COLUCCIA, M. Platinum complexes can inhibit matrix metalloproteinase activity: platinum-diethyl[(methylsulfinyl)methyl]phosphonate complexes as inhibitors of matrix metalloproteinases 2, 3, 9, and 12. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, **50**(15), 3434-3441.
275. BOSE, R. N., MAURMANN, L., MISHUR, R. J., YASUI, L., GUPTA, S., GRAYBURN, W. S., HOFSTETTER, H., SALLEY, T. Non-DNA-binding platinum anticancer agents: Cytotoxic activities of platinum-phosphato complexes towards human ovarian cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(47), 18314-18319.
276. BERNERS-PRICE, S. J. and SADLER, P. J. Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. *Bioinorganic Chemistry*. 1988, **70**, 27–102.
277. YILMAYZ, V. T., ICSEL, C., TURGUT, O. R., AYGUN, M., ERKISA, M., TURDEMIR, M. H., ULUKAYA, E. Synthesis, structures and anticancer potentials of platinum(II) saccharinate complexes of tertiary phosphines with phenyl and cyclohexyl

- groups targeting mitochondria and DNA. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **155**, 609-622.
278. KRÁLOVEC, K., MELOUNKOVÁ, L., SLOVÁKOVÁ, M., MANNOVÁ, N., SEDLÁK, M., BARTÁČEK, J. HAVELEK, R. Disruption of Cell Adhesion and Cytoskeletal Networks by Thiol-Functionalized Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(24), 9350.