

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ORGANOKOVOVÉ KOMPLEXY – CYTOTOXICKÉ ÚČINKY NA BUŇKY OVARIÁLNÍCH KARCINOMŮ

Organometallic complexes – cytotoxic effects on ovarian
carcinoma cells

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Urbánková Rathouská, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eva Peterová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2025

Bc. Kateřina Hrabalová

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala konzultantce Mgr. Evě Peterové, Ph.D. za možnost vypracovat svoji diplomovou práci na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové, dále také za odborné vedení práce, cenné rady při vypracovávání a za vstřícný přístup po celou dobu naší spolupráce. Velice děkuji i své vedoucí PharmDr. Janě Urbánkové Rathouské, Ph.D. za obrovskou ochotu, odborný dohled a poskytnuté připomínky. Nemalé poděkování patří také paní laborantce Petře Kazimírové za veškerou její pomoc při experimentální části a v neposlední řadě i panu doc. Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D. z Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí testovaných komplexů.

Rovněž bych na tomto místě chtěla srdečně poděkovat rodině a všem blízkým za podporu během celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 2025

Bc. Kateřina Hrabalová

OBSAH

1. ABSTRAKT	7
2. ABSTRACT	9
3. POUŽITÉ ZKRATKY	11
4. ÚVOD.....	14
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	15
6. TEORETICKÁ ČÁST	16
6.1 Ovariální karcinomy.....	16
6.1.1 Základní charakteristika onemocnění	16
6.1.2 Histopatologická klasifikace	16
6.1.3 Etiopatogeneze	19
6.1.3.1 Dědičnost	20
6.1.3.2 Další rizikové faktory.....	21
6.1.3.3 Protektivní faktory	22
6.1.4 Epidemiologie	22
6.1.5 Symptomy.....	24
6.1.6 Diagnostika	25
6.2 Léčba ovariálních karcinomů	27
6.2.1 Chirurgická léčba	27
6.2.2 Chemoterapie	28
6.2.3 Radioterapie	30
6.2.4 Cílená léčba.....	30
6.2.4.1 Antiangiogenní léčba	30
6.2.4.2 PARP inhibitory	31
6.2.4.3 Imunoterapie	32

6.2.4.4	Hormonální léčba.....	33
6.3	Rezistence nádorových buněk na cisplatinu.....	34
6.3.1	Cisplatinu	34
6.3.2	Mechanismy rezistence	35
6.4	Karcinomy a organokovové komplexy	37
6.4.1	Ruthenium	38
6.4.2	Osmium	39
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
7.1	Testované organokovové komplexy	40
7.2	Buněčné linie	41
7.2.1	A2780.....	41
7.2.2	A2780cis.....	41
7.2.3	Kultivace	41
7.2.4	Pasážování	42
7.2.5	Počítání buněk.....	42
7.2.6	Mikroskopie	43
7.3	Stanovení viability a proliferace buněk pomocí WST-1 testu.....	43
7.3.1	Princip WST-1 testu	43
7.3.2	Pracovní postup pro WST-1 test.....	43
7.3.3	Statistická analýza WST-1 testu.....	45
7.4	Stanovení viability a proliferace buněk mikroskopicky.....	45
7.4.1	Princip stanovení viability (mikroskopicky)	45
7.4.2	Pracovní postup pro stanovení viability (mikroskopicky)	45
7.4.3	Výpočet doubling time buněk	47
7.5	Stanovení aktivity laktátdehydrogenasy.....	47
7.5.1	Princip stanovení aktivity laktátdehydrogenasy	47
7.5.2	Pracovní postup pro stanovení aktivity laktátdehydrogenasy.....	48

7.6	Stanovení aktivity kaspas 3/7, 8 a 9.....	50
7.6.1	Apoptóza a kaspasy	50
7.6.2	Princip stanovení aktivity kaspas.....	51
7.6.3	Pracovní postup pro stanovení aktivity kaspas	51
7.7	Statistické vyhodnocení dat	53
8.	VÝSLEDKY.....	54
8.1	Mikroskopie buněk A2780 a A2780cis	54
8.2	Stanovení IC₅₀	55
8.3	Viabilita (mikroskopicky).....	58
8.4	Aktivita laktátdehydrogenasy	59
8.5	Aktivita kaspas 3/7, 8 a 9	62
9.	DISKUSE	64
10.	ZÁVĚR.....	69
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	70
12.	SEZNAM TABULEK.....	71
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	72
14.	POUŽITÁ LITERATURA	73

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: Bc. Kateřina Hrabalová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Urbánková Rathouská, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eva Peterová, Ph.D.

Název: Organokovové komplexy – cytotoxické účinky na buňky ovariálních karcinomů

Úvod a cíl práce: Epiteliální ovariální karcinomy, jakožto nejběžněji se vyskytující malignita postihující vaječníky, jsou v současnosti stále velkou terapeutickou výzvou. Je to dáno nespecifickými symptomy, pozdní diagnostikou, velmi vysokým procentem mortality a špatnou prognózou. Stav pacientek také negativně ovlivňuje častý výskyt rekurentních forem onemocnění, který provází rezistence nádorových buněk na konvenční chemoterapii, jako je cisplatina. Všechny uvedené faktory spolu úzce souvisejí a je zřejmé, že ovariální karcinomy představují problém jak zdravotnický, tak i sociální. Z toho vyplývá potřeba zavádět nové možnosti terapie, které by vyřešily problém rezistentních rakovinových buněk. Protinádorový potenciál vykazují i neplatinové komplexy přechodných kovů, jejichž účinky jsou aktivně zkoumány. Cílem této práce bylo studium vlivu organokovových komplexů na bázi osmia na buněčné linie ovariálních karcinomů na cisplatinu senzitivních i rezistentních.

Metody: Pro naše účely jsme použili buněčné linie lidského karcinomu ovaria, které jsou charakteristické senzitivitou (A2780) a rezistencí (A2780cis) k cisplatině. Stanovili jsme hodnoty IC_{50} pro komplex OsPB a jeho degradační produkty OsABPT, OsSCH1 a NaPB. Následně jsme vybrali vhodné komplexy k dalším *in vitro* testům cytotoxicity – stanovení viability pomocí trypanové modři, laktátdehydrogenasy a aktivity kaspas. Pro srovnání efektu sledovaných komplexů jsme pro jednotlivé experimenty testovali současně cisplatinu o stejné koncentraci.

Výsledky a závěr: Na základě našich výsledků jsme zjistili, že největší účinnosti na obě buněčné linie vykazoval komplex OsPB. Zároveň jsme zaznamenali jeho vyšší cytotoxický efekt v porovnání s cisplatinou o stejné koncentraci. Komplex OsSCH1 vykazoval menší cytotoxické účinky, kdežto OsABPT a NaPB byly neúčinné. V souhrnu tato práce dokazuje, že v nadcházejících letech by měly být organokovové komplexy na bázi osmia dále zkoumány pro jejich slibnou protinádorovou aktivitu jako nástroj k překonání nevýhod chemoterapie na bázi platiny.

Klíčová slova: ovariální karcinomy, organokovové komplexy, cisplatina, rezistence

2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Healthcare

Author: Bc. Kateřina Hrabalová

Supervisor: PharmDr. Jana Urbánková Rathouská, Ph.D.

Consultant: Mgr. Eva Peterová, Ph.D.

Title: Organometallic complexes – cytotoxic effects on ovarian carcinoma cells

Introduction and background: Epithelial ovarian carcinomas, as the most common ovarian malignancy, are still a major therapeutic challenge today. It is due to non-specific symptoms, late diagnosis, a very high mortality rate, and poor prognosis. The condition of patients is also negatively affected by the frequent occurrence of recurrent forms of the disease, which is accompanied by the resistance of cancer cells to conventional chemotherapy such as cisplatin. All the mentioned factors are closely related, and it is clear that ovarian cancers represent both a medical and a social problem. This results in the need to introduce new therapy options to solve resistant cancer cells. The anti-tumor potential is also shown by non-platinum complexes of transition metals, the effects of which are being actively investigated. This work aimed to study the impact of osmium-based organometallic complexes on cisplatin-sensitive and resistant ovarian cancer cell lines.

Methods: For our purposes, we used human ovarian carcinoma cell lines characterized by sensitivity (A2780) and resistance (A2780cis) to cisplatin. We determined the IC₅₀ values for the OsPB complex and its degradation products OsABPT, OsSCH1, and NaPB. Subsequently, we selected suitable complexes for further *in vitro* cytotoxicity tests - determination of viability using trypan blue, lactate dehydrogenase, and caspase activity. To compare the effect of the monitored complexes, we simultaneously tested cisplatin at the same concentration for individual experiments.

Results and conclusion: Based on our results, we found that the OsPB complex showed the greatest effectiveness on both cell lines. At the same time, we noted its higher cytotoxic effect compared to cisplatin at the same concentration. The OsSCH1 complex showed minor cytotoxic effects, whereas OsABPT and NaPB were ineffective. Overall, this work demonstrates that in the coming years, osmium-based organometallic complexes should be further investigated for their promising anti-tumor activity as a tool to overcome the disadvantages of platinum-based chemotherapy.

Keywords: ovarian carcinomas, organometallic complexes, cisplatin, resistance

3. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	
A2780/A2780cis	-	Buněčné linie lidského ovariálního karcinomu
A549	-	Buněčná linie lidského adenokarcinomu plic
ADNEX	Assessment of Different Neoplasias in the Adnexa	Model pro hodnocení ultrazvukového vyšetření
ANOVA	Analysis of variance	Analýza rozptylu
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1	Proapoptický protein
ATP7A/ATP7B	ATPase copper transporting alpha/beta	ATPasa, transportér mědi
Bcl-2	B-cell lymphoma	Antiapoptický protoonkogen
BRAF	B-Raf proto-oncogene	Protoonkogen kódující protein B-Raf
BRCA1/2	Breast cancer genes	Tumor-supresorové geny spojené s ovariálními karcinomy
BRIP1	BRCA1-interactig protein 1	BRCA1 interagující protein 1
CA 125	Cancer antigen 125	Nádorový antigen 125
CO ₂	-	Oxid uhličitý
CP	Cisplatin	Cisplatina
CT	Computed tomography	Počítačová tomografie
CTR1	Copper transporter 1	Transportér mědi typu 1
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EOC	Epithelial ovarian carcinoma	Epiteliální ovariální karcinom

FasL	Fas ligand	Membránový protein účastnící se apoptózy
FBS	Fetal bovine serum	Fetální bovinní sérum
Fe	-	Železo
HCT116	-	Buněčná linie lidského karcinomu tlustého střeva
HE4	Human epididymis protein 4	Lidský epididymální protein 4
IC	Inhibition concentration	Inhibiční koncentrace
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus oncogene homolog	Onkogen kódující protein účastnící se intracelulární signalizace
LDH	-	Laktátdehydrogenasa
MLH1	MutL homolog 1	Gen MMR systému
MMR	Mismatch repair genes	Geny opravující chyby v DNA
MSH2	MutS homolog 2	Gen MMR systému
NAD ⁺ /NADH	Oxidovaná a redukováná forma NAD koenzymu	
NAMI-A	[ImH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (DMSO)(Im)], kde Im=imidazol, DMSO=dimethylsulfoxid	
NaPB	4-fenylbutyrát sodný	
NER	Nucleotide excision repair	Proteiny opravující chyby v DNA
Os	-	Osmium
OsABPT	[Os(η ⁶ -pcym)(ABPT)Cl]PF ₆	
OsPB	[Os(η ⁶ -pcym)(SCH1)(PB)]PF ₆	
OsSCH1	[Os(η ⁶ -pcym)(SCH1)Cl]PF ₆	
PALB2	Partner and localizer of BRCA2	Gen kódující protein, který je součástí komplexu BRCA2
PARP	Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase	Poly(adenosindifosfát-ribosa) polymerasa

PBS	Phosphate-buffered saline	Fosfátový pufr
PC3	-	Buněčná linie lidského karcinomu prostaty
PET/CT	Positron emission tomography and computed tomography	Pozitronová emisní tomografie s počítačovou tomografií
PTCH1/2	PTCH genes encoding protein patched homologues	PTCH geny kódující PTCH proteiny
RAD51C/D	RAD51 genes encoding RAD51 protein homologues	RAD51 geny kódující RAD51 proteiny
RPMI	-	Kultivační médium
Ru	-	Ruthenium
SD	Standard deviation	Směrodatná odchylka
SRB	Sulforhodamine B	Sulforhodamin B
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinoma	Serózní tubární intraepiteliální karcinom
STK11	Serine/threonine kinase 11	Serin/threonin kinasa 11
SUFU	Gene encoding suppressor of fused homolog	Gen kódující supresor fúzovaného homologu
TP53	Tumor protein p53	Tumor-supresorový gen kódující protein p53
UV	Ultraviolet	Ultrafialové záření
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endoteliální růstový faktor
WST-1	4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát	

4. ÚVOD

Epiteliální ovariální karcinom je nejčastějším maligním typem rakoviny vaječníku. Jedná se o nejsmrtelnější zhoubný gynekologický nádor u žen. Velkým problémem zůstává neúčinný screening, který by pomohl odhalit nádor v raném, a tedy dobře léčitelném stádiu, a dále vágní symptomy připomínající nezhoubné stavy. Proto je drtivá většina případů diagnostikována až ve stádiu III nebo IV, kdy prognóza není příznivá (Roett a Evans, 2009; Stewart et al., 2019).

Platnaté komplexy, mezi které se řadí i velmi dobře známá cisplatina, se běžně používají v protinádorové terapii různých nádorových onemocnění, včetně ovariálních karcinomů. Radikální chirurgická operace a kombinace platinového derivátu s taxanem reprezentují v rámci chemoterapie standardní postup první volby pro léčbu ovariálních karcinomů. V některých případech je indikována i cílená léčba, jako je například antiangiogenní léčba nebo inhibitory poly(adenosindifosfát-ribosa) polymerasy (PARP) (Roztočil, 2024).

Citlivost na chemoterapeutika je klíčovým parametrem léčebné účinnosti. I přes to, že je klinický úspěch chemoterapeutik na bázi platiny nesporný, jednou z hlavních výzev se stala častá tendence onemocnění k recidivám, kdy nádorové buňky přestávají být chemosenzitivními (Chandra et al., 2019; Záveský, 2011). Léková rezistence se jako obranná reakce nádorových buněk během kancerogeneze a lékové terapie vyvíjí a její mechanismus je komplexní. Z toho důvodu je snahou vyvinout terapeutické možnosti s cílem překonat rezistenci vůči cisplatině a zároveň snížit nežádoucí účinky, které jsou spjaty s jejím podáním (Song et al., 2022).

Jednu ze strategií pro dosažení tohoto cíle představuje výzkum nových organokovových komplexů na bázi přechodných kovů odlišných od platiny. Tyto komplexy mají potenciál pro vývoj nových protinádorových léků (Anand et al., 2024).

V této práci jsme se věnovali srovnání účinku organokovových komplexů na bázi osmia s cisplatinou na buněčných liniích karcinomu ovaria citlivých a rezistentních na cisplatinu.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je testování cytotoxických účinků organokovových komplexů na bázi osmia jako potenciálních chemoterapeutik v protinádorové léčbě. Jejich účinnost je porovnána s klinicky běžně užívaným cytostatikem cisplatinou (CP) na buněčné linii karcinomu ovaria A2780 a na její cisplatinu-rezistentní verzi A2780cis. Tato práce rovněž obsahuje souhrn teoretických informací pro pochopení dané problematiky.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Ovariální karcinomy

6.1.1 Základní charakteristika onemocnění

Pod pojmem ovariální karcinomy neboli rakovina vaječníků se skrývají zhoubné (maligní) nádory z povrchového epitelu vaječniku, které mohou vznikat nejen v ovariích, ale analogicky i ve vejcovodech a na peritoneu, díky společnému vývojovému základu těchto tkání v mülleriánských duktech. Ovariální karcinomy nelze definovat jako jedno jediné onemocnění, nýbrž skupinu zahrnující široké spektrum zcela odlišných typů nádorů (Roztočil, 2024). Podrobnější klasifikace nádorů ovarií bude popsána v další kapitole.

Ovariální karcinomy, byť nejsou malignitou s nejvyšší incidencí v populaci, patří ke gynekologickým nádorům s nejvyšší mortalitou a nepříznivou prognózou. Epiteliální ovariální karcinomy (EOC) zaujímají největší počet ze všech maligních nádorů ovaria, a jedná se proto o klíčovou skupinu nádorů z pohledu diagnostiky a terapie (Fínek a Zikán, 2023; Mouková, 2023). Ve skutečnosti totiž není velké procento ovariálních karcinomů diagnostikováno dříve, než onemocnění postoupí do pokročilých a obtížně léčitelných stádií III nebo IV, kdy je již nádor rozšířen mimo malou pánev (Stewart et al., 2019; Špaček et al., 2018).

6.1.2 Histopatologická klasifikace

Nádory ovarií, které charakterizujeme jako nádory pravé, lze v základu rozdělit dle jejich biologického chování na benigní, hraniční (borderline nádory či dříve nádory s nízkým maligním potenciálem) a maligní (Rob et al., 2008; Roztočil, 2024). Existuje také několik tzv. nepravých nádorů (pseudotumorů), např. endometrióza či adnexitida, které mohou tyto pravé nádory napodobovat (Rob et al., 2008).

Jedná se o velmi heterogenní skupinu nádorů, které se od sebe různí patogenezí, změnami na molekulární úrovni, morfologií, odpovědí na léčbu, klinických chování a také prognózou. Tento fakt vychází ze skutečnosti, že ovarium představuje svojí

histologickou stavbou velmi komplexní orgán. Dle histogeneze se primární nádory ovarií dělí do tří hlavních skupin:

1. epitelové – 90 %
2. sex-cord stromální (ze specializovaného ovariálního stromatu a ze zárodečných pruhů) – 7 %
3. germinální (ze zárodečných buněk) – 3 % (Fínek a Zikán, 2023; Müllerová et al., 2016).

Buňky germinálních nádorů pocházejí ze žlutkového váčku a jejich příkladem je teratom, nádor ze žlutkového váčku nebo embryonální karcinom. Sex-cord stromální nádory obsahují buňky granulózy, théky, Sertoliho buňky, Leydigovy buňky a stromální buňky produkující kolagen a řadí se sem např. androblastom (Kolařík et al., 2008; Špaček et al., 2018). Kromě primárních nádorů ovarií existují i sekundární – metastázy karcinomů pocházející z primárních ložisek, jako je gastrointestinální trakt (např. žaludek, žlučové cesty, pankreas, tlusté střevo), mléčné žlázy nebo vnitřní genitál (Fínek a Zikán, 2023; Roztočil, 2024).

Mezi ovariálními nádory jednoznačně dominují epitelové nádory. EOC rozlišujeme na základní histotypy odvozené od buněk různých orgánů, které jsou uvedené v tabulce (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1 Histopatologická klasifikace EOC (Kolařík et al., 2008) – převzato z textu a upraveno do tabulky

Typ EOC	Buňky, ze kterých byl EOC odvozen
Serózní	Buňky sliznice vejcovodu
Mucinózní	Buňky výstelky střeva a děložního hrdla
Endometroidní	Buňky výstelky děložního těla
Mezonefroidní (clear cell)	Buňky ledvin
Maligní Brennerův nádor	Buňky přechodného epitelu
Smíšené	
Nediferencovaný karcinom	
Neklasifikované	

Tzv. dualistický model karcinomů ovaria dělí tyto karcinomy na dva typy – typ I a II. Tabulka (Tabulka č. 2) uvádí konkrétní karcinomy. Jedná se o rozdělení maligních epitelových nádorů ovaria, tedy karcinomů, ale také benigních nádorů, jako např. adenomy a hraniční borderline nádory (Fínek a Zikán, 2023).

Tabulka č. 2 Dualistický model karcinomů ovaria (Fínek a Zikán, 2023) – převzato z textu a upraveno do tabulky

Karcinomy typu I	Karcinomy typu II
Světlobuněčný karcinom (clear cell)	High-grade serózní karcinom
Endometroidní karcinom	Karcinosarkom (maligní smíšený mülleríánský nádor)
Low-grade serózní karcinom	Nediferencovaný karcinom
Mucinózní karcinom	
Seromucinózní karcinom	
Maligní Brennerův nádor	

Typ I má tendenci progredovat pomalu a velkou část se podaří diagnostikovat v časných stádiích. Jedná se o nádory větších rozměrů, dobře diferencované, které postihují pouze jeden z vaječnicků (unilaterální), rostou lokálně přímo v ovariu, nebo v oblasti malé pánve. Jsou relativně geneticky stabilní, charakterizovány několika různými mutacemi (např. KRAS a BRAF), přičemž mutace v tumor-supresorovém genu TP53 se vyskytuje pouze minoritně. Vyznačují se nízkým stupněm malignity a jedná se tedy o nádory s relativně dobrou prognózou (Fínek a Zikán, 2023; Kossaï et al., 2018; Roztočil, 2024).

Typ II představuje nádory s agresivním chováním, špatnou prognózou a diagnostikují se až v pokročilých stádiích. Šíří se rychle, diseminují nejčastěji ve formě peritoneálních metastáz. Nádor je nejčastěji bilaterální a bývá provázen přítomností ascitu. Tyto nádory mají vysoký stupeň malignity a často dochází k relapsu onemocnění (Fínek a Zikán, 2023; Roztočil, 2024). Typickým znakem je jejich genetická nestabilita s častým výskytem mutací v genu TP53, jehož produktem je protein p53 zastávající v buňce funkci „strážce genomu“ a reagující na poškození DNA zástavou buněčného

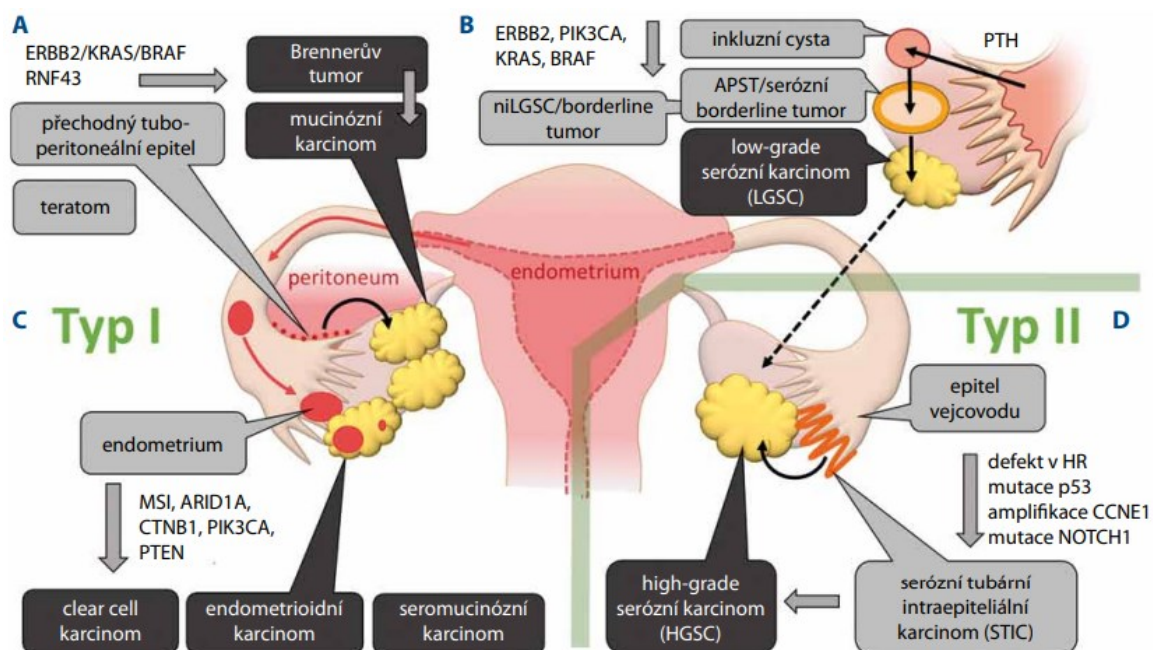
cyklu v kontrolních bodech. V případě nevratného poškození protein p53 indukuje v buňce programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Naopak mutace v genech KRAS a BRAF se vyskytuje jen velmi zřídka (Müllerová et al., 2016; Kotala et al., 2002).

Některé zdroje však naznačují, že tento dualistický model by mohl být příliš zjednodušený a hůře aplikovatelný na jiné podtypy nádorů, než jsou high-grade a low-grade serózní karcinomy, a proto by v budoucnu mohlo dojít k nové kategorizaci nádorů (Fínek a Zikán, 2023).

6.1.3 Etiopatogeneze

Za poslední dobu byly zaznamenány pokroky v chápání mechanismu vzniku a procesu kancerogeneze ovariálních karcinomů, a to zejména díky navržení již zmíněného dualistického modelu (Kossaï et al., 2018; Špaček et al., 2018). Tradiční pohled na problematiku etiopatogeneze reprezentuje tzv. metaplastická teorie, která přisuzuje původ ovariálních karcinomů kortikálním inkluzním cystám na povrchu ovaria – tedy abnormalitám vytvořeným při invaginaci povrchového epitelu do ovaria. Tyto cysty následně podléhají transformaci do různých epiteliálních tkání vnitřního ženského genitálu (Feranec a Mouková, 2013; Fínek a Zikán, 2023).

Proces vzniku karcinomů I. a II. typu probíhá zcela odlišným způsobem, proto bývá zcela raritní přechod typu I do typu II. V obou případech se však předpokládá, že místo jejich původu je mimo ovarium. Karcinomy typu I vznikají z benigních epitelových lézí (endometrióza, epitel vejcovodu), po jejichž sekundární implantaci do ovaria následně dochází k jejich přeměně na odpovídající karcinom skrze nádory se zvyšujícím se stupněm malignity (cystadenomy a borderline nádory). Nejčastějším prekurzorem karcinomů typu II je oblast fimbríí vejcovodu, kde dochází ke vzniku serózního tubárního intraepiteliálního karcinomu (STIC), odkud se následně dostávají maligní buňky sekundárně do ovaria. STIC představuje dle definicí neinvazivní prekancerózu, ale jeho chování se podobá spíše agresivním invazivním karcinomům (Bouda et al., 2018; Feranec a Mouková, 2013; Fínek a Zikán, 2023; Malander et al., 2015; Müllerová et al., 2016). Na obrázku (Obrázek č. 1) jsou schematicky znázorněny mechanismy kancerogeneze pro jednotlivé histologické subtypy EOC.



Obrázek č. 1 Proces kancerogeneze EOC z prekursorových lézí (Müllerová et al., 2016) – převzato

A. Jako prekursor mucinózního karcinomu byla identifikována benigní forma Brennerova tumoru, jehož primárním prekurzorem je přechodný epitel v oblasti tubo-peritoneálního spojení. Raritně se může mucinózní karcinom vyvinout z teratomu. **B.** Low-grade serózní karcinomy (LGSC) vznikají postupně z papilární tubární hyperplazie (PTH), přes kortikální inkluzní cysty přechází na ovarium a vyvíjí se v atypický proliferativní tumor (APST) neboli serózní borderline tumor. Další premaligní lézí může být mikropapilární serózní karcinom (niLGSC). **C.** Endometrióza se podílí na rozvoji clear cell, endometrioidních a seromucinózních karcinomů. **D.** High-grade serózní karcinom (HGSC) má původ v epitelu fimbrií vejcovodu, kde se rozvíjí serózní tubární intraepiteliální karcinom (STIC). Mezi typické molekulární znaky jednotlivých karcinomů patří aktivace různých signálních drah v důsledku mutace (např. ERBB2, KRAS, BRAF).

6.1.3.1 Dědičnost

Dominantní rizikový faktor pro vznik ovariálního karcinomu představuje dědičnost. Oproti ostatním nádorovým onemocněním je zde výskyt dědičných forem neobvykle vysoký (cca 15-25 %), tedy zhruba u každé čtvrté ženy s karcinomem ovaria. Sporadické formy karcinomu ovaria byly zaznamenány ve většině případů a riziko vzniku v běžné populaci se pohybuje kolem 1,8 % (Presl et al., 2018; Soukupová, 2022).

Nejčastěji je důvodem vzniku geneticky podmíněných karcinomů ovaria přítomnost autozomálně dominantního onemocnění – nádorového syndromu prsu a vaječníku. Tento syndrom je způsoben zděděnou zárodečnou mutací v tumor-supresorových genech BRCA1 a BRCA2, které se podílejí na rozpoznání a opravě

dvouvláknových zlomů DNA procesem homologní rekombinace, dále na regulaci transkripce a buněčného cyklu. Ženy s touto mutací mají vysoké celoživotní riziko vzniku karcinomu ovarií, které činí 39-65 % u mutace v BRCA1 a 10-37 % u BRCA2 mutace. Celkově tvoří potvrzené zárodečné mutace v BRCA genech cca 8-18 % všech nádorů ovarií. Současně s mutací v BRCA se zvyšuje i riziko vzniku dalších malignit (např. prsu, tlustého střeva, pankreatu atd.) oproti ženám, které nejsou nositelkami mutace (Soukupová, 2022; Štellmachová et al., 2022). Převažují karcinomy serózní, endometroidní a clear cell. Riziko vzniku dědičně podmíněného karcinomu ovarií stoupá s věkem, proto je po dokončení reprodukčního plánu ženy doporučeno přistoupit k profylaktickým léčebným výkonům, které pravděpodobnost vzniku snižují. Provádí se oboustranná adnexektomie laparoskopicky, tedy chirurgické odstranění rizikových orgánů, s následným podáváním hormonální substituce (Zikán et al., 2006). Kromě zárodečných mutací v BRCA genech podmíněných dědičností od rodičů může vzniknout i nahodilá somatická mutace v BRCA genech (Fínek a Zikán, 2023; Roztočil, 2024).

Byly popsány i jiné zárodečné mutace v genech, které mají spojitost se vznikem ovariálního karcinomu. Jednou z nich je mutace v genech tzv. mismatch repair systému (MMR) zapříčiňující autozomálně dominantní onemocnění dědičný nepolypózní karcinom tlustého střeva, tzv. Lynchův syndrom. Tento syndrom podmiňuje celoživotní riziko nejen karcinomu ovaria, zejména neserózního (až 10 %), ale především kolorektálního karcinomu a dalších onkologických onemocnění. Riziko se odvíjí od příčinného genu a v případě ovarií se nejčastěji jedná o geny MSH2 a MLH1, jejich mutace jsou pak spojeny s vysokou genomovou nestabilitou (Mogos et al., 2022; Štellmachová et al., 2022).

Další predispoziční mutace mohou vznikat v genech TP53, STK11, PTCH1, PTCH2, SUFU, RAD51C, RAD51D, BRIP1, PALB2 a vzácněji i v některých dalších (Soukupová, 2022; Štellmachová et al., 2022).

6.1.3.2 Další rizikové faktory

Endometrióza představuje rizikový faktor především pro vznik clear cell a endometroidního karcinomu ovaria, ostatní faktory sehrávají spíše minoritní roli (Fínek

a Zikán, 2023; Malander et al., 2015). Existuje teorie, dle které stojí za rozvojem nádoru ovaria vysoký počet ovulačních cyklů a zánět, který doprovází každou ovulaci – tedy stavy jako nulliparita, časná menarché, pozdní menopauza, první těhotenství ve věku vyšším 35 let a postmenopauzální hormonální (estrogenová) substituční terapie (Štellmachová et al., 2022). Tato teorie je vysvětlována tím, že při každé ovulaci dochází k poškození a následné reparaci povrchového epitelu ovaria, čímž se vytváří prozánětlivé a prooxidační mikroprostředí s možností rozvoje maligní transformace. Epiteliální buňky vejcovodu jsou vystavovány folikulární tekutině uvolňující se během ovulace, která obsahuje množství volných radikálů a reaktivních forem kyslíku. Jiná teorie popisuje jako rizikové zvýšené množství gonadotropinů (Adam et al., 2010; Kolařík et al., 2008; Mogos et al., 2022; Sánchez-Prieto et al., 2022; Shih et al., 2021). Faktory týkající se životního stylu, jako je kouření, konzumace alkoholu, obezita, či karcinogeny v potravě, působí rizikově obecně u všech nádorových onemocnění (Fínek a Zikán, 2023).

6.1.3.3 Protektivní faktory

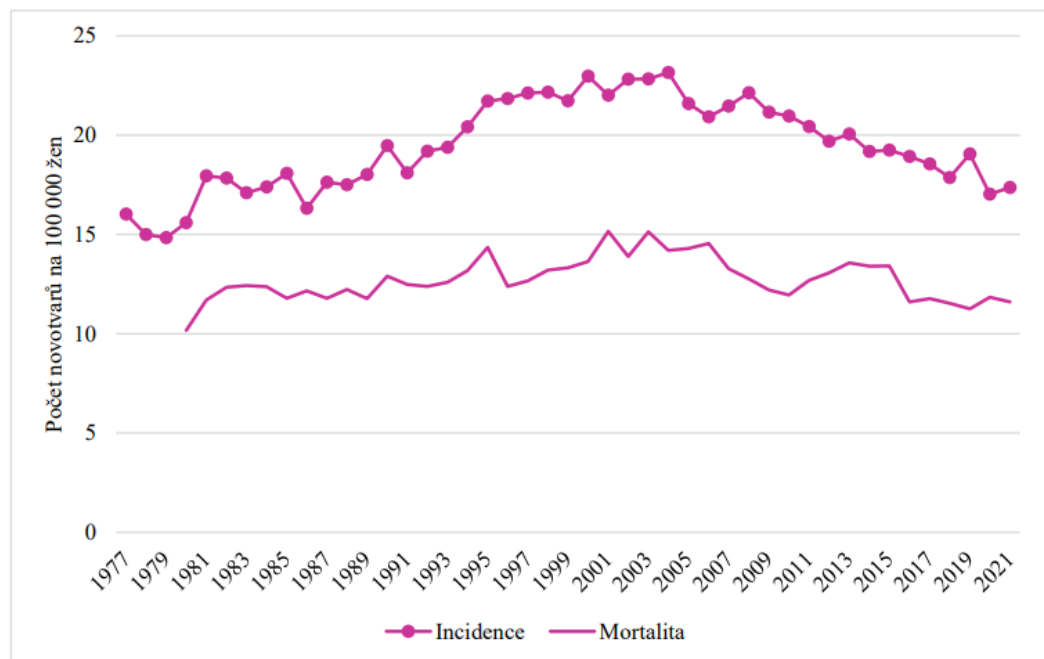
Z výsledků některých studií vyplývá, že orální hormonální antikoncepce má protektivní vliv a s délkou užívání klesá riziko karcinomu, ochranný vliv přetrvává i několik let po vysazení antikoncepce. S každým porodem a kojením se riziko taktéž snižuje, jelikož všechny uvedené faktory potlačují ovulaci a snižují sekreci gonadotropinů, a tím eliminují traumatizaci povrchového epitelu (Adam et al., 2010; Malander et al., 2015; Zikán et al., 2006). V některých publikacích se můžeme setkat i s protektivními faktory v podobě hysterektomie a podvázání vejcovodů (Roett a Evans, 2009; Vokurka a Tesařová, 2018). Vzhledem k hypotézám, že zánět hraje roli ve vývoji ovariálního karcinomu, by se dal předpokládat i pozitivní vliv dlouhodobého užívání aspirinu, který působí protizánětlivě inhibicí enzymů cyklooxygenasy 1 a 2 (Minlikeeva a Moysich, 2019).

6.1.4 Epidemiologie

Incidence i mortalita ovariálních karcinomů má nejenom u nás v České republice, ale i v některých ostatních zemích za posledních pár let mírně klesající charakter (Graf

č. 1). I přes to se stále onemocnění vyznačuje nejvyšší letalitou (tedy poměrem mortalita/incidence) mezi všemi gynekologickými nádory (Büchler, 2023). V roce 2021 zaujímaly zhoubné nádory vaječníku 16. příčku mezi nejčastějšími novotvory vyskytujícími se v České republice. V témže roce bylo nově diagnostikovaných 925 případů (17,4 na 100 000 žen) a 618 žen zemřelo (11,6 zemřelých na 100 000 žen). Svého vrcholu dosáhla incidence ovariálních karcinomů v roce 2005, kdy připadalo 25 případů na 100 000 žen. Mezi všemi onkologickými onemocněními se jedná o 5. nejčastější příčinu úmrtí u žen (Krejčí et al., 2021; Špaček et al., 2018).

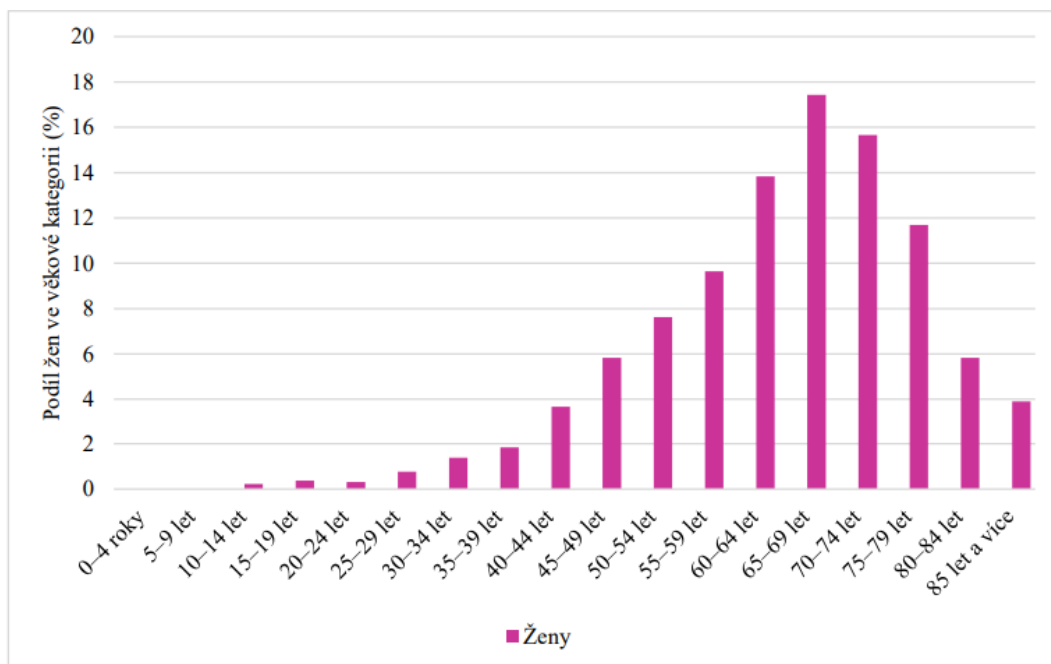
Z dostupných dat je patrné, že se obecně nádorová onemocnění vaječníku vyskytují více ve vyspělých částech světa, tedy ve střední a východní Evropě a Severní Americe, o něco méně v Jižní Americe a nejméně v Asii a Africe (Reid et al., 2017).



Graf č. 1 Vývoj incidence a mortality zhoubných nádorů vaječníku v České republice v čase (Krejčí et al., 2021) – převzato

Na rozdíl od neepitelových nádorů ovaria, které se vyskytují velmi často u mladých žen a dívek, s EOC se setkáváme spíše u žen nad 40 let, nejvíce pak kolem 65 let věku (Graf č. 2) (Büchler, 2023; Vokurka a Tesařová, 2018).

V letech 2015-2019 se pohybovala hodnota pětiletého přežití pacientek, které byly v tomto období léčeny, kolem 48,7 % u pokročilejších stádií onemocnění a až 90 % u stádia I (Krejčí et al., 2021).



Graf č. 2 Věkové složení zhoubných nádorů vaječníku u žen v letech 2017-2021
(Krejčí et al., 2021) – převzato

6.1.5 Symptomy

Jedná se o onemocnění často probíhající velmi dlouho asymptomaticky, proto k záchytu v časných stádiích dochází spíše náhodně při vyšetření nebo jiné operaci (Kolařík et al., 2008). Ve výjimečných případech se vlivem ruptury, torze či subtorze ovaria dostaví bolestivost v oblasti břicha a přítomnost krve v peritoneální dutině. Obecně bývají prvotní příznaky nespecifické a zahrnují gastrointestinální obtíže, časté močení, bolest v oblasti pánve, bolest a zvětšování břicha buď v důsledku ascitu nebo samotného nádoru, avšak v drtivé většině případů značí již stav, kdy onemocnění postoupilo do pokročilých fází (Goff, 2012; Rob et al., 2008; Špaček et al., 2018). Mezi další příznaky spojované s karcinomem ovaria se řadí hematurie, bolestivá a nepravidelná menstruace, další gynekologické příznaky nebývají tak časté (Büchler, 2023; Goff, 2012). Při zasažení dalších orgánů metastázemi se mohou přidružit i jiné symptomy (Špaček et al., 2018).

Pokud se zmíněné potíže objevují s vysokou frekvencí (více než 12 dní v měsíci) a mají nedávný nástup, pak by měl být ovariální karcinom považován za možnou příčinu (Goff, 2012).

6.1.6 Diagnostika

V současné době neexistuje systémový celoplošný screening pro toto onemocnění, jelikož není k dispozici metoda, která by umožňovala reálné využití screeningu pro širokou populaci a která by se vyznačovala dostatečnou specifitou, senzitivitou a pozitivní prediktivní hodnotou (Chovanec, 2016; Soukupová, 2022; Špaček et al., 2018). Tím pádem není zcela možné nemoc vždy odhalit včas (Záveský, 2011).

V případě podezření na ovariální karcinom je zásadní osobní a rodinná anamnéza pacientky, posouzení klinických příznaků, gynekologické vyšetření a také celkové fyzikální vyšetření (Fischerová et al., 2012; Špaček et al., 2018).

V popředí diagnostiky stojí ultrazvukové vyšetření, neboť je v drtivé většině zcela dostačující a zahrnuje transvaginální, transabdominální a případně transrektální sonografii. Pomocí sonografie lze odhadnout, zda nádor pochází z ovaria, stanovit jeho typ a rozsah postižení, odlišit benigní formu nádoru od maligní a posoudit možnost operace. Pro hodnocení ultrazvukového vyšetření byla vypracována řada modelů – např. model odhadu rizika malignity, jednoduchá ultrazvuková pravidla, či ADNEX model (Assessment of Different Neoplasias in the Adnexa). Pokud z nějakého důvodu nelze spolehlivě vyhodnotit ultrazvukové vyšetření, lze využít dalších zobrazovacích metod, jako magnetickou rezonanci, méně často pak CT (počítačová tomografie) a PET/CT (pozitronová emisní tomografie s počítačová tomografií) (Fischerová et al., 2012; Fínek a Zikán, 2023). Ke stanovení přesné diagnózy je zapotřebí provést histologické vyšetření tkáně odebrané při chirurgickém výkonu a u inoperabilních stavů biopsie získaná samořeznou jehlou (tzv. tru-cut biopsie) při sonografii (Roztočil, 2024; Vokurka a Tesařová, 2018). Využití zobrazovacích metod pro diagnostiku ovariálního karcinomu je uvedeno v tabulce (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3 Využití zobrazovacích metod v diagnostice a stagingu ovariálních malignit (Fínek a Zikán, 2023) – převzato a upraveno

	Ultrazvuk (TVS/TRS a TAS)	CT	MR	PET/CT
Diferenciální diagnostika ovariálních malignit	První volba	-	Druhá volba (nejasné UZ nálezy)	-
Staging (stádium)	-	První volba	Druhá volba (kontraindikace CT, zobrazení pánve)	Druhá volba (vzdálené metastázy)

Vysvětlivky: TVS, TRS a TAS – transvaginální, transrektální a transabdominální ultrazvuk, CT – počítačová tomografie, MR – magnetická rezonance, UZ – ultrazvuk, PET – pozitronová emisní tomografie

Diagnostika bývá doplněna stanovením sérových hladin nádorových markerů CA 125 (Cancer Antigen 125) a HE4 (Human Epididymis Protein 4). Jak již bylo zmíněno, pro screening jsou však nespolehlivé. Jejich koncentrace se zvyšují nejen u ovariálního karcinomu, ale i u dalších maligních i nemaligních onemocnění, případně u fyziologických stavů. Pomocí markeru CA 125 se také monitoruje účinek léčby a detekují recidivy onemocnění (Fischerová et al., 2012; Fínek a Zikán, 2023; Roett a Evans, 2009).

Každá pacientka s EOC podstupuje genetické vyšetření. K vyšetření indikuje pacientku klinický genetik a lze takto odhalit genetické predispozice pro vznik karcinomu ovaria v rodině provedením mutační analýzy rizikových genů (Štellmachová et al., 2022; Zikán et al., 2006).

6.2 Léčba ovariálních karcinomů

Ačkoli se jedná o nádor vyznačující se velmi vysokou mortalitou, při správné volbě léčebných postupů dochází k výraznému prodloužení a také zlepšení kvality života pacientek. Pro dosažení maximálního terapeutického úspěchu se v základu přistupuje k chirurgické léčbě v kombinaci se systémovou léčbou – chemoterapií a v současné době i s cílenou léčbou (Fínek a Zikán, 2023; Lheureux et al., 2019). Součástí léčby bývá i paliativní péče, která se zaměřuje na zmírnění symptomů onemocnění a zajištění kvalitního života pacientkám potýkajícím se s tímto závažným onemocněním. Po ukončení léčby je každá pacientka sledována tak, že v daných intervalech podstupuje vyšetření, která se volí individuálně (Roztočil, 2024).

6.2.1 Chirurgická léčba

Operační výkon stojí v léčbě EOC na prvním místě. Díky radikální operaci má pacientka šanci na úplné vyléčení (Lheureux et al., 2019). Cílem je dosáhnout optimálního debulkingu, tzn. kompletní odstranění viditelného nádoru s nulovým pooperačním reziduem nebo odstranění alespoň maximálního možného množství nádorové tkáně z dutiny břišní (cytoredukce). Velikost zbytkového nádorového rezidua jednoznačně koreluje s délkou přežití zejména u pacientek s pokročilým stádiem EOC (Fínek a Zikán, 2023; Klát, 2012; Špaček et al., 2018). Během operačního zákroku se také určuje rozsah onemocnění (staging) včetně odběru reprezentativního vzorku pro histopatologické vyšetření (Engbersen et al., 2021; Špaček et al., 2018).

Na začátku léčby se přistupuje k laparotomicky prováděné primární radikální operaci (primary debulking surgery), která zahrnuje hysterektomii s oboustrannou adnexektomií, omentektomii, pánevní a paraaortální lymfadenektomii a dále apendektomii, je-li indikována (Roett a Evans, 2009; Sambasivan, 2022). To znamená, že dochází k odstranění všech tkání, kde by mohl být nádor přítomen nebo recidivovat. Dle rozsahu nádoru se případně připojují ještě další resekcční výkony postižených orgánů (Fínek a Zikán, 2023; Roztočil, 2024). Laparoskopické provedení operace nepatří ke standardním přístupům, jelikož se omezuje pouze na časná stadia a musí být provedeno ve velmi specializovaných centrech (Chovanec et al., 2011; Roztočil, 2024).

V případě pokročilých stádií onemocnění, kdy se prokáže inoperabilita na základě vyšetření zobrazovacími metodami, se jeví jako účinnější zahájit léčbu pomocí několika cyklů chemoterapie (Sambasivan, 2022). Chemoterapii předchází neradikální operace z důvodu histologického ověření typu nádoru. Cílem následně podávané chemoterapie je zmenšit nádorovou tkáň, díky čemuž lze provést optimální debulking s časovým odstupem jako tzv. intervalovou operaci (interval debulking surgery) (Lheureux et al., 2019; Stewart et al., 2019). Rozsah operačního výkonu je pak shodný s rozsahem primárního výkonu až na lymfadenektomii, která se nedoporučuje (Kostun et al., 2018; Lheureux et al., 2019).

K sekundární cytoredukční operaci (secondary debulking surgery) jsou indikovány pacientky, u nichž došlo k recidivě či progresi onemocnění. Předpokladem pro zákrok však zůstává dosažení nulového pooperačního rezidua (Lheureux et al., 2019).

U premenopauzálních žen, které ještě plánují otěhotnět, lze za určitých okolností uvažovat o konzervativním operačním výkonu se snahou o zachování plodnosti. Rozsah výkonu je identický s radikální operací, avšak zahrnuje pouze jednostrannou adnexetomii bez hysterektomie. Při nemožnosti zachovat adnexa může být žena zařazena do programu asistované reprodukce. Podmínkou pro konzervativní typ výkonu je především potvrzené časně stadium a dokončení radikalizující operace po porodu (Kolařík et al., 2008; Rob et al., 2008).

Přesný operační plán se vždy volí dle aktuálního nálezu, stádia onemocnění a také celkového stavu pacientky (Špaček et al., 2018).

6.2.2 Chemoterapie

Chemoterapií se rozumí léčebná metoda maligního onemocnění za pomoci léků – cytostatik. Protinádorový účinek cytostatik spočívá v jejich cytotoxickém působení na nádorové buňky s cílem poškodit různými mechanismy nádorovou DNA. To vede v konečném důsledku k inhibici buněčné proliferace zástavou buněčného cyklu. Úspěch cytostatické léčby je založen na opakovaném podání v pravidelných cyklech, aby se dosáhlo potřebné redukce maligních buněk. Nevýhodou látek používaných jako chemoterapeutika je jejich neselektivní mechanismus účinku, mohou totiž kromě

proliferujících nádorových buněk působit také na zdravé proliferující buňky. Z toho vyplývá riziko nežádoucích účinků (Klener a Klener, 2013; Vorlíček et al., 2011).

Ovariální karcinomy jsou ve většině případů sice chemosenzitivní, tedy dobře reagují na chemoterapii, avšak v průběhu času se mohou měnit na rezistentní. Z toho důvodu se užívá kombinace léků. Chemoterapie sama o sobě nádor nevyлéčí, i tak má ale při léčbě ovariálních karcinomů svou nezastupitelnou roli (Fínek a Zikán, 2023; Chandra et al., 2019).

Po primárním operačním zákroku následuje adjuvantní (poooperační) chemoterapie, která se zaměřuje na případnou zbytkovou populaci maligních buněk se snahou minimalizovat riziko recidivy. Chemoterapie by měla být zahájena v co nejkratším čase od ukončení operace kombinací platinového derivátu (karboplatina případně cisplatina) s taxanem (paklitaxel) jako standardním režimem. Podává se 6-9 cyklů s třítydenními intervaly (Roztočil, 2024; Sambasivan, 2022; Špaček et al., 2018).

Neoadjuvantní (předoperační) chemoterapie představuje iniciální fázi léčby umožňující operabilitu nádoru u stavů, kdy nelze v době diagnózy přistoupit k primární operaci. Volí se stejná kombinace cytostatik jako v případě adjuvantní chemoterapie v 3-4 cyklech a postup se opakuje i po intervalové operaci (Špaček et al., 2018).

Nejčastěji se chemoterapie aplikuje intravenózně (Rob et al., 2008). Existuje i alternativní možnost aplikace intraperitoneálně, která umožňuje přímé působení vyšších dávek cytostatik v peritoneální dutině. Tato forma aplikace však nepřináší výrazně lepší výsledky oproti intravenóznímu podání, které pacientky obecně lépe snášejí, a proto nepatří k metodě první volby. Ve fázi výzkumu se nachází hypertermická intraperitoneální chemoterapie založená na laváži dutiny břišní zahřátým roztokem s cytostatikem, které díky zvýšené teplotě lépe proniká do nádorové tkáně (Fínek a Zikán, 2023; Sambasivan, 2022).

Pacientky s recidivujícím onemocněním jsou v závislosti na intervalu od ukončení primární chemoterapie indikovány k sekundární chemoterapii. U zcela inoperabilních stavů má chemoterapie význam paliativní (Adam et al., 2010; Kolařík et al., 2008).

6.2.3 Radioterapie

Radioterapie (léčba zářením) se v léčbě ovariálního karcinomu využívá již pouze okrajově, zejména kvůli uznávanému úspěchu chemoterapie. Diseminace maligních buněk v peritoneální dutině vyžaduje ozáření celé oblasti břicha s rizikem poškození některých orgánů. I přes modifikace techniky provedení se s radioterapií pojí četný výskyt nežádoucích účinků. Nicméně neustálá modernizace ozařovacích technik by mohla být do budoucna přínosem (Iorio et al., 2019).

6.2.4 Cílená léčba

Pro maligní buňky je typická schopnost autonomní proliferace, kterou nelze patřičně kontrolovat a regulovat. Při cílené léčbě je snaha terapeuticky zasáhnout do konkrétních nitrobuněčných procesů, jež mají za následek maligní transformaci zdravých buněk. Cíl tohoto typu léčbu spočívá v zastavení růstu a šíření nádorového onemocnění díky působení na cílové struktury pouze v místě postižení, čímž je chráněna zdravá tkáň (Chovanec et al., 2011).

V oblasti problematiky ovariálních karcinomů se prozatím významně uplatňuje antiangiogenní léčba a inhibitory poly(adenosindifosfát-ribosa) polymerasy (PARP inhibitory) (Fínek a Zikán, 2023).

6.2.4.1 Antiangiogenní léčba

Angiogeneze je proces novotvorby cév a představuje jeden z důležitých mechanismů pro růst a přežití nádorových buněk. Do velikosti zhruba 1-2 milimetrů si nádor vystačí se stávajícími okolními cévami, které mu zajistí zásobení kyslíkem. S narůstající velikostí nádoru musí již zahájit tvorbu vlastní cévní sítě zvýšenou produkcí proangiogenního mediátoru – vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který se následně naváže na receptory na povrchu endotelových buněk. Na rozdíl od fyziologické tvorby cév ve zdravých tkáních, kde podléhá regulaci, nádorová novotvorba cév umožňuje další růst nádorových buněk a metastazování (Nový, 2012; Ševčík, 2015).

V rámci antiangiogenní léčby je třeba snížit permeabilitu a normalizovat cévní řečiště a zajistit lepší průnik současně podávaných chemoterapeutik u pokročilých

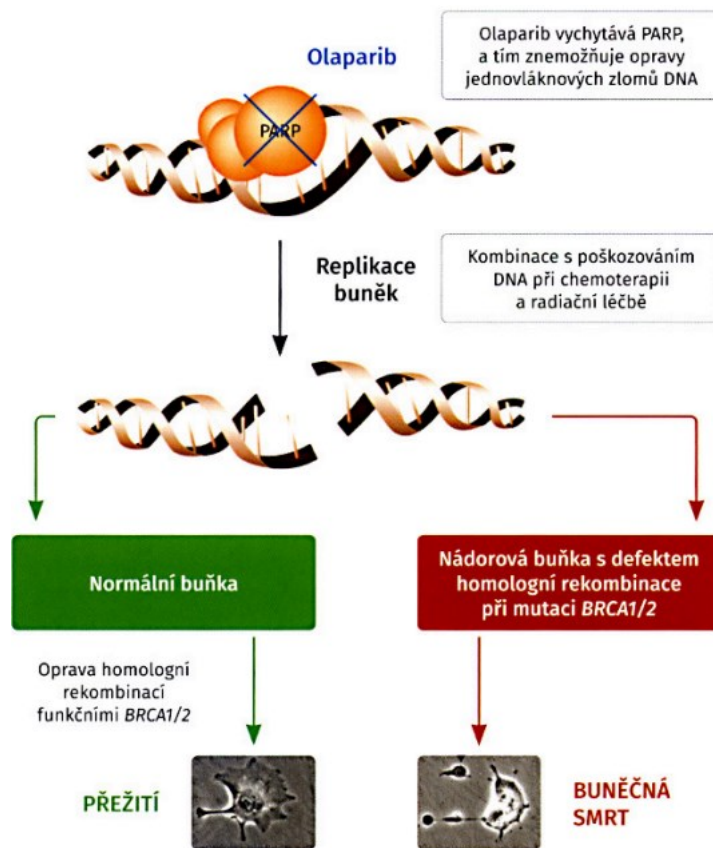
stádií a rekurentních forem nemoci. K tomuto účelu se užívá monoklonální protilátka bevacizumab, která cílí na VEGF a zabraňuje tak jeho vazbě na receptory endotelových buněk, čímž inhibuje nádorovou angiogenezi (Jelovac a Armstrong, 2011; Nový, 2012).

Další antiangiogenní látky zaměřené na receptory VEGF jsou v některých částech světa součástí klinických studií (Jin et al., 2022).

6.2.4.2 PARP inhibitory

Tento typ terapie se soustředí na mechanismy, kterými buňka opravuje DNA poškozenou vlivem chemoterapie (Stewart et al., 2019). Proteiny z rodiny PARP (především PARP-1) se významně uplatňují při reparaci jednovláknových zlomů DNA výměnou příslušných bází. Při inhibici PARP se tyto zlomy mění během replikace na dvouvláknové zlomy a dochází k jejich hromadění. Dvouvláknové zlomy jsou za běžných okolností velmi přesně opraveny mechanismem homologní rekombinace, na kterém mají podíl geny BRCA1/2 (Lheureux et al., 2019). Při defektu homologní rekombinace zapříčiněného mutací v genech BRCA1 nebo BRCA2 dochází k podpoře vzniku maligní transformace a reparace DNA je závislá hlavně na PARP. Z toho vyplývá, že při současném použití inhibitorů PARP není nádorová buňka schopna opravovat chyby v DNA, což vede k její smrti (Jelovac a Armstrong, 2011).

Olaparib byl schválen jako udržovací terapie u pacientek se zárodečnou i somatickou mutací v BRCA genech odpovídajících alespoň částečně na chemoterapeutickou léčbu platinovým derivátem (O'Malley, 2019; Ševčík, 2017). Mechanismus účinku olaparibu znázorňuje obrázek (Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 Mechanismus účinku PARP inhibitorů – olaparib
(Ševčík, 2017) – převzato

Vysvětlivky: PARP – poly(adenosindifosfát-ribosa) polymerasa, DNA – deoxyribonukleová kyselina, BRCA – breast cancer geny

6.2.4.3 Imunoterapie

Imunoterapie se jeví jako slibná možnost pro zlepšení léčebných výsledků ovariálního karcinomu do budoucna. Imunoterapie stimuluje imunitní systém a jeho složky tak, aby byla zvýšena aktivita imunitní odpovědi a zároveň i schopnost rozpoznat nádorové buňky s cílem je zničit (Náležinská et al., 2011). Perspektivní strategií se zdají být blokátory kontrolních bodů tzv. checkpoint inhibitory. Imunitní kontrolní body ovlivňují imunitní odpověď efektorových T-lymfocytů a způsobují imunitní rezistenci nádorových buněk. Inhibice těchto kontrolních bodů na povrchu T-lymfocytů či na povrchu nádorových buněk obnoví funkci cytotoxických T-lymfocytů. Další možnosti představují terapeutické vakcíny a adoptivní přenos buněk infiltrujících nádor (Fínek a Zikán, 2023).

6.2.4.4 Hormonální léčba

Hormonální léčba nachází uplatnění u pacientek, které nesnesou chemoterapii nebo u kterých byly všechny možnosti systémové léčby již vyčerpány. Některé typy nádorů charakteristicky exprimují receptory pro hormony. Lze podat antiestrogeny, gestageny nebo inhibitory aromatasy ve snaze utlumit působení estrogenů. Úspěšnost léčby není vysoká a využívá se spíše paliativně (Jelovac a Armstrong, 2011; Vlasák et al., 2018).

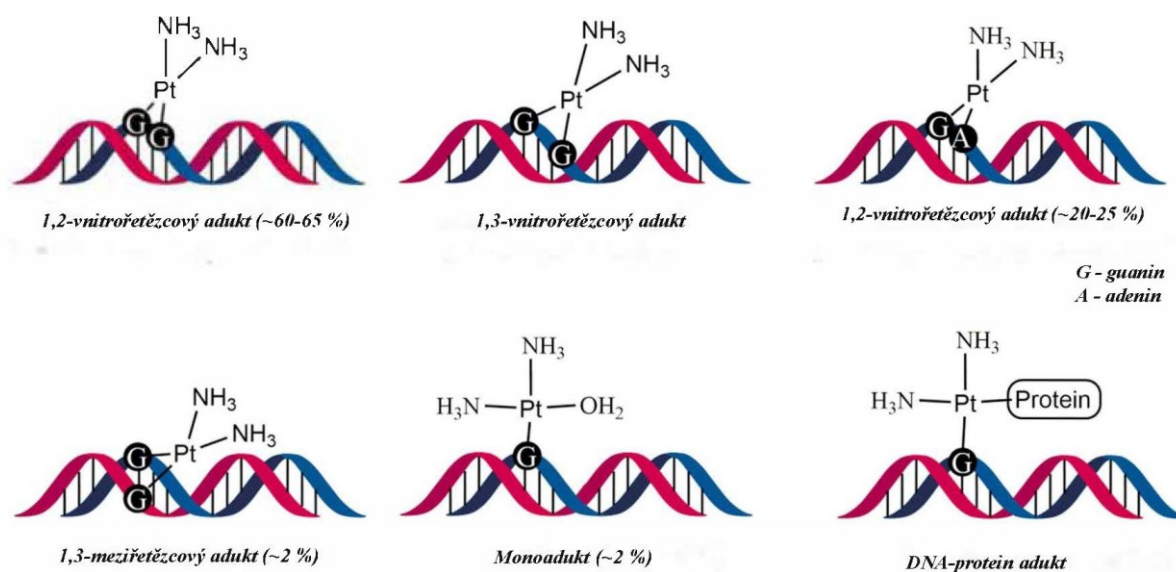
6.3 Rezistence nádorových buněk na cisplatinu

6.3.1 Cisplatina

Cisplatina (CP) neboli *cis*-diamino-dichloro-platnatý komplex se v protinádorové terapii používá již od 60. let 19. století. V současnosti představuje jedno z nejčastěji používaných chemoterapeutik při léčbě nádorů vaječníků, varlat, močového měchýře, děložního čípku, plic, hlavy, krku a dalších (Lucaciu et al., 2022). CP brání růstu nádoru tím, že inhibuje syntézu DNA v nádorových buňkách (Song et al., 2022). Mezi nejčastější nežádoucí účinky při podávání CP patří nevolnost a zvracení (až v 90 %), nefrotoxicita, ototoxicita a svalové záškuby (Fínek a Zikán, 2023).

CP je aplikována do těla intravenózně a vzhledem k relativně vysoké koncentraci chloridových iontů v krevním řečišti zůstává v nezměněné formě. Část podané CP může být vázána na plazmatické proteiny a inaktivována (Ghosh, 2019). Molekula CP vstupuje do buněk pasivní difuzí skrze plazmatickou membránu nebo aktivním transportem zprostředkovaným membránovými proteiny (např. CTR1). Následně se uvnitř buňky aktivuje díky výměně chloridových ligandů za vodu a naváže se na DNA (preferenčně na místa obsahující guanin) a narušuje její strukturu mechanismem alkylace. To znamená, že mezi CP a bází se vytvářejí pevné kovalentní vazby. To má za následek vznik různých aduktů – vnitřetězcových nebo meziřetězcových vazeb uvnitř DNA (Obrázek č. 3) a inhibici replikace a transkripce. Takto poškozená DNA znemožňuje dělení buňky a pokud ji nelze opravit reparačními mechanismy, dochází k indukci apoptózy (Klener a Klener, 2013; Lucaciu et al., 2022; Song et al., 2022).

Mimo to však CP vyvolává tvorbu reaktivních forem kyslíku, které ovlivňují zejména normální funkci mitochondrií, což podporuje její cytotoxický účinek (Ghosh, 2019). V neposlední řadě CP přispívá k aktivaci vnější dráhy apoptózy prostřednictvím zvýšené exprese membránových receptorů smrti (zejména Fas), které jsou aktivovány vazbou příslušných ligandů (FasL) (Klener a Klener, 2013).



Obrázek č. 3 Tvorba DNA aduktů s cisplatinou (Ghosh, 2019) – převzato a upraveno

Kombinovaná chemoterapie CP s dalším cytostatikem je základem léčby u mnoha nádorových onemocnění. Citlivost na CP je primárně většinou vysoká, ale v mnoha případech dojde nakonec k relapsu onemocnění rezistentního na CP, což má za následek selhání terapie a zvýšení mortality (Dasari a Tchounwou, 2015; Song et al., 2022). Vnitřní nebo též vrozená rezistence se projevuje již při prvním podání cytostatika, u získané rezistence začíná léčba selhávat až po čase (Ghosh, 2019).

6.3.2 Mechanismy rezistence

Rezistence nádorových buněk k CP je dána řadou mechanismů, mezi které náleží snížená akumulace CP v nádorových buňkách (snížení vychytávání, změny v efluxu), inaktivace CP reakcí s thioley, rychlejší oprava DNA a podpora antiapoptických mechanismů (Ghosh, 2019). Předpokládá se, že jeden z možných mechanismů rezistence by také mohl spočívat v deaktivaci velkého množství CP (cca 65-95 %) v krevním řečišti, které nastává zpravidla do jednoho dne od podání. Nejčastěji se CP váže na thiolové funkční skupiny v albuminu (Ferraro et al., 2015).

Aby mohla být CP účinná, je třeba její akumulace v místě působení. Procesy, které snižují průnik CP skrze plazmatickou membránu nebo naopak které zvyšují její

eflux ven z buňky, napomáhají nádorovým buňkám vyhnout se cytotoxickému působení CP. Zároveň CP samotná způsobuje snížení koncentrace transportního proteinu CTR1 pro vstup CP do buňky. Zvýšená exprese několika dalších proteinů (ATP7A, ATP7B, P-glykoprotein) zajišťuje zvýšené vypuzování CP z buňky. To vše vede k následné rezistenci (Ghosh, 2019; Song et al., 2022).

Jednou z nejdůležitějších možností vzniku rezistence na CP je její zvýšená reaktivita s thiolovými funkčními skupinami glutathionu a metalothioneinu (Ghosh, 2019). Glutathion představuje jeden z nejúčinnějších antioxidantů a má velký podíl na odstraňování reaktivních forem kyslíku, které jsou klíčové k vyvolání oxidačního stresu a tím i k zajištění účinnosti CP. Zvýšená koncentrace glutathionu znamená i jeho zvýšenou schopnost detoxikovat CP. To se děje spontánně nebo za pomoci enzymu glutathion-S-transferasy, který katalyzuje konjugaci glutathionu s xenobiotiky. Nadměrná exprese tohoto enzymu může souviset s nižší citlivostí na CP (Song et al., 2022).

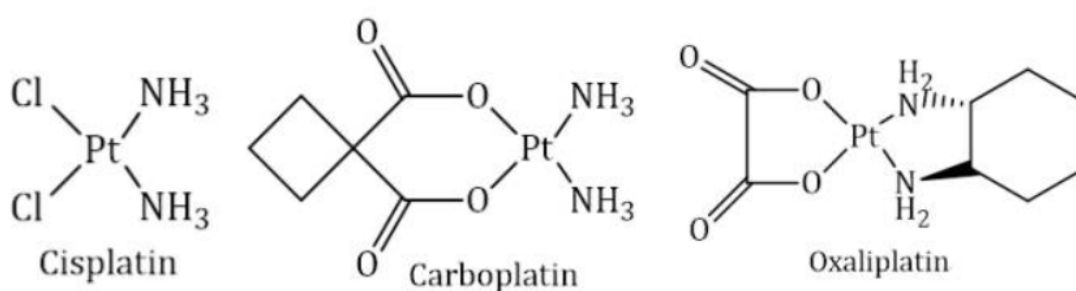
Nádorové buňky se snaží v úvodní fázi opravit DNA poškozenou účinkem CP pomocí reparačních mechanismů. Při těchto opravách se nejvíce uplatňují proteiny tzv. nucleotide excision repair systému (NER) a mismatch repair systému (MMR). NER rozpoznávají postižený úsek v DNA a v tomto místě následně vystřihnou nukleotidy. MMR se podílí na opravách chybného párování. Pokud se podaří DNA opravit, buňka se vyhne apoptóze a přežívá. Nadměrná exprese NER a také absence MMR v buňkách se vyznačuje nízkou citlivostí na CP (Ghosh, 2019; Lucaciu et al., 2022).

Rezistence může být spojena se změnami v signálních drahách ovlivňujících apoptózu, které zprostředkovávají odpověď buněk na CP. Zde hraje ústřední roli tumor-supresorový gen TP53. Z dostupných studií vyplývá, že mutace v genu TP53 a inaktivace proteinu p53 zajišťuje vyšší odolnost vůči CP. Dále převaha antiapoptických signálů (např. X-vázaný inhibitor apoptózy, Bcl-2) nad proapoptickými podporuje zvýšenou rezistenci (Balaji et al., 2021; Song et al., 2022).

Výše zmíněné mechanismy rezistence jsou ty stěžejní a dobře popsány. Existuje však řada dalších, jako např. epigenetické změny, epiteliálně-mezenchymální tranzice, imunitní faktory. Ty také mají svůj podíl na rozvoji rezistence nádorových buněk k CP, která je tedy multifaktoriální (Marchetti et al., 2021; Pokhriyal et al., 2019).

6.4 Karcinomy a organokovové komplexy

Organokovové komplexy jsou obecně látky, v jejichž molekule se nachází vazba uhlík-kov. Většinou se jedná o relativně lipofilní sloučeniny s variabilní strukturou bez náboje. Jejich atom kovu je v nízkém oxidačním stavu (Anand et al., 2024; Skoupilová a Hrstka, 2019). Mezi organokovové sloučeniny řadíme i již osvědčené a v klinické praxi běžně užívané deriváty platiny – cisplatina, karboplatina, oxaliplatina (Obrázek č. 4). V některých zemích bylo schváleno použití dalších platinových derivátů, jako je heptaplatina, nedaplatina a lobaplatina (Lucaciu et al., 2022).



Obrázek č. 4 Strukturní vzorce cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny (Lucaciu et al., 2022) – převzato a upraveno

I přesto, že je léčba různých nádorových onemocnění pomocí CP relativně dobře účinná, je stále limitována systémovou toxicitou a s ní spojenou řadou nežádoucích účinků. Další limitací je vrozená či získaná rezistence, kterou se zavedením dalších léků na bázi platiny podařilo odstranit pouze částečně. Právě tato skutečnost vede v poslední době k syntéze a intenzivnímu testování dalších sloučenin na bázi kovů, které by mohly vykazovat vyšší terapeutický potenciál v protinádorové léčbě a zároveň nižší cytotoxické účinky na zdravé tkáně (Lucaciu et al., 2022; Skoupilová a Hrstka, 2019).

Slibné protinádorové vlastnosti jsou studovány zejména u komplexů obsahujících atom železa, zlata, ruthenia, osmia, rhenia, iridia a některých dalších přechodných prvků (Anand et al., 2024; Parveen et al., 2019). Tyto organokovové komplexy procházejí preklinickými a klinickými studiemi a jejich potenciálně odlišné mechanismy účinku ve srovnání s klinickými platinovými cytostatiky mohou významně přispět při řešení problémů s rezistencí vůči CP a jejím derivátům. Na organokovové

látky se stejným mechanismem účinku se totiž může vyvinout zkřížená rezistence (Anand et al., 2024; Song et al., 2022).

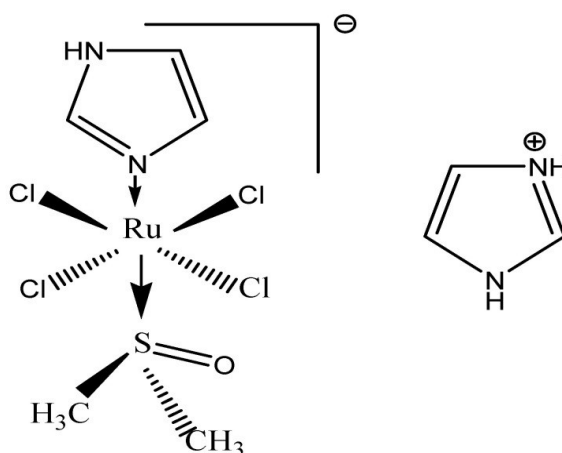
6.4.1 Ruthenium

Rutheniové komplexy jsou předmětem zájmu již nějakou dobu, zvláště pro jejich silné protinádorové účinky za současné schopnosti si zachovat nízkou toxicitu (Skoupilová a Hrstka, 2019). Ruthenium může existovat v oxidačních stavech +II, +III, +IV, které jsou dostupné za fyziologických podmínek. Komplexy vytvářejí oktaedrickou geometrii, kdy je kolem centrálního atomu ruthenia uspořádáno šest ligandů. Díky této orientaci dochází přednostně k tvorbě meziřetězcových vazeb mezi těmito komplexy a bázemi v DNA (Lucaciu et al., 2022).

Pro zvýšení selektivity proti nádorovým buňkám a snížení toxicity na buňky zdravé lze komplexy podávat ve formě relativně inertních proléčiv Ru(III), která se následně redoxními procesy aktivují na Ru(II) až uvnitř nádorových buněk. Aktivaci podporuje kyselé pH a hypoxie v nádorových buňkách (Lucaciu et al., 2022)

Další výjimečnou vlastností Ru(III) je jeho schopnost nahradit Fe(III) ionty v transferinu, vzhledem k jejich strukturní podobnosti. Fyziologický mechanismus transportu železa by tak mohl být využit pro vstup rutheniových komplexů do nádorových buněk právě proto, že u rychle proliferujících buněk se zvyšuje množství transferinových receptorů na jejich povrchu. Navíc bylo zjištěno, že se ruthenium akumuluje lépe v nádorových buňkách než platina a vykazuje účinnost i u nádorů rezistentních na CP (Lucaciu et al., 2022; Parveen et al., 2019).

Některé komplexy např. NAMI-A (Obrázek č. 5) vykazují spíše antimetastatické a antiangiogenní účinky než přímou cytotoxicitu na primární nádor (Skoupilová a Hrstka, 2019).



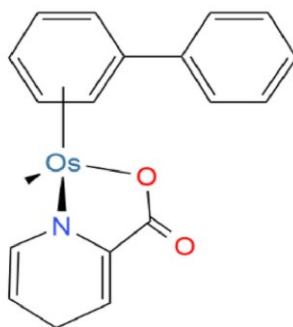
Obrázek č. 5 *Strukturní vzorec NAMI-A (Lucaciu et al., 2022) – převzato*

NAMI-A = [ImH][*trans*-RuCl₄(DMSO)(Im)], kde Im=imidazol,
DMSO=dimethylsulfoxid

6.4.2 Osmium

Zprvu se terapeutickému potenciálu osmia nevěnovala příliš pozornost. Později na základě poznatků o polosendvičových arenových komplexech Ru(II) byly vytvořeny analogy obsahující osmium (Obrázek č. 6). Komplexy Os(II) se od Ru(II) liší chemickou reaktivitou – mají pomalejší kinetiku výměny ligandů. Naopak interakce s DNA probíhá obdobně u obou typů komplexů. Prokázalo se, že vyvolávají produkci reaktivních forem kyslíku, zejména superoxidu, s následným poškozením DNA (Hearn et al., 2015; van Rijt a Sadler, 2009).

Komplexy osmia působí v mnoha případech účinněji než CP nebo komplexy ruthenia, a staly se proto perspektivní skupinou z hlediska protinádorového výzkumu (Hanif et al., 2014).



Obrázek č. 6 *Příklad Os(II) polosendvičového komplexu (Anand et al., 2024) – převzato a upraveno*

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Testované organokovové komplexy

Tabulka č. 4 Přehled testovaných sloučenin včetně jejich označení

OsPB	$[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{SCH1})(\text{PB})]\text{PF}_6$
OsABPT	$[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{ABPT})\text{Cl}]\text{PF}_6$
OsSCH1	$[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{SCH1})\text{Cl}]\text{PF}_6$
NaPB	4-fenylbutyrát sodný

Uvedené komplexy byly připraveny *de novo* a zaslány z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci panem doc. Mgr. Pavlem Štarhou, Ph.D. Základem studovaných sloučenin je osmiový komplex OsPB, který se může v závislosti na podmínkách prostředí rozpadat prostřednictvím různých degradačních procesů na tři hlavní produkty – OsSCH1, OsABPT a NaPB. Tyto degradační produkty mohou vykazovat jiné biologické vlastnosti a mít odlišný vliv na životaschopnost buněk. Cílem této práce bylo posoudit nejen cytotoxické účinky základního komplexu OsPB, ale také určit, jak se cytotoxicita jednotlivých degradačních produktů liší od původní sloučeniny. Porovnáním účinků jednotlivých komplexů lze získat komplexnější obraz o mechanismu účinku OsPB a jeho případném terapeutickém potenciálu. V jednotlivých experimentech pak byly sledované látky vždy testovány současně s cisplatinou (CP), aby se následně mohla srovnat jejich účinnost.

Chemická struktura a podrobný postup syntézy studovaných komplexů nejsou hlavním předmětem této práce, jelikož se zaměřuje především na biologické účinky těchto látek. Tím je umožněno soustředit se v hlavní části práce na experimentální hodnocení cytotoxických účinků a jejich interpretaci.

7.2 Buněčné linie

7.2.1 A2780

A2780 (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 93112519) je buněčná linie lidského karcinomu vaječníku epiteliálního typu, která byla odvozena z nádorové tkáně neléčené pacientky. Tato linie je citlivá k CP.

7.2.2 A2780cis

A2780cis (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 93112517) reprezentuje buněčnou linii rezistentní na CP. Tato rezistence byla vytvořena opakovaným působením zvyšujících se koncentrací CP na mateřskou buněčnou linii A2780. Pro zachování rezistence je třeba přidávat CP (Sigma-Aldrich) do kultivačního média s výslednou koncentrací 1 μ M každé 2-3 pasáže.

7.2.3 Kultivace

Práce s buněčnými liniemi probíhala za dodržení sterilních podmínek v prostředí laminárního boxu, který byl vždy před začátkem práce vysvícen UV světlem (30 minut). Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu, jehož složení uvádí tabulka (Tabulka č. 5), a uchovávány v inkubátoru, kde se udržovala teplota 37 °C a 5% CO₂ atmosféra.

Tabulka č. 5 Složení kultivačního média pro buněčné linie A2780 a A2780cis

Komponenty kultivačního média	Výrobce	Katalogové číslo
RPMI-1640 médium (+ 2mM glutamin)	Sigma-Aldrich	R8758-6X500ML
10% fetální bovinní sérum (FBS)	LindCare CZ s.r.o.	S1810-500
Gentamicin sulfát	Sigma-Aldrich	G1914-250MG
Penicilin G draselná sůl	BioTech a.s.	Serva 31749.04
Roztok pyruvátu sodného	Sigma-Aldrich	S8636-100ML

7.2.4 Pasážování

Pasážování představuje proces, kdy je část buněk odebrána do nového kultivačního média a přenesena do další kultivační misky. Provádí se z důvodu vysoké koncentrace buněk, která brání jejich dalšímu množení, a z důvodu vyčerpání živin z média. Tento proces se využívá pro udržení buněk ve stavu exponenciálního růstu (Masters a Stacey, 2007).

Pasážování probíhalo pravidelně a na začátku byly vždy buňky a jejich konfluence zkontrolovány pod mikroskopem. Z původní misky bylo odstraněno staré médium a buňky byly opláchnuty dvakrát 2 ml fosfátového pufru (PBS; pH 7,34). Následně byly přidány 4 ml PBS a 100 μ l 1% trypsinu, který se nechal na buňky působit po dobu 3 minut v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Po uplynutí této doby bylo pozorováno oddělení buněk pod mikroskopem, ke kterému došlo díky působení trypsinu. Poté byl obsah kultivační misky převeden do centrifugační zkumavky (15 ml). Misky byly opláchnuty 2 ml kultivačního média a obsah opět přenesen do zkumavky, čímž došlo k inaktivaci trypsinu. Po centrifugaci (10 minut, 450 g, 20 °C) byl odsát supernatant, buňky byly resuspendovány v 10 ml kultivačního média a spočítány. Část buněk byla vysazena na nové kultivační misky (TPP, Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 93100, 100 x 20 mm), doplněna médiem a vložena do inkubátoru.

7.2.5 Počítání buněk

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 20 μ l buněčné suspenze a 20 μ l trypanové modři (1:1). Po promíchání bylo nanášeno 10 μ l suspenze do obou polí Bürkerovy komůrky a živé buňky byly spočítány pod mikroskopem. Trypanová modř do živých (životaschopných) buněk neproniká, ale do mrtvých ano kvůli jejich porušené membráně. Počet buněk byl zaznamenán vždy třikrát v 25 čtvercích s dodržением zásady dvou přilehlých stran. Průměr byl následně vynásoben dvěma a takto získaný výsledek pak odpovídá počtu $\times 10^4$ buněk v 1 ml základní suspenze.

Dle objemu kultivačního média a počtu živých buněk mohly být následně nasazeny požadované počty buněk na jednotlivé experimenty.

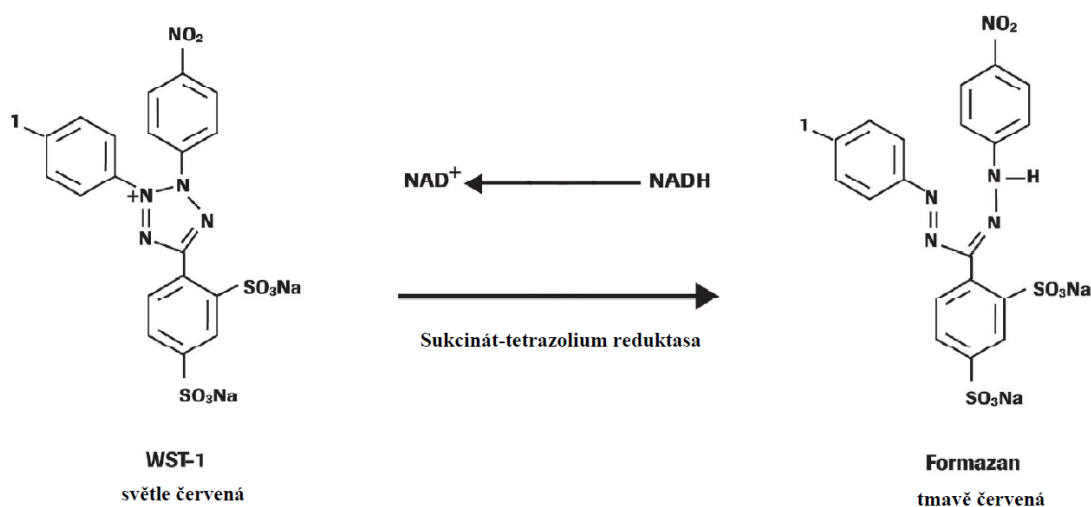
7.2.6 Mikroskopie

Snímky jednotlivých buněk byly pořízeny přímo v kulturačních miskách pomocí inverzního mikroskopu Nikon TMS a digitálního fotoaparátu Canon Eos 350D. Bylo použito zvětšení 400x.

7.3 Stanovení viability a proliferace buněk pomocí WST-1 testu

7.3.1 Princip WST-1 testu

WST-1 test je spektrofotometrická metoda, která slouží pro stanovení viability a proliferace buněk na základě měření metabolické aktivity. Test je založen na štěpení stabilní tetrazoliové soli WST-1 na rozpustný formazan (Obrázek č. 7). Tato reakce probíhá pouze na povrchu metabolicky aktivních buněk a taktéž je zčásti závislá na produkci NADPH v životaschopných buňkách. Množství vytvořeného formazanu pak přímo koreluje s množstvím metabolicky aktivních buněk (Roche, 2021).



Obrázek č. 7 Princip WST-1 testu (Roche, 2021) – převzato a upraveno

7.3.2 Pracovní postup pro WST-1 test

Na čirou 96-jamkovou mikrotitrační destičku s plochým dnem (TPP, BioTech a.s., katalogové číslo: 92096) bylo vysazeno 100 μ l buněčné suspenze o koncentraci 10 tisíc buněk A2780 na jamku. Stejným způsobem byla připravena druhá destička o koncentraci 20 tisíc buněk A2780cis na jamku. Destičky byly kultivovány 24 hodin při 37 °C a 5% CO₂ v inkubátoru.

Poté byly obě buněčné linie ovlivněny testovanými komplexy a CP v různých koncentracích uvedených v tabulce (Tabulka č. 6). Nejprve byly připraveny roztoky testovaných komplexů a CP v zásobních koncentracích a z těchto zásobních roztoků byla do mikrozkušavek vytvořena koncentrační řada. Pro ředění bylo použito kultivační médium a postupovalo se metodou dvojkového ředění. Připravené roztoky byly promíchány na vortexu a napipetovány po 100 μ l na jamku. Do jamek pro kontrolu pozadí bylo namísto toho přidáno 100 μ l kultivačního média. Taktéž byly vyčleněny jamky pro kontrolu vlivu rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) použitého pro přípravu zásobních roztoků testovaných komplexů. Roztok DMSO byl připraven z 10 μ l DMSO a 1 000 μ l kultivačního média (viz Tabulka č. 6). Destičky byly takto inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C a 5% CO₂.

Tabulka č. 6 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro WST-1 test na příkladu OsPB a OsABPT

		Konc. (μ M)	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OsPB	A	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	kontrola	kontrola	kontrola	kontrola	
	B	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	kontrola	kontrola	kontrola	kontrola	
	C	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	DMSO	DMSO	médium	médium	
OsABPT	D	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	DMSO	DMSO	médium	médium	
	E	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7					
	F	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7					
CP	G	CP0	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7					
	H	CP0	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7					
			100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781				

Kontrola = neošetřené buňky

Médium = kontrola pozadí (bez buněk)

DMSO = buňky + roztok DMSO

R0 = 14 μ l zásobního roztoku (5mM) + 1 400 μ l média; R1 = 800 μ l R0 + 800 μ l média atd.

CP0 = 120 μ l zásobního roztoku (1,6666mM) + 880 μ l média; CP1 = 500 μ l CP0 + 500 μ l média atd.

Poznámka: Analogický postup byl proveden pro obě buněčné linie i pro zbylé dvě látky (OsSCH1, NaPB).

Ke stanovení účinku komplexů a CP bylo použito WST-1 činidlo (Sigma-Aldrich, katalogové číslo: 11644807001). Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l roztoku WST, který byl získán naředěním 1 ml WST-1 činidla do 4 ml PBS. Po 3 hodinách inkubace při 37 °C a 5% CO₂ v inkubátoru byla změřena absorbance při 440 nm a při referenční vlnové

délce 690 nm pomocí přístroje Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko).

7.3.3 Statistická analýza WST-1 testu

Výsledky měření byly převedeny do programu Microsoft Office Excel. Z naměřených hodnot absorbancí (v triplikátech nebo duplikátech) byla pro každou koncentraci jednotlivých látek vypočítána průměrná hodnota absorpance, od které byla odečtena průměrná hodnota absorpance pozadí. Následně byly tyto hodnoty převedeny na procenta, kdy absorpance kontrolních buněk (neošetřených žádnou látkou) byla nastavena jako 100 %.

Pro vytvoření grafů a stanovení hodnot IC_{50} byl použit program GraphPad Prism verze 9.3.0 (GraphPad Software, USA). IC neboli inhibiční koncentrace značí takovou koncentraci testované látky, při které dochází k inhibici růstu takového procenta buněk, které je uvedeno v indexu u zkratky.

Získaná procenta životnosti i absolutní hodnoty absorbancí (osa y) byly společně s jednotlivými koncentracemi v μM (osa x) vloženy do programu. Pro stanovení hodnot IC_{50} byla použita nelineární regrese a ještě předtím bylo nutné převést koncentrace na logaritmické vyjádření. Na základě získaných hodnot IC_{50} bylo posléze rozhodnuto, se kterými komplexy se bude pokračovat v dalších experimentech.

7.4 Stanovení viability a proliferace buněk mikroskopicky

7.4.1 Princip stanovení viability (mikroskopicky)

Pro stanovení počtu živých a mrtvých buněk byla použita Bürkerova komůrka a barvení trypanovou modří. Buňky obou buněčných linií byly vždy nasazeny v duplikátu pro každý z testovaných komplexů, CP a kontrolu a následně počítány separátně.

7.4.2 Pracovní postup pro stanovení viability (mikroskopicky)

Buňky A2780 i A2780cis byly vysazeny na malé kultivační misky (Sarstedt, katalogové číslo: 83.3900, 35 x 10 mm) v počtu 0,3 milionu na misku a byly k nim přidány 2 ml kultivačního média. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C a 5% CO_2 byly

připraveny roztoky testovaných komplexů a CP v zásobních koncentracích a buňky byly ovlivněny dle rozpisu (Tabulka č. 7).

Tabulka č. 7 Ovlivnění buněk A2780 a A2780cis testovanými komplexy a CP pro stanovení viability

Buňky	Ovlivnění zásobními roztoky	Výsledná koncentrace
2x A2780	2 ml RPMI (kontrola)	-
2x A2780	2 ml RPMI + 1 μ l OsPB	2,5 μ M
2x A2780	2 ml RPMI + 1 μ l OsSCH1	2,5 μ M
2x A2780	2 ml RPMI + 3 μ l CP	2,5 μ M
2x A2780cis	2 ml RPMI (kontrola)	-
2x A2780cis	2 ml RPMI + 2 μ l OsPB	5 μ M
2x A2780cis	2 ml RPMI + 2 μ l OsSCH1	5 μ M
2x A2780cis	2 ml RPMI + 6 μ l CP	5 μ M

Zásobní roztoky: OsPB (5mM), OsSCH1 (5mM), CP (1,666mM)

Za dalších 48 hodin inkubace za stejných podmínek bylo médium z kultivačních misek přeneseno do centrifugačních zkumavek (15 ml). Následovalo opláchnutí 1 ml PBS 2x po sobě a oplachové PBS bylo vždy taktéž přeneseno do centrifugačních zkumavek. Po přidání dalšího 1 ml PBS a 25 μ l 1% trypsinu byly buňky inkubovány po dobu 3 minut při 37 °C a 5% CO₂. Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno 500 μ l kultivačního média, aby se zastavila reakce trypsinu, a lehkým poklepáním na misky ze strany bylo docíleno oddělení buněk. Pomocí pipety byly ze všech stran kultivačních misek opláchnuty přítomným obsahem ulpívající buňky a vše bylo poté přeneseno do centrifugačních zkumavek. Nakonec byly kultivační misky opět opláchnuty 1 ml PBS, které bylo také přeneseno do zkumavek. Po centrifugaci (10 minut, 450 g, 20 °C) byl odsát supernatant a peleta byla resuspendována v 1 ml kultivačního média.

Stanovení počtu živých (světlé) a mrtvých (tmavě modré) buněk bylo provedeno analogicky jako v bodě 7.2.5. Viabilita buněk byla vypočítána jako poměr celkového počtu živých buněk ku celkovému počtu buněk (živých i mrtvých), výsledné hodnoty byly vyjádřeny v procentech a jako průměr z každých dvou stanovení.

7.4.3 Výpočet doubling time buněk

Doubling time (doba zdvojení buněk) představuje čas potřebný k zdvojnásobení populace buněk. Tento parametr hraje klíčovou roli při hodnocení účinků cytotoxických látek, jako je cisplatina, protože ovlivňuje citlivost buněk na chemoterapii (Daukste et al., 2012). Na základě počtu buněk v kontrolních skupinách byl vypočítán doubling time pro obě buněčné linie. K výpočtu byl použit vzorec:

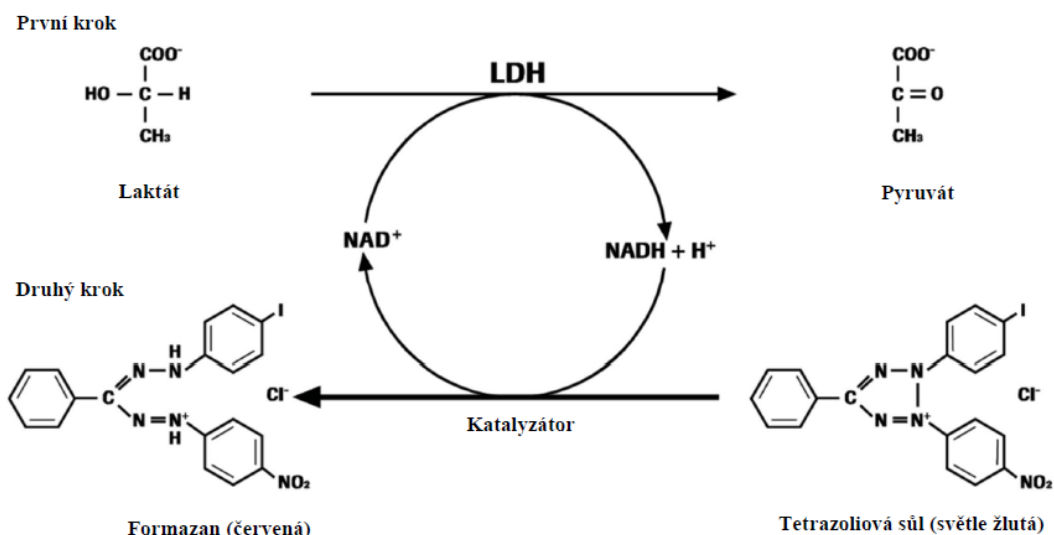
$$\text{Doubling time} = \frac{\text{doba kultivace} \times \ln(2)}{\ln \frac{\text{finální počet buněk}}{\text{počáteční počet buněk}}}$$

Obrázek č. 8 Vzorec pro výpočet doubling time

7.5 Stanovení aktivity laktátdehydrogenasy

7.5.1 Princip stanovení aktivity laktátdehydrogenasy

Laktátdehydrogenasa (LDH) je cytoplazmatický enzym přítomný ve všech buňkách. Uvolňuje se z poškozených buněk při narušení jejich plazmatické membrány jako známka buněčné smrti a měřením aktivity LDH lze kvantifikovat cytotoxický potenciál testovaných komplexů. Substráty pro LDH jsou laktát a NAD^+ a jejich přeměnou vzniká pyruvát a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Katalyzátor z použité soupravy přenáší 2H z $\text{NADH} + \text{H}^+$ na tetrazoliovou sůl, která se redukuje na formazan (Obrázek č. 9). Absorpční maximum vytvořeného formazanového barviva se pohybuje kolem 500 nm, zatímco tetrazoliová sůl nevykazuje při těchto vlnových délkách žádnou významnou absorpci. Zvýšení enzymatické aktivity LDH a tedy i množství lyzovaných buněk přímo koreluje s množstvím vytvořeného formazanu (Roche, 2020).



Obrázek č. 9 Princip stanovení aktivity LDH (Roche, 2020) – převzato a upraveno

7.5.2 Pracovní postup pro stanovení aktivity laktátdehydrogenasy

Buňky byly převedeny do kultivačního média s obsahem nízké koncentrace séra (1% FBS), jelikož séra obsahují různá množství LDH, která by mohla zvyšovat absorpční pozadí. Na čirou 96-jamkovou mikrotitrační destičku s plochým dnem (TPP, BioTech a.s., katalogové číslo: 92096) bylo nasazeno 4 tisíce buněk A2780 a 6 tisíc buněk A2780cis v 50 μl kultivačního média (1% FBS) na jamku. Kontroly tvořilo pouze 50 μl kultivačního média bez buněk (viz Tabulka č. 8). Destička byla umístěna na 24 hodin do inkubátoru (37 $^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2). Poté bylo do mikrotitrační destičky přidáno 50 μl roztoků testovaných komplexů a CP v kultivačním médiu (1% FBS) na jamku dle rozpisu (Tabulka č. 9) a následná inkubace probíhala 24 nebo 48 hodin (37 $^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2).

Tabulka č. 8 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro stanovení aktivity LDH (pipetováno v triplikátech)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LC	HC	OsPB (5 μ M)	OsSCH1 (5 μ M)	CP (5 μ M)					BC	BC	BC
B	LC	HC	OsPB (5 μ M)	OsSCH1 (5 μ M)	CP (5 μ M)					OsPB (5 μ M)	OsPB (5 μ M)	OsPB (5 μ M)
C	LC	HC	OsPB (5 μ M)	OsSCH1 (5 μ M)	CP (5 μ M)					OsSCH1 (5 μ M)	OsSCH1 (5 μ M)	OsSCH1 (5 μ M)
D										OsPB (2,5 μ M)	OsPB (2,5 μ M)	OsPB (2,5 μ M)
E										OsSCH1 (2,5 μ M)	OsSCH1 (2,5 μ M)	OsSCH1 (2,5 μ M)
F	LC	HC	OsPB (2,5 μ M)	OsSCH1 (2,5 μ M)	CP (2,5 μ M)					CP (5 μ M)	CP (5 μ M)	CP (5 μ M)
G	LC	HC	OsPB (2,5 μ M)	OsSCH1 (2,5 μ M)	CP (2,5 μ M)					CP (2,5 μ M)	CP (2,5 μ M)	CP (2,5 μ M)
H	LC	HC	OsPB (2,5 μ M)	OsSCH1 (2,5 μ M)	CP (2,5 μ M)							
	A2780cis											
	A2780											
	50 μ l média											

LC = negativní kontrola, spontánní uvolnění LDH z neošetřených buněk

HC = pozitivní kontrola, maximální uvolnitelná LDH

BC = kontrola pozadí (bez buněk), odečtena od všech ostatních hodnot

Šedá (kromě BC) = kontrola aktivity LDH v testovaných látkách

Tabulka č. 9 Ovlivnění testovanými komplexy a CP pro stanovení aktivity LDH

Komplex	Zásobní roztok 50 μ l/jamka	Výsledná koncentrace
OsPB a OsSCH1 (5 μ M)	1 ml média + 2 μ l komplexu	5 μ M
OsPB a OsSCH1 (2,5 μ M)	0,5 ml roztoku 5 μ M \uparrow + 0,5 ml média	2,5 μ M
CP (5 μ M)	1 ml média + 6 μ l CP	5 μ M
CP (2,5 μ M)	0,5 ml roztoku 5 μ M \uparrow + 0,5 ml média	2,5 μ M
LC, HC, BC	Pouze médium	-

Zásobní roztoky: OsPB (5mM), OsSCH1 (5mM), CP (1,6666mM)

Uvolňování LDH bylo stanoveno soupravou pro detekci cytotoxicity LDH (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche). Veškeré reagensie byly skladovány v lednici při 2-8 °C a před použitím lehce promíchány. Do každé jamky s pozitivní kontrolou (HC) bylo přidáno 5 μ l lyzačního roztoku a inkubováno 15 minut při laboratorní teplotě.

Mezitím byl připraven požadovaný objem reakční směsi, který byl namíchán vždy čerstvě před použitím do centrifugační zkumavky. Reakční směs obsahovala 120 μ l katalyzátoru a 5,380 ml barvícího roztoku. Katalyzátor je dodáván ve formě lyofilizátu, který byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody a po 10 minutách důkladně protřepán. Reakční směs byla přidána po 100 μ l do každé jamky a destička byla inkubována 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Nakonec byla reakce ve všech jamkách ukončena 50 μ l stop roztoku.

Destička byla vložena do přístroje Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) a po 10 sekundách třepání byla proměřena absorbance při 492 nm a při referenční vlnové délce 650 nm.

7.6 Stanovení aktivity kaspas 3/7, 8 a 9

7.6.1 Apoptóza a kaspasy

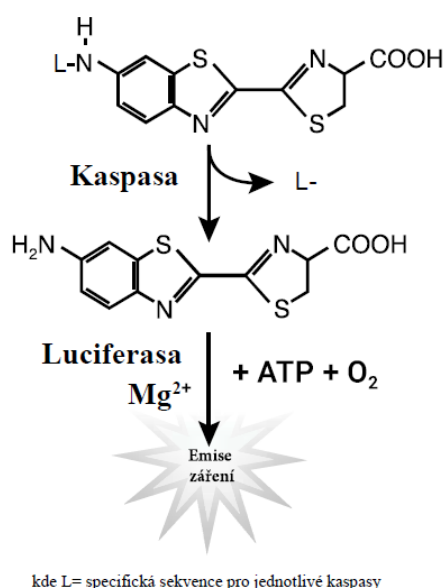
Apoptóza nebo také programovaná buněčná smrt představuje jednu z forem regulované buněčné smrti. Jedná se o fyziologický proces nezbytný pro udržení homeostázy zdravých buněčných populací a slouží k eliminaci poškozených a nepotřebných buněk. Existují dvě odlišné apoptotické dráhy (vnější a vnitřní), které aktivují kaspasy ke zprostředkování buněčné smrti komplexní kaskádou událostí. Jedná se o cysteinové proteasy a dělí se na dva základní typy – iniciační (kaspasa 2, 8, 9, 10) a efektorové (kaspasa 3, 6, 7). Regulace apoptózy zahrnuje řadu proapoptických a antiapoptických faktorů, které jsou za normálních okolností v rovnováze (Balaji et al., 2021; Elmore, 2007).

Vnitřní (mitochondriální) dráha je spuštěna na základě intracelulárních podnětů (např. poškození DNA, zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku atd.). Dojde ke zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány, z mitochondrií se uvolňuje cytochrom c, který společně s proteinem Apaf-1 a prokaspasou 9 tvoří apoptozom. To vede ke vzniku aktivované kaspasy 9. Vnější (receptorová) dráha je započata navázáním extracelulárních ligandů na membránové receptory smrti. Přenosem signálu dovnitř buňky se aktivují prokaspasa 8 a 10. Obě apoptotické dráhy se v tento okamžik

spojí do jedné, kdy aktivované iniciační kaspasy aktivují efektorové kaspasy a ty způsobí v buňce změny, které vyvrcholí apoptózou (Elmore, 2007).

7.6.2 Princip stanovení aktivity kaspas

Metoda využívá principu chemiluminiscence, kdy emise záření je vyvolána chemickou reakcí. Přidání činidla má za následek lýzu buněk a aktivované kaspasy pak rozpoznávají a následně odštěpí specifickou sekvenci z luminogenního substrátu. Substrát dále podléhá luciferázové reakci za vzniku luminiscenčního signálu, který je úměrný aktivitě přítomných kaspas (Obrázek č. 10) (Promega, 2023).



Obrázek č. 10 Princip stanovení aktivity kaspas
(Promega, 2023) – převzato a upraveno

7.6.3 Pracovní postup pro stanovení aktivity kaspas

První den byly buňky obou linií vysazeny na čtyři malé kultivační misky (Sarstedt, katalogové číslo: 83.3900, 35 x 10 mm) v počtu 0,4 milionu pro A2780 a 0,6 milionu pro A2780cis. Po 24 hodinách kultivace v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ byly buňky ovlivněny roztoky testovaných komplexů a CP v zásobních koncentracích, jak je uvedeno v tabulce (Tabulka č. 10). Poté byly vloženy do inkubátoru na dalších 24 hodin.

Tabulka č. 10 Ovlivnění buněk A2780 a A2780cis testovanými komplexy a CP pro stanovení aktivity kaspas

Buňky	Ovlivnění zásobními roztoky	Výsledná koncentrace
1x A2780, 1x A2780cis	2 ml RPMI (kontrola)	-
1x A2780	2 ml RPMI + 1 μ l OsPB	2,5 μ M
1x A2780	2 ml RPMI + 1 μ l OsSCH1	2,5 μ M
1x A2780	2 ml RPMI + 3 μ l CP	2,5 μ M
1x A2780cis	2 ml RPMI + 2 μ l OsPB	5 μ M
1x A2780cis	2 ml RPMI + 2 μ l OsSCH1	5 μ M
1x A2780cis	2 ml PRMI + 6 μ l CP	5 μ M

Zásobní roztoky: OsPB (5mM), OsSCH1 (5mM), CP (1,6666mM)

Po uplynutí inkubační doby byly buňky sklizeny a spočítány. Z buněčné suspenze bylo odebráno a nasazeno 10 tisíc buněk do každé jamky bílé 96-jamkové mikrotitrační destičky (SPL, BioTech a.s., katalogové číslo: 30196). Objem v každé jamce byl doplněn do 50 μ l kultivačním médiem a do jamek blank bylo napipetováno pouze médium.

Ke stanovení aktivity kaspas byly použity testovací soupravy Caspase-Glo® Assays (Promega) obsahující lyofilizovaný substrát a 2,5 ml pufru, které byly v čase potřeby smíchány. Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l takto připraveného činidla pro jednotlivé kaspasy (viz Tabulka č. 11).

Tabulka č. 11 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro stanovení aktivity kaspas (pipetováno v triplikátech)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
B	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
C	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
D							blank	blank	blank	blank	blank	blank
E										blank	blank	blank
F	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
G	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
H	Kontrola	Kontrola	Kontrola	OsPB	OsPB	OsPB	OsSCH1	OsSCH1	OsSCH1	CP	CP	CP
	A2780cis	Cas3/7										
	A2780	Cas8										
		Cas9										

Kontrola = neošetřené buňky

Blank = kontrola pozadí (bez buněk), pro zohlednění signálu generovaného samotným médiem

Následně byla destička vložena do přístroje Tecan Spark Multimode Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) a po 30 sekundách třepání následovala 30minutová inkubace při 25 °C, po které byla proměřena luminiscence (integration 1 000, time 100 ms).

7.7 Statistické vyhodnocení dat

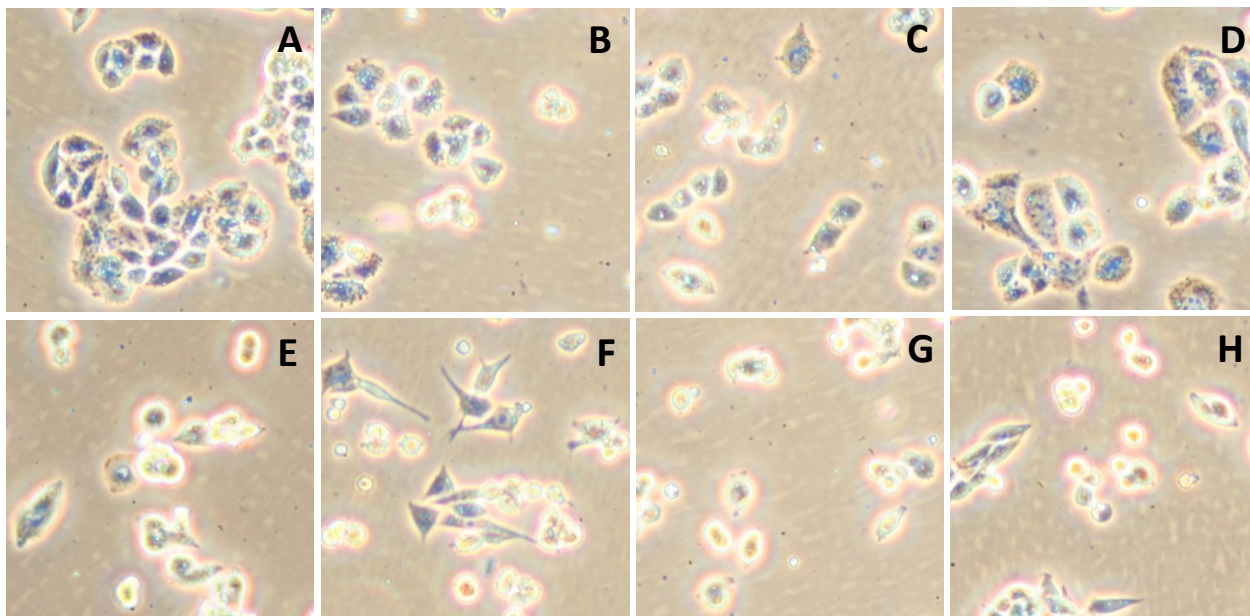
Výsledky získané v experimentech uvedených v kapitolách 7.4-7.6 byly převedeny do programu Microsoft Office Excel a zpracovány. Pro následnou statistickou analýzu byl použit program GraphPad Prism verze 9.3.0 (GraphPad Software, USA), konkrétně jednofaktorová analýza rozptylu (one-way ANOVA). Hladina významnosti odpovídá hodnotě $p < 0,05$.

8. VÝSLEDKY

V této práci jsme se věnovali studiu cytotoxických účinků komplexů osmia na buněčné linie ovariálních karcinomů A2780 a cisplatina-rezistentní A2780cis. Nejprve jsme stanovili hladinu IC_{50} u komplexu OsPB a jeho degradačních produktů OsABPT, OsSCH1 a NaPB. Na základě výsledků jsme vybrali komplexy OsPB a OsSCH1 k dalším analýzám. K důkazu cytotoxicity jsme použili stanovení laktátdehydrogenasy, stanovení viability pomocí trypanové modři a stanovení aktivity kaspas. Efekt vybraných komplexů byl srovnáván s efektem cisplatiny (CP) o stejné koncentraci.

8.1 Mikroskopie buněk A2780 a A2780cis

Při mikroskopii jsme porovnávali, jak vypadají obě buněčné linie A2780 a A2780cis. Zároveň jsme sledovali, zda lze již pouhým okem zaznamenat vliv testovaných komplexů OsPB, OsSCH1 a CP na buněčnou proliferaci a také na morfologii buněk. Z pořízených snímků (Obrázek č. 10) je patrné, že buňky A2780 (A) jsou menší, mají převážně zaoblený tvar s malým procentem podlouhlých buněk a vyskytují se v těsných shlucích. Naproti tomu buňky A2780cis (E) mají o něco větší, protáhlejší tvar a vyznačují se podstatně nižší buněčnou soudržností. Po ovlivnění testovanými komplexy a CP došlo u buněčné linie A2780 (B, C, D) k viditelné redukci počtu buněk. U buněk A2780cis byly po ovlivnění (F, G, H) patrné morfologické změny v podobě vřetenovitých tvarů.



Obrázek č. 11 Snímky z mikroskopu zachycující buněčné linie A2780 a A2780cis, zvětšení 400x
 Buňky A2780 – kontrola (A), po ovlivnění OsPB (B), OsSCH1 (C) a CP (D)
 Buňky A2780cis – kontrola (E), po ovlivnění OsPB (F), OsSCH1 (G) a CP (H)

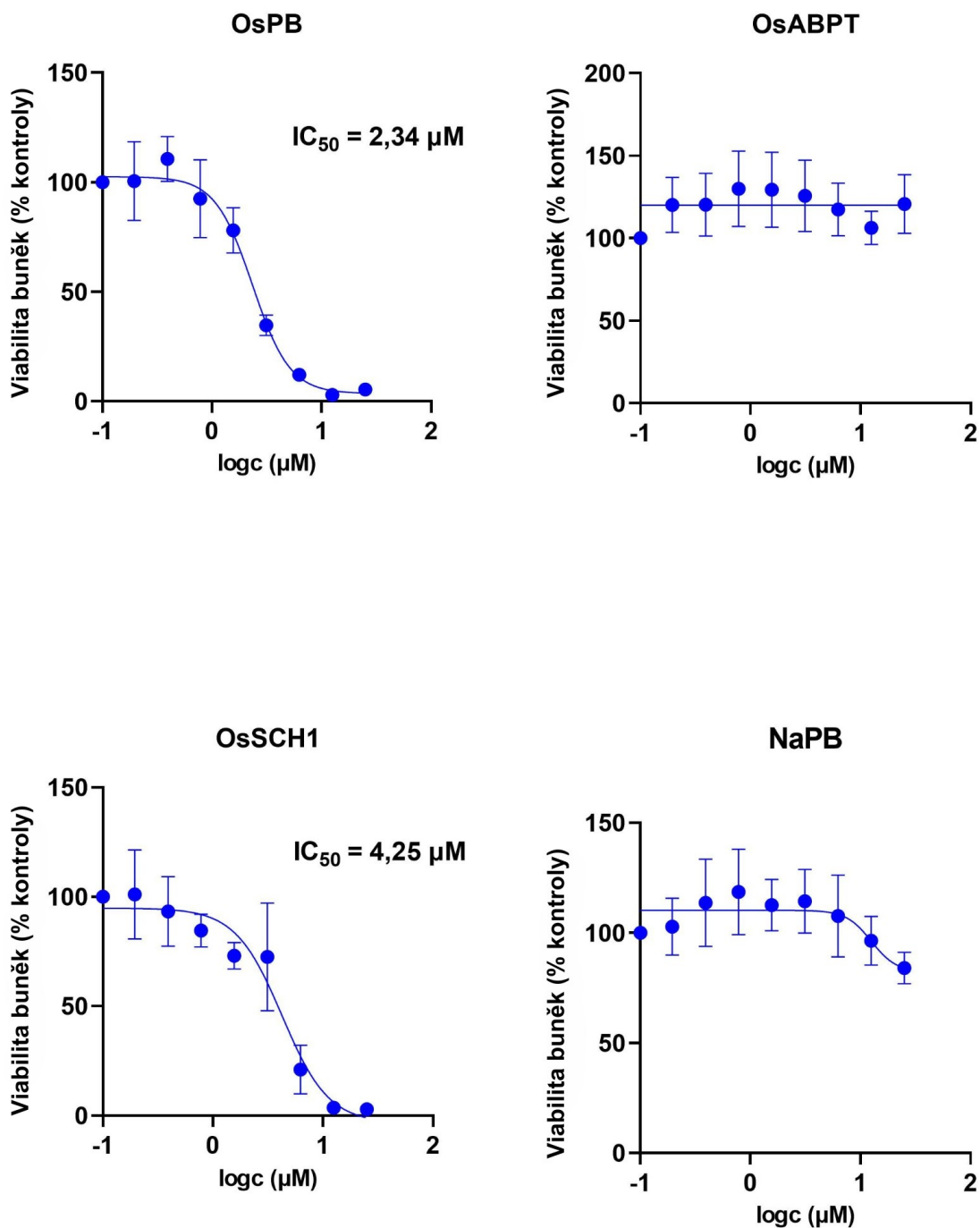
8.2 Stanovení IC_{50}

Pomocí WST-1 testu jsme testovali antiproliferační účinky čtyř sloučenin – OsPB, OsABPT, OsSCH1, NaPB a CP na buněčných liniích A2780 a A2780cis 48 hodin po ovlivnění. Výsledky byly získány jako průměr (\pm SD) z pěti nezávisle provedených měření pro každý z uvedených komplexů a CP u obou buněčných linií. Grafy (Graf č. 3, 4 a 5) jsou vyjádřeny jako závislost viability buněk v procentech na příslušných koncentracích testovaných látek v μ M (v logaritmickém vyjádření). Viabilita je vztažena ke kontrole (neošetřené buňky), která odpovídá 100 %. Z výsledných grafů byly odečteny hodnoty IC_{50} , které jsou u grafů uvedeny.

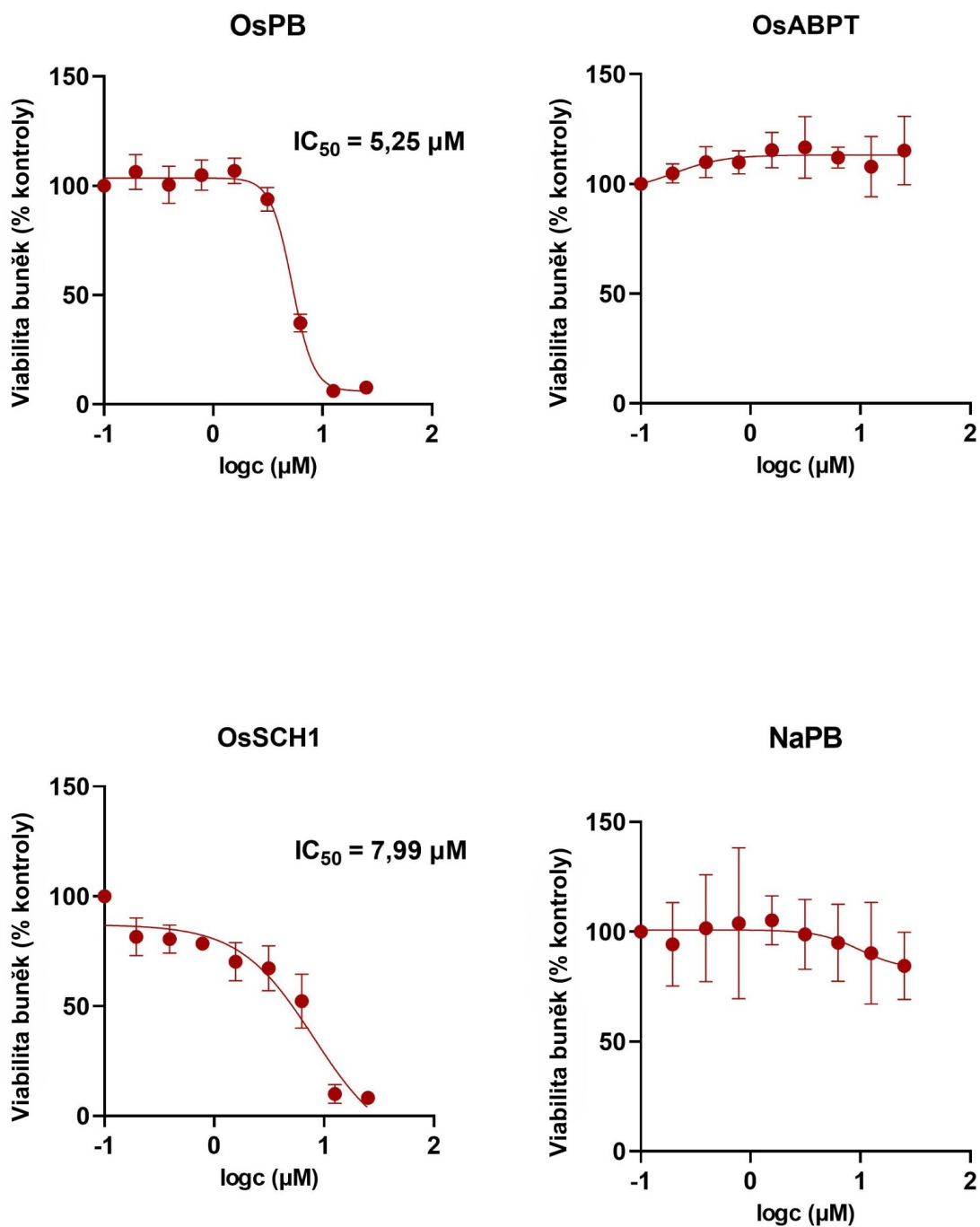
Nejnižší hodnoty IC_{50} , a tedy nejvyšší účinnost, jsme zjistili u OsPB, a to jak pro buněčnou linii A2780 ($IC_{50} = 2,34 \mu$ M), tak pro buněčnou linii A2780cis ($IC_{50} = 5,25 \mu$ M). Komplex OsSCH1 byl taktéž účinný pro buněčnou linii A2780 ($IC_{50} = 4,25 \mu$ M), tak pro buněčnou linii A2780cis ($IC_{50} = 7,99 \mu$ M). Oba komplexy inhibovaly metabolickou aktivitu o něco více u buněk citlivých na CP (A2780) – IC_{50} cca 2x nižší.

V případě CP (Graf č. 5) vyžadují rezistentní buňky A2780cis cca 3x vyšší koncentraci CP ($IC_{50} = 30,86 \mu M$) pro dosažení srovnatelné inhibice než buňky A2780 ($IC_{50} = 9,05 \mu M$).

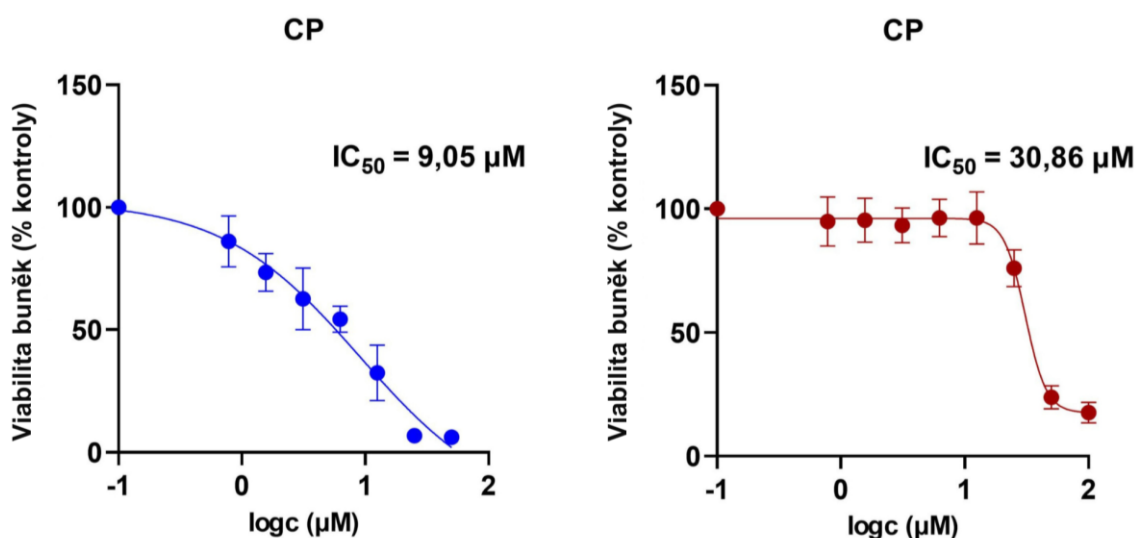
Naopak neúčinnými se ukázaly být látky OsABPT a NaPB, a to pro obě buněčné linie, a hodnoty IC_{50} nebylo možné stanovit. Z toho důvodu nebyly do dalších experimentů zahrnuty.



Graf č. 3 WST-1 test – účinek testovaných komplexů OsPB, OsABPT, OsSCH1 a NaPB na buněčnou linii A2780 s vyobrazenými IC_{50}



Graf č. 4 WST-1 test – účinek testovaných komplexů OsPB, OsABPT, OsSCH1 a NaPB na buněčnou linii A2780cis s vyobrazenými IC₅₀



Graf č. 5 WST-1 test – účinek CP na buněčnou linii A2780 (modrá) a A2780cis (červená) s vyobrazenými IC_{50}

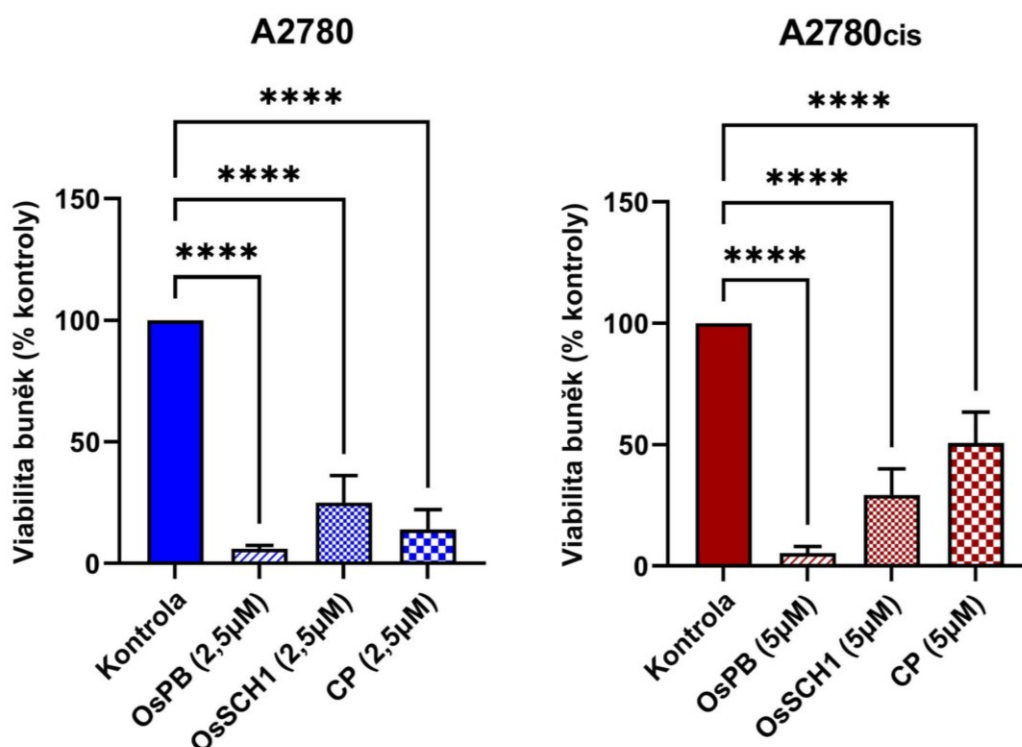
8.3 Viabilita (mikroskopicky)

Pomocí metody využívající barvení trypanovou modří a počítání živých a mrtvých buněk pod mikroskopem jsme stanovili cytotoxicitu účinných komplexů OsPB a OsSCH1 v koncentracích, které se blíží dříve stanovené IC_{50} 2,5 μ M pro linii A2780 a 5 μ M pro linii A2780cis. Tyto koncentrace byly odvozeny od IC_{50} komplexu OsPB, jelikož komplex OsSCH1 je jeho degradační produkt. CP byla použita ve stejných koncentracích jako sledované komplexy. Komplexy působily na buněčné linie A2780 a A2780cis po dobu 48 hodin. Výsledky byly získány jako průměr (\pm SD) ze tří nezávisle provedených měření pro každý z uvedených komplexů a CP u obou buněčných linií. Data v grafu (Graf č. 6) jsou vyjádřena jako procento viability buněk vztahované ke kontrole (neošetřené buňky), která odpovídá 100 %.

Pro všechny testované komplexy včetně CP byl shledán statisticky signifikantní rozdíl ve viabilitě buněk oproti kontrole u obou buněčných linií (**** $p \leq 0,0001$). Nicméně je zřejmé, že nejvýraznější cytotoxický účinek vykazoval komplex OsPB, který snížil počet životaschopných buněk na zanedbatelné hodnoty u A2780 ($6,0 \pm 1,4$ %) i A2780cis ($5,3 \pm 2,8$ %). Při použití komplexu OsSCH1 zůstala třetina až čtvrtina populace buněk A2780 a A2780cis životaschopná ($25,0 \pm 11,1$ % a $29,3 \pm 10,8$ %).

Účinek komplexů na buňky A2780 byl relativně podobný jako účinek CP ($14,0 \pm 8,2 \%$), avšak u buněk rezistentních A2780cis byly komplexy účinnější než CP ($50,7 \pm 12,7 \%$).

Na základě počtu buněk v kontrolních skupinách byl vypočítán doubling time pro A2780 (23 ± 1 h) a A2780cis (31 ± 3 h). Rychle se dělicí buňky mívající tento čas kratší, a tím bývají i citlivější na účinky cytotoxických látek.



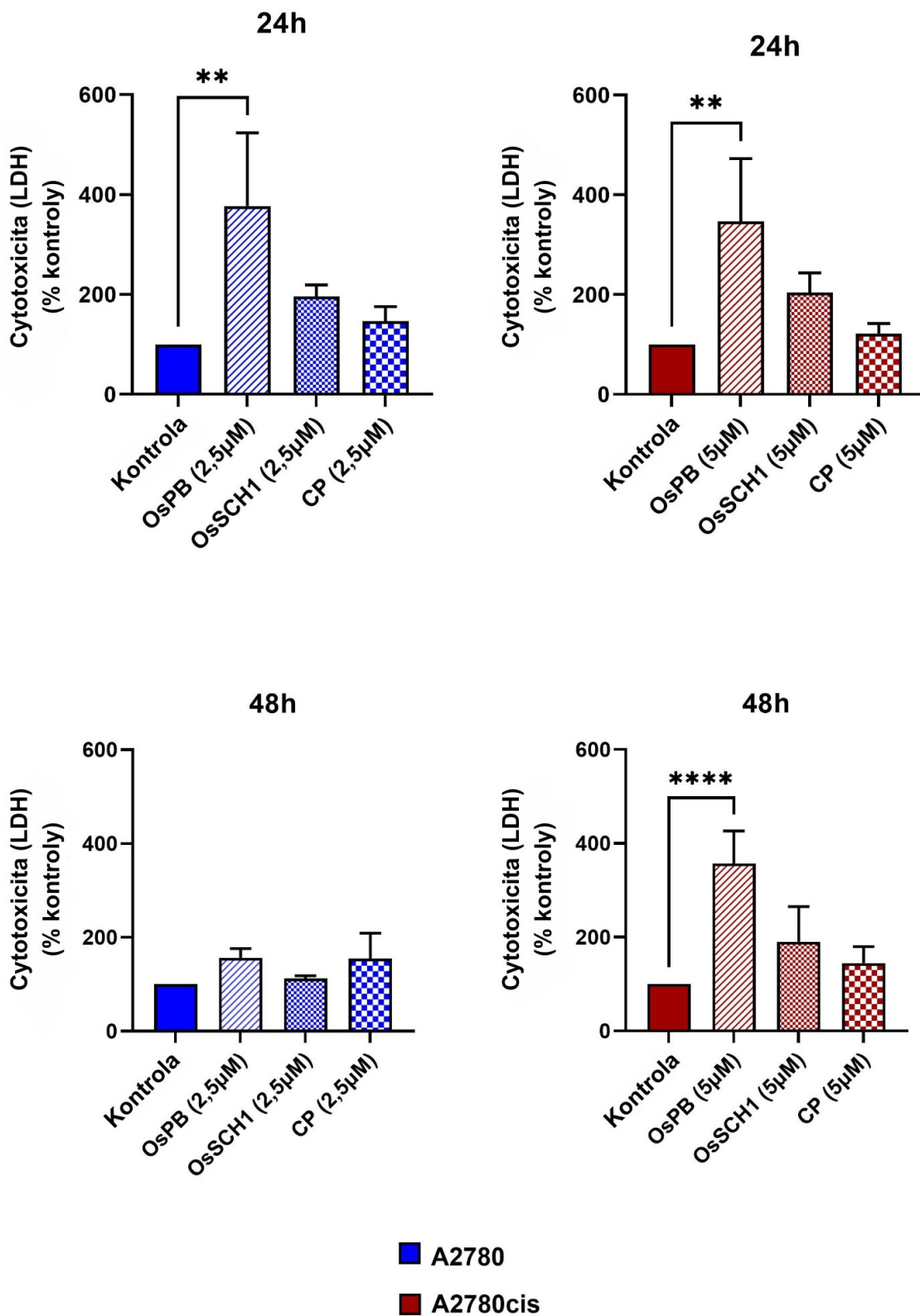
Graf č. 6 Účinek komplexů OsPB, OsSCH1 a CP na buněčné linie A2780 a A2780cis – stanoveno mikroskopicky

8.4 Aktivita laktátdehydrogenasy

LDH se uvolňuje z buněk do kultivačního média skrze poškozenou plazmatickou membránu jako známka buněčné smrti. Cytotoxicitu jsme stanovili měřením LDH za 24 a 48 hodin po ovlivnění buněčných linií A2780 a A2780cis komplexy OsPB, OsSCH1 a CP ve stejných koncentracích jako v předchozí kapitole. Výsledky byly získány jako průměr (\pm SD) ze tří nezávisle provedených měření pro každý z uvedených komplexů a CP u obou buněčných linií. Data v grafu (Graf č. 7) jsou vyjádřena jako cytotoxicita (aktivita LDH) v procentech vztažená ke kontrole (neošetřené buňky), která odpovídá 100 %.

Z grafu vyplývá, že komplex OsPB byl schopný vyvolat signifikantní zvýšení aktivity LDH, a tedy signifikantní cytotoxický účinek na buňky A2780 i A2780cis (vyjma buněk A2780 48 hodin po ovlivnění), kdy $**p \leq 0,01$ a $****p \leq 0,0001$. Hodnoty odpovídaly $377,0 \pm 146,7$ % (za 24 hodin) a $156,3 \pm 20,1$ % (za 48 hodin) u buněk A2780 a $347,3 \pm 125,2$ % (za 24 hodin) a $357,0 \pm 69,2$ % (za 48 hodin) u buněk A2780cis. V případě komplexu OsSCH1 byl cytotoxický účinek u obou linií téměř poloviční. CP indukovala nejnižší uvolnění LDH z buněk A2780 po 24 hodinách ($146,7 \pm 29,1$ %) i z buněk A2780cis po 24 hodinách ($122,0 \pm 20,1$ %) a po 48 hodinách ($144,8 \pm 35,1$ %).

V případě buněk A2780 48 hodin po ovlivnění jsme nezaznamenali žádný výrazný nárůst aktivity LDH ani u jednoho z komplexů.

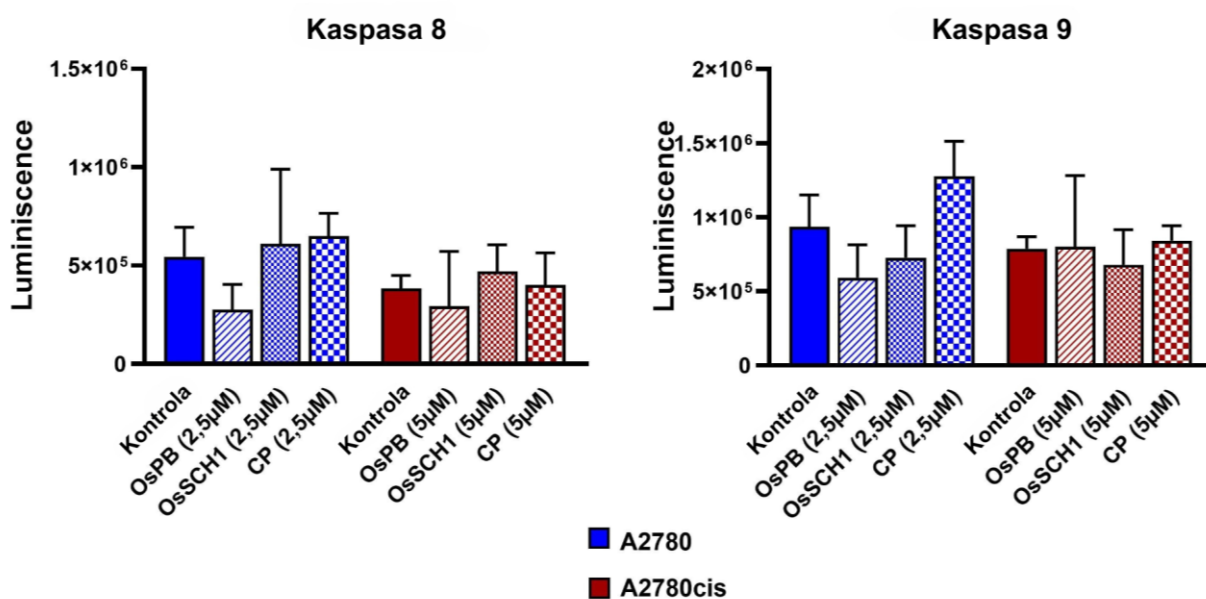


Graf č. 7 Stanovení aktivity LDH – účinek komplexů OsPB, OsSCH1 a CP na buněčné lince A2780 a A2780cis 24 a 48 hodin po ovlivnění

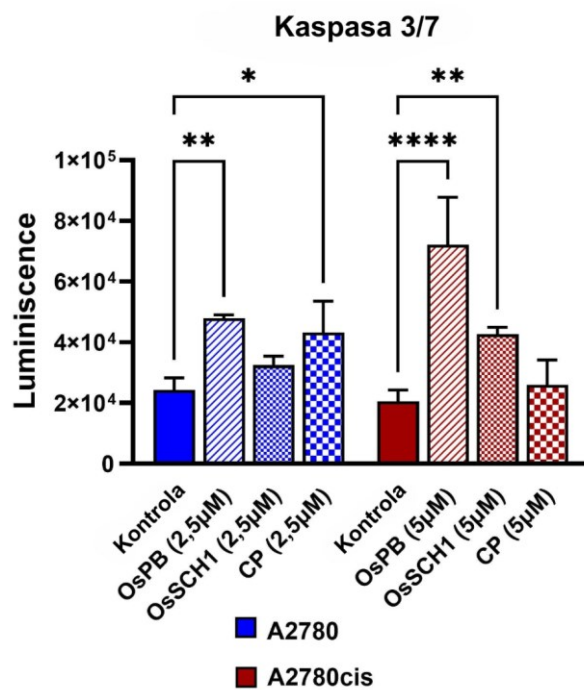
8.5 Aktivita kaspas 3/7, 8 a 9

Stanovením aktivity kaspas jsme chtěli zjistit schopnost buněk A2780 a A2780cis reagovat na účinky komplexů OsPB, OsSCH1 a CP (ve shodných koncentracích s předešlými kapitolami) indukci apoptózy. K tomuto účelu jsme využili iniciační kaspasy 3/7 a efektorové kaspasy 8 a 9. Komplexy působili na buněčné linie 24 hodin. Výsledky byly získány jako průměr (\pm SD) ze tří nezávisle provedených měření pro každý z uvedených komplexů a CP u obou buněčných linií. Data v grafech (Graf č. 8 a 9) jsou vyjádřena jako intenzita luminiscence odpovídající aktivitě jednotlivých kaspas. Kontrola reprezentuje neošetřené buňky.

Na grafech je vidět, že ani u jedné z buněčných linií nedošlo k statisticky významnému zvýšení aktivity iniciačních kaspas 8 a 9 oproti kontrole (platí pro oba komplexy i CP). Aktivita efektorových kaspas 3/7 významně vzrostla pro OsPB a CP u A2780 a pro OsPB a OsSCH1 u A2780cis (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$). U rezistentních buněk A2780cis jsme nezaznamenali účinek CP.



Graf č. 8 Stanovení aktivity iniciačních kaspas 8 a 9 v buněčných liniích A2780 a A2780cis po ovlivnění komplexy OsPB, OsSCH1 a CP



Graf č. 9 Stanovení aktivity efektorových kaspas 3/7 v buněčných liniích A2780 a A2780cis po ovlivnění komplexy OsPB, OsSCH1 a CP

9. DISKUSE

Navzdory pozoruhodným pokrokům v chápání molekulární podstaty kancerogeneze se ovariální karcinomy stále řadí na první místo v úmrtnosti mezi všemi gynekologickými nádory. Základním kamenem léčby zůstává chirurgická operace se snahou o ponechání nulového nádorového rezidua, po níž následuje chemoterapie platinovým derivátem v kombinaci s taxanem jako standardní režim. Přidání cílené léčby k chemoterapii vedlo k jistému zlepšení v oblasti terapie, zejména pak inhibitory PARP mají velmi dobré uplatnění u pacientek nesoucích mutaci v BRCA genech. U významné části pacientek (až 80 %) však dojde k recidivě s následnou rezistencí na platinu a snížením odpovědi na platinová, ale mnohdy i další dostupná cytostatika (Miras et al., 2024).

Cisplatina je celosvětově jedním z nejrozšířenějších antineoplastických léků první linie, které zaznamenaly obecný úspěch při léčbě určitých typů nádorových onemocnění, včetně ovariálního karcinomu (Habala a Valentová, 2020; Jiang et al., 2024). Nicméně i přesto, že je na počátku odpověď na chemoterapii platinovými cytostatiky vysoká, pacientky v pokročilých stádiích onemocnění umírají v důsledku relapsu a získané lékové rezistence. Mechanismus rezistence nádorových buněk je složitý a zahrnuje řadu procesů, jako např. změny ve vychytávání platiny, aktivní opravu poškozené DNA, změny v apoptotických drahách, reakce vedoucí k její deaktivaci a několik dalších. Chemoterapeutická rezistence vůči cisplatině a jejím derivátům proto představuje určitou výzvu při léčbě ovariálních karcinomů (Miras et al., 2024). Kromě toho způsobuje cisplatina systémovou toxicitu a častý rozvoj vedlejších nežádoucích účinků. Mezi orgány nejčastěji zasažené toxickými účinky cisplatiny patří ledviny, sluchové ústrojí, periferní nervový systém, játra a srdce (Romani, 2022).

Právě kvůli výše zmíněným limitacím cisplatiny v boji proti nádorovým onemocněním se začaly hledat možnosti vytvoření jejích analogů, které by disponovaly lepšími farmakologickými vlastnostmi. Záměna platiny za jiný z přechodných kovů, a tím získání nových struktur organokovových komplexů, se stalo perspektivní oblastí výzkumu protinádorové terapie posledních let (Habala a Valentová, 2020). V této práci jsme se zaměřili na organokovové komplexy na bázi osmia. Těm se začala věnovat větší

pozornost poté, co byla zjištěna slibná protinádorová aktivita (i na rezistentní buňky) u polosendvičových arenových komplexů ruthenia s cílem vytvořit jejich alternativy s osmiem. Navzdory tomu, že komplexy osmia nejsou prozkoumány v takové míře, jejich stabilita za fyziologických podmínek a také kinetická inertnost by mohly hrát ve prospěch jejich protinádorového účinku. Nejrůznější studie naznačují, že design organokovových sloučenin a volba ligandů koordinovaných na centrální atom osmia má vliv na mechanismus účinku komplexů (Hanif et al., 2014).

Vliv námi testovaných organokovových komplexů jsme sledovali na buněčných liniích karcinomu ovaria A2780 a A2780cis (linie rezistentní k cisplatině). Po ovlivnění těchto buněk vybranými komplexy byly při mikroskopii viditelné rozdíly v jejich počtu oproti kontrole zejména u linie A2780, z čehož lze usuzovat na možný vliv komplexů na buněčnou proliferaci.

Pomocí WST-1 testu jsme stanovili hodnoty IC_{50} pro námi testovaný komplex OsPB a jeho degradační produkty OsABPT, OsSCH1 a NaPB a dále také pro cisplatinu. Jako látku s nejvyšším účinkem jsme vyhodnotili OsPB pro A2780 ($IC_{50} = 2,34 \mu M$) i pro A2780cis ($IC_{50} = 5,25 \mu M$). U komplexu OsSCH1 jsme také pozorovali účinnost s hodnotami IC_{50} asi 2x vyššími než u OsPB. Nicméně totéž nebylo prokázáno u zbylých dvou látek (OsABPT, NaPB), u kterých nebylo možné IC_{50} korektně stanovit, jelikož v daných koncentracích nevykazovaly žádný efekt na snížení metabolické aktivity buněk. Nutno také podotknout, že největší rozdíl v hodnotách IC_{50} je patrný u rezistentní linie A2780cis při použití OsPB ($IC_{50} = 5,25 \mu M$) a cisplatinu ($IC_{50} = 30,86 \mu M$), na základě čehož lze konstatovat znatelný účinek komplexu v rezistentních buňkách ve srovnání s cisplatinou.

Již v minulosti se několik autorů věnovalo studiu různých organokovových komplexů na bázi osmia s povzbudivými výsledky. Například van Rijt et al. (2010) použili pro testování tutéž buněčnou linii A2780 jako v našich experimentech. Po 24 hodinách od ovlivnění několika arenovými komplexy s ligandem 4-methyl-pikolinátem stanovili hodnoty IC_{50} . Ty se pohybovaly v rozmezí 3-33 μM (u látek s nejvyšší potencí 3-7,6 μM), což je relativně ve shodě s námi získanými hodnotami. Také zjistili morfologické změny v buňkách, což poukazuje na indukci apoptózy.

Gatti et al. (2018) ve své studii zkoumali mimo jiné i antiproliferační aktivitu arenových polosendvičových komplexů ruthenia a osmia obsahujících ve své struktuře thiosemikarbazonový ligand. Za použití identických buněčných linií jako v našem případě (A2780 a A2780cis) a dále buněčné linie A549 (lidský adenokarcinom plic), HCT116 (lidský karcinom tlustého střeva) a PC3 (lidský karcinom prostaty) dospěli k závěru, že tyto komplexy obecně vykazují aktivitu vůči všem liniím a zároveň jsou aktivnější než volný thiosemikarbazonový ligand. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny pomocí SRB testu (Sulforhodamine B cytotoxicity assay) s mírně lepšími výsledky pro komplexy na bázi ruthenia. Nicméně stejně jako v našich experimentech, i zde byla na základě hodnot IC_{50} prokázána lepší účinnost komplexů na buněčné linie ovariálních karcinomů (A2780 i A2780cis) v porovnání s cisplatinou, která byla použita jako pozitivní kontrola.

Dalším cílem této práce bylo zhodnotit cytotoxické účinky dvou výše zmíněných účinných komplexů (OsPB, OsSCH1) a rovněž cisplatinu ve stejných koncentracích, které jsme zvolili dle hodnoty IC_{50} komplexu OsPB (2,5 μ M pro A2780; 5 μ M pro A2780cis). Stanovili jsme viabilitu pomocí barvení trypanovou modří, aktivitu laktátdehydrogenasy a kaspas. U komplexu OsPB byla ve všech třech analýzách na obou buněčných liniích zaznamenána statisticky signifikantní změna oproti kontrole s neošetřenými buňkami. To znamená, že při jeho použití se snížil počet životaschopných buněk na zanedbatelné množství (pro A2780 $6,0 \pm 1,4$ %; pro A2780cis $5,3 \pm 2,8$ %). Rovněž bylo detekováno značné množství uvolněné LDH jako následek poškození buněk a zvýšená aktivita efektorových kaspas 3/7 v důsledku aktivace apoptózy. Naše experimenty tedy prokázaly cytotoxické působení OsPB vůči nádorovým buňkám, včetně těch na cisplatinu rezistentních, a také lepší účinek než současně testovaná cisplatina v stejných koncentracích. Degradanční produkt OsSCH1 nepřinesl obecně tak dobré výsledky jako komplex OsPB. Počet životaschopných buněk byl redukován na asi čtvrtinu u A2780 ($25,0 \pm 11,1$ %) a na třetinu u A2780cis ($29,3 \pm 10,8$ %). Signifikantní zvýšení aktivity LDH jsme nezaznamenali ani u jedné buněčné linie a k nárůstu aktivity efektorových kaspas 3/7 došlo pouze u A2780cis.

Pro srovnání, Hearn et al. (2015) se ve své studii zaměřili na organokovový komplex $[Os(\eta^6\text{-pcym})(4\text{-}(2\text{-pyridylazo})\text{-}N,N\text{-dimethylanilin})]PF_6$ a současně také na vliv tohoto komplexu na indukci apoptózy v buňkách karcinomu ovaria A2780. Zjistili

down-regulaci kaspas 2, 6 a 9 po 12 hodinách a kaspasy 7 po 48 hodinách. Hladiny efektorové kaspasy 3 se zvýšili po 24-48 hodinách a po 72 hodinách opět klesaly. Rovněž v našem případě jsme u komplexu OsPB zaznamenali zvýšení aktivity pouze u efektorových kaspas 3/7, které jsme měřili po 24 hodinách. Práce autorů Romero-Canelón et al. (2013) se v jedné ze svých částí zabývá studiem efektu chloridových a jodidových komplexů na bázi osmia a ruthenia na aktivitu kaspasy 3. U všech testovaných komplexů prokázali po 24 hodinách aktivaci kaspasy 3 v buňkách A2780, a tím i výskyt pozdní fáze apoptózy. Výsledky byly téměř srovnatelné pro komplexy osmia i ruthenia.

Bylo prokázáno, že rychleji proliferující buňky vykazují vyšší metabolickou aktivitu, která může ovlivňovat absorpci a intracelulární distribuci látek, jako je cisplatina. Zvýšená metabolická aktivita by mohla vést k větší akumulaci léčiva uvnitř buněk a tím ke zvýšené cytotoxicitě. Jak bylo zmíněno dříve, cisplatina primárně poškozuje DNA tím, že vytváří intra- a intermolekulární zkřížené vazby, které narušují její replikaci a transkripci. Tento mechanismus působení ovlivňuje především buňky nacházející se v S-fázi, kdy dochází k replikaci DNA, a v G2-fázi buněčného cyklu, která předchází mitóze. Rychleji se dělící buňky se nacházejí v těchto fázích častěji než buňky s delším doubling time, což je činí náchylnějšími k poškození DNA vyvolanému cisplatinou. V důsledku toho může být cytotoxický účinek léčiva v těchto buňkách výraznější. Naproti tomu, pomaleji se dělící buňky mají delší časové intervaly mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu, což jim umožňuje efektivnější aktivaci reparačních mechanismů a tím i snížení účinků léčiva. Tato souvislost potvrzuje, že rychlost buněčného cyklu je významným faktorem ovlivňujícím účinnost protinádorové terapie založené na cisplatině (Aldossary, 2019; Galluzzi et al., 2012). Z našich výsledků vyplývá, že testované komplexy vykazovaly vyšší účinnost na rychleji proliferující buněčné linii A2780 ve srovnání s pomaleji se dělící linií A2780cis. Toto zjištění je v souladu s efektem cisplatinu na buňky s různým doubling time.

V souhrnu tato práce potvrzuje, že komplexy na bázi osmia by mohly být slibnými protirakovinnými látkami, přičemž volbou ligandů lze ovlivnit jejich reaktivitu a vnést do molekul požadované vlastnosti, jak popsal i Hanif et al. (2014). V kontextu výše zmíněných publikací je patrné, že jejich další zkoumání a pochopení mechanismu

účinku by mohlo do budoucna významně přispět k překonání nevýhod klasické chemoterapie na bázi platiny.

10. ZÁVĚR

V oblasti problematiky nejen ovariálních karcinomů, ale i nádorových onemocnění obecně, je stále diskutovaným tématem rezistence nádorových buněk, která následně způsobí selhání chemoterapeutické léčby. Vývoj a výzkum inovativních organokovových komplexů na bázi jiných přechodných kovů než platina se stal jednou z možných strategií, jež by mohla tento problém vyřešit.

V rámci této diplomové práce jsme testovali několik organokovových komplexů na bázi osmia pomocí *in vitro* experimentů na buněčných liniích ovariálních karcinomů A2780 a A2780cis (rezistentní na cisplatinu). K příznivým výsledkům jsme dospěli zejména u komplexu OsPB, který vykazoval vyšší cytotoxické účinky ve srovnání s cisplatinou. Z práce tedy vyplývá, že organokovové komplexy na bázi osmia by mohly být v oblasti protinádorové terapie do budoucna užitečné.

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Proces kancerogeneze EOC z prekursorových lézí (Müllerová et al., 2016) – převzato	20
Obrázek č. 2 Mechanismus účinku PARP inhibitorů – olaparib (Ševčík, 2017) – převzato	32
Obrázek č. 3 Tvorba DNA aduktů s cisplatinou (Ghosh, 2019) – převzato a upraveno..	35
Obrázek č. 4 Strukturní vzorce cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny (Lucaciu et al., 2022) – převzato a upraveno	37
Obrázek č. 5 Strukturní vzorec NAMI-A (Lucaciu et al., 2022) – převzato	39
Obrázek č. 6 Příklad Os(II) polosendvičového komplexu (Anand et al., 2024) – převzato a upraveno	39
Obrázek č. 7 Princip WST-1 testu (Roche, 2021) – převzato a upraveno	43
Obrázek č. 8 Vzorec pro výpočet doubling time	47
Obrázek č. 9 Princip stanovení aktivity LDH (Roche, 2020) – převzato a upraveno.....	48
Obrázek č. 10 Princip stanovení aktivity kaspas (Promega, 2023) – převzato a upraveno	51
Obrázek č. 11 Snímky z mikroskopu zachycující buněčné linie A2780 a A2780cis, zvětšení 400x	55

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Histopatologická klasifikace EOC (Kolařík et al., 2008) – převzato z textu a upraveno do tabulky	17
Tabulka č. 2 Dualistický model karcinomů ovaria (Fínek a Zikán, 2023) – převzato z textu a upraveno do tabulky	18
Tabulka č. 3 Využití zobrazovacích metod v diagnostice a stagingu ovariálních malignit (Fínek a Zikán, 2023) – převzato a upraveno.....	26
Tabulka č. 4 Přehled testovaných sloučenin včetně jejich označení	40
Tabulka č. 5 Složení kultivačního média pro buněčné linie A2780 a A2780cis	41
Tabulka č. 6 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro WST-1 test na příkladu OsPB a OsABPT.....	44
Tabulka č. 7 Ovlivnění buněk A2780 a A2780cis testovanými komplexy a CP pro stanovení viability	46
Tabulka č. 8 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro stanovení aktivity LDH (pipetováno v triplikátech)	49
Tabulka č. 9 Ovlivnění testovanými komplexy a CP pro stanovení aktivity LDH	49
Tabulka č. 10 Ovlivnění buněk A2780 a A2780cis testovanými komplexy a CP pro stanovení aktivity kaspas	52
Tabulka č. 11 Schéma rozložení mikrotitrační destičky pro stanovení aktivity kaspas (pipetováno v triplikátech)	52

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Vývoj incidence a mortality zhoubných nádorů vaječníku v České republice v čase (Krejčí et al., 2021) – převzato	23
Graf č. 2 Věkové složení zhoubných nádorů vaječníku u žen v letech 2017-2021 (Krejčí et al., 2021) – převzato	24
Graf č. 3 WST-1 test – účinek testovaných komplexů OsPB, OsABPT, OsSCH1 a NaPB na buněčnou linii A2780 s vyobrazenými IC ₅₀	56
Graf č. 4 WST-1 test – účinek testovaných komplexů OsPB, OsABPT, OsSCH1 a NaPB na buněčnou linii A2780cis s vyobrazenými IC ₅₀	57
Graf č. 5 WST-1 test – účinek CP na buněčnou linii A2780 (modrá) a A2780cis (červená) s vyobrazenými IC ₅₀	58
Graf č. 6 Účinek komplexů OsPB, OsSCH1 a CP na buněčné linie A2780 a A2780cis – stanoveno mikroskopicky	59
Graf č. 7 Stanovení aktivity LDH – účinek komplexů OsPB, OsSCH1 a CP na buněčné linie A2780 a A2780cis 24 a 48 hodin po ovlivnění	61
Graf č. 8 Stanovení aktivity iniciačních kaspas 8 a 9 v buněčných liniích A2780 a A2780cis po ovlivnění komplexy OsPB, OsSCH1 a CP	62
Graf č. 9 Stanovení aktivity efektorových kaspas 3/7 v buněčných liniích A2780 a A2780cis po ovlivnění komplexy OsPB, OsSCH1 a CP	63

14. POUŽITÁ LITERATURA

1. ADAM, Zdeněk; KREJČÍ, Marta a VORLÍČEK, Jiří, c2010. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-648-9. Dostupné také z: <https://www.bookport.cz/kniha/specialni-onkologie-3561/>.
2. ALDOSSARY, Sara A., 2019. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. Online. *Biomedical and Pharmacology Journal*. Roč. 12, č. 1, s. 07-15. ISSN 09746242. Dostupné z: <https://doi.org/10.13005/bpj/1608>. [cit. 2025-03-05].
3. ANAND, Tanmay; SINGH, Chandra Kant; V, Nitin a SINGH, Chandra Kant, 2024. Role of organometallic complexes in targeted therapies of different diseases: Infectious diseases, cancer and neurodegenerative Diseases. Online. *Journal of Organometallic Chemistry*. Roč. 1022. ISSN 0022328X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2024.123389>. [cit. 2025-02-15].
4. BALAJI, Swapnaa; TERRERO, David; TIWARI, Amit K.; ASHBY, Charles R. a RAMAN, Dayanidhi, 2021. Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. Online. *Apoptosis in Health and Disease - Part B. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. s. 91-122. ISBN 9780323853170. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.005>. [cit. 2025-02-12].
5. BOUDA, Jiří; PRESL, Jiří; VLASÁK, Pavel; KOSTŮN, Jan a SLUNÉČKO, Robert, 2018. Nový pohled na etiopatogenezi ovariálního karcinomu. Online. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. Roč. 10, s. 19-22. ISSN 1803-9588. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2018_218.pdf. [cit. 2024-12-15].
6. BÜCHLER, Tomáš, [2023]. *Klinická onkologie*. Jessenius. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-758-7.

7. DASARI, Shaloam a TCHOUNWOU, Paul Bernard, 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. Online. *European Journal of Pharmacology*. Roč. 740, s. 364-378. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. [cit. 2025-02-12].
8. DAUKSTE, Liene; BASSE, Britta; BAGULEY, Bruce C. a WALL, David J. N., 2012. Mathematical Determination of Cell Population Doubling Times for Multiple Cell Lines. Online. *Bulletin of Mathematical Biology*. Roč. 74, č. 10, s. 2510-2534. ISSN 0092-8240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11538-012-9764-7>. [cit. 2025-03-05].
9. ELMORE, Susan, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Online. *Toxicologic Pathology*. Roč. 35, č. 4, s. 495-516. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>. [cit. 2025-02-20].
10. ENGBERSEN, Maurits Peter; VAN DRIEL, Willemien; LAMBREGTS, Doenja a LAHAYE, Max, 2021. The role of CT, PET-CT, and MRI in ovarian cancer. Online. *The British Journal of Radiology*. Roč. 94, č. 1125. ISSN 0007-1285. Dostupné z: <https://doi.org/10.1259/bjr.20210117>. [cit. 2025-02-05].
11. FERANEC, Richard a MOUKOVÁ, Lucie, 2013. Preinvasive Lesions in Gynaecology – Ovary. Online. *Klinická onkologie*. Roč. 26, s. 54-55. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2013S54>. [cit. 2024-12-15].
12. FERRARO, Giarita; MASSAI, Lara; MESSORI, Luigi a MERLINO, Antonello, 2015. Cisplatin binding to human serum albumin: a structural study. Online. *Chemical Communications*. Roč. 51, č. 46, s. 9436-9439. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5CC01751C>. [cit. 2025-02-13].
13. FÍNEK, Jindřich a ZIKÁN, Michal, [2023]. *Karcinom ovaria*. Druhé vydání. Farmakoterapie. Praha: Farmakon Press, spol. s r.o. ISBN 978-80-907656-6-5.

14. FISCHEROVÁ, Daniela; ZIKÁN, Michal; PINKAVOVÁ, Ivana; SLÁMA, Jiří; FREITAG, Pavel et al., 2012. Předoperační diagnostika ovariálních nádorů. Online. *Onkologie*. Roč. 6, č. 2, s. 59-64. ISSN 1802-4475. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201202-0003_Predoperacni_diagnostika_ovarialnich_nadoru.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dp%25F8edopera%25E8n%25ED%2Bdiagnostika%26sfrom%3D0%26spage%3D30. [cit. 2024-12-17].
15. GALLUZZI, L.; SENOVILLA, L.; VITALE, I.; MICHELS, J.; MARTINS, I. et al., 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Online. *Oncogene*. Roč. 31, č. 15, s. 1869-1883. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>. [cit. 2025-03-05].
16. GATTI, Anna; HABTEMARIAM, Abraha; ROMERO-CANELÓN, Isolda; SONG, Ji-Inn; HEER, Bindy et al., 2018. Half-Sandwich Arene Ruthenium(II) and Osmium(II) Thiosemicarbazone Complexes: Solution Behavior and Antiproliferative Activity. Online. *Organometallics*. Roč. 37, č. 6, s. 891-899. ISSN 0276-7333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00875>. [cit. 2025-03-29].
17. GHOSH, Sumit, 2019. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Online. *Bioorganic Chemistry*. Roč. 88. ISSN 00452068. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>. [cit. 2025-02-11].
18. GOFF, Barbara, 2012. Symptoms Associated With Ovarian Cancer. Online. *Clinical obstetrics and gynecology*. Roč. 55, č. 1, s. 36-42. ISSN 0009-9201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182480523>. [cit. 2024-12-16].
19. HABALA, Ladislav a VALENTOVÁ, Jindra, 2020. Komplexy kovov v medicíne a farmácii – minulosť a súčasnosť II*. Online. *Česká a slovenská farmacie*. Roč. 69, s. 3-16. ISSN 1210-7816. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2020-1-24/komplexy-kovov-v-medicine-a-farmacii-minulost-a-sucasnost-ii-122469>. [cit. 2025-03-03].

20. HANIF, Muhammad; BABAK, Maria V. a HARTINGER, Christian G., 2014. Development of anticancer agents: wizardry with osmium. Online. *Drug Discovery Today*. Roč. 19, č. 10, s. 1640-1648. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.016>. [cit. 2025-03-03].
21. HEARN, Jessica M.; ROMERO-CANELÓN, Isolda; MUNRO, Alison F.; FU, Ying; PIZARRO, Ana M. et al., 2015. Potent organo-osmium compound shifts metabolism in epithelial ovarian cancer cells. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 112, č. 29. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1500925112>. [cit. 2025-02-14].
22. CHANDRA, Ashwin; PIUS, Cima; NABEEL, Madiha; NAIR, Maya; VISHWANATHA, Jamboor K. et al., 2019. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. Online. *Cancer Medicine*. Roč. 8, č. 16, s. 7018-7031. ISSN 2045-7634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cam4.2560>. [cit. 2025-02-12].
23. CHOVANEC, Josef, 2016. *Epidemiologie, diagnostika a screening ovariálního karcinomu*. Online. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/epidemiologie-diagnostika-a-screening-ovarialniho-karcinomu/>. [cit. 2024-12-16].
24. CHOVANEC, Josef; NOVÁK, Petr; HOLANOVÁ, Eva a KOLÁŘOVÁ, Helena, 2011. *Nové strategie v léčbě karcinomu ovaria?* Online. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/nove-strategie-v-lecbe-karcinomu-ovaria/>. [cit. 2025-01-30].
25. JELOVAC, Danijela a ARMSTRONG, Deborah K., 2011. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. Online. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Roč. 61, č. 3, s. 183-203. ISSN 00079235. Dostupné z: <https://doi.org/10.3322/caac.20113>. [cit. 2025-02-05].

26. JIANG, Chenying; SHEN, Chenjun; NI, Maowei; HUANG, Lili; HU, Hongtao et al., 2024. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer. Online. Roč. 11, č. 6. ISSN 23523042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.06.032>. [cit. 2025-03-03].
27. JIN, Chengwen; YUAN, Mingyuan; BU, Hualei; JIN, Chengjuan a TOMAO, Federica, 2022. Antiangiogenic Strategies in Epithelial Ovarian Cancer: Mechanism, Resistance, and Combination Therapy. Online. *Journal of Oncology*. Roč. 2022, s. 1-15. ISSN 1687-8469. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2022/4880355>. [cit. 2025-03-26].
28. KLÁT, Jaroslav, 2012. Primární chirurgická léčba karcinomu ovaria. Online. *Onkologie*. Roč. 6, č. 2, s. 71-73. ISSN 1802-4475. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201202-0006_Primarni_chirurgicka_lecba_karcinomu_ovaria.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dprim%25E1rn%25ED%2Bchirurgick%25E1%2BI%25E9%25E8ba%26sfro m%3D0%26spage%3D30. [cit. 2025-02-01].
29. KLENER, Pavel a KLENER, Pavel, 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4171-0.
30. KOLAŘÍK, Dušan; HALAŠKA, Michael a FEYEREISL, Jaroslav, c2008. *Repetitorium gynekologie*. Jessenius. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-138-7. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:53fca1c0-9e29-11e3-8e84-005056827e51>.
31. KOSSAÏ, Myriam; LEARY, Alexandra; SCOAZEC, Jean-Yves a GENESTIE, Catherine, 2018. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. Online. *Pathobiology*. 2018-5-8, roč. 85, č. 1-2, s. 41-49. ISSN 1015-2008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000479006>. [cit. 2024-12-15].
32. KOSTŮN, Jan; VLASÁK, Pavel; KOSTŮN, Jan; BOUDA, Jiří a PRESL, Jiří, 2018. Význam chirurgie ovariálního karcinomu. Online. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. Roč. 10, s. 10-13. ISSN 1803-9588. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2018_216.pdf. [cit. 2025-02-01].

33. KOTALA, Vladimír; ULDRIJAN, Stjepan; NENUTIL, Rudolf a VOJTĚŠEK, Bořivoj, 2002. Protein p53 a protinádorová terapie. Online. *Klinická onkologie*. Roč. 15, č. 3, s. 98-101. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2002-06-15-3/protein-p53-a-protinadorova-terapie/>. [cit. 2024-12-15].
34. KREJČÍ, Denisa; MUŽÍK, Jan a DUŠEK, Ladislav, [2021]. Novotvary 2019-2021 ČR: Cancer incidence 2019-2021 in the Czech Republic. Online. *Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky*. ISSN 1210-857X. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008447/novotvary2019-2021.pdf>. [cit. 2024-12-16].
35. LHEUREUX, Stephanie; BRAUNSTEIN, Marsela a OZA, Amit M., 2019. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. Online. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Roč. 69, č. 4, s. 280-304. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <https://doi.org/10.3322/caac.21559>. [cit. 2025-02-05].
36. LUCACIU, Roxana Liana; HANGAN, Adriana Corina; SEVASTRE, Bogdan a OPREAN, Luminița Simona, 2022. Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future. Online. *Molecules*. Roč. 27, č. 19. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27196485>. [cit. 2025-02-12].
37. MALANDER, Sussane; HJERPE, Elisabet; CARLSON, Joseph a BORG, Åke, 2015. Ovarialcancer är på många sätt en heterogen sjukdom: Ovarian cancer is in many ways a heterogeneous disease. Online. *Läkartidningen*. Roč. 112. ISSN 1652-7518. Dostupné z: <https://lakartidningen.se/klinik-och-vetenskap-1/artiklar-1/klinisk-oversikt/2015/12/ovarialcancer-ar-pa-manga-satt-en-heterogen-sjukdom/>. [cit. 2024-12-15].
38. MARCHETTI, Claudia; DE FELICE, Francesca; ROMITO, Alessia; IACOBELLI, Valentina; SASSU, Carolina Maria et al., 2021. Chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer: Mechanisms and emerging treatments. Online. *Seminars in Cancer Biology*. Roč. 77, s. 144-166. ISSN 1044579X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2021.08.011>. [cit. 2025-02-12].

39. MASTERS, John R. a STACEY, Glyn N., 2007. Changing medium and passaging cell lines. Online. *Nature Protocols*. Roč. 2, č. 9, s. 2276-2284. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>. [cit. 2025-02-18].
40. MINLIKEEVA, Albina N. a MOYSICH, Kirsten B., 2019. An aspirin a day keeps ovarian cancer at bay? Online. *Expert Review of Anticancer Therapy*. Roč. 19, č. 7, s. 541-542. ISSN 1473-7140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1626722>. [cit. 2024-12-16].
41. MIRAS, Isabel; ESTÉVEZ-GARCÍA, Purificación a MUÑOZ-GALVÁN, Sandra, 2024. Clinical and molecular features of platinum resistance in ovarian cancer. Online. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Roč. 201. ISSN 10408428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104434>. [cit. 2025-03-03].
42. MOGOS, Raluca; POPOVICI, Razvan; TANASE, Adina; CALISTRU, Tudor; POPOVICI, Paula et al., 2022. New approaches in ovarian cancer based on genetics and carcinogenesis hypotheses (Review). Online. *Experimental and Therapeutic Medicine*. Roč. 23, č. 6. ISSN 1792-0981. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11351>. [cit. 2024-12-16].
43. MOUKOVÁ, Lucie, 2023. *Léčba ovariálního karcinomu*. Online. Profi Medicína. Dostupné z: <https://profimedicina.cz/lecba-ovarialniho-karcinomu/>. [cit. 2024-12-15].
44. MÜLLEROVÁ, Zuzana; MÜLLER, Tomáš; SKŘIVANOVÁ, Kateřina; VOJTĚŠEK, Bořivoj a MÜLLER, Petr, 2016. Molecular Mechanisms of Carcinogenesis of Epithelial Ovarian Cancers. Online. *Klinická onkologie*. Roč. 29, č. Suppl 4, s. 4S46-4S53. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko20164S46>. [cit. 2024-12-15].
45. NÁLEŽINSKÁ, Monika; LAKOMÝ, Radek a CHOVANEC, Josef, 2021. Immunotherapy in gynaecological oncology. Online. *Onkologie*. Roč. 15, č. 3, s. 105-111. ISSN 1802-4475. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/xon.2021.019>. [cit. 2025-02-04].

46. NOVÝ, František, 2012. Antiangiogenní léčba ovariálního karcinomu. Online. *Onkologie*. Roč. 6, č. 2, s. 68-70. ISSN 1802-4475. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201202-0005_Antiangiogeni_lecba_ovarialniho_karcinomu.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dantiangiogen%25ED%26sfrom%3D0%26spage%3D30. [cit. 2025-02-04].
47. O'MALLEY, David M., 2019. New Therapies for Ovarian Cancer. Online. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Roč. 17, č. 5.5, s. 619-621. ISSN 1540-1405. Dostupné z: <https://jncn.org/view/journals/jncn/17/5.5/article-p619.xml?content=pdf-7340>. [cit. 2024-02-05].
48. ORIO, Giuseppe Carlo; MARTINI, Stefania; ARCADIPANE, Francesca; RICARDI, Umberto a FRANCO, Pierfrancesco, 2019. The role of radiotherapy in epithelial ovarian cancer: a literature overview. Online. *Medical Oncology*. Roč. 36, č. 7. ISSN 1357-0560. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1287-8>. [cit. 2025-02-04].
49. PARVEEN, Sabiha; ARJMAND, Farukh a TABASSUM, Sartaj, 2019. Development and future prospects of selective organometallic compounds as anticancer drug candidates exhibiting novel modes of action. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 175, s. 269-286. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.062>. [cit. 2025-02-14].
50. POKHRIYAL, Ruchika; HARIPRASAD, Roopa; KUMAR, Lalit a HARIPRASAD, Gururao, 2019. Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. Online. *Biomarkers in Cancer*. Roč. 11. ISSN 1179-299X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1179299X19860815>. [cit. 2025-02-12].
51. PRESL, Jiří; BOUDA, Jiří; VLASÁK, Pavel; KOSTŮN, Jan a BEREZOVSKIY, Denis, 2018. Hereditární riziko ovariálního karcinomu a profylaktická opatření. Online. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. Roč. 10, s. 14-18. ISSN 1803-9588. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/en_2018_217.pdf. [cit. 2024-12-15].

52. PROMEGA, 2023. *Caspase-Glo® 3/7 Assay: Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093*. Online. Dostupné z: https://scv10mr-cdnpre-p-cus-00.azureedge.net/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?rev=1f820c7a060d4994a70245f7b858a0da&sc_lang=en&gl=1*11qsob1*_gcl_au*NTMwMDQ0NzAzLjE3Mzk5NTc0NTI.*_ga*NTI0ODY4MzY2LjE3Mzk5MTYxMjI.*_ga_3KTGR4JGE1*MTczOTk4NTIyNy40LjEuMTczOTk4NTM4OC4yNy4wLjA.. [cit. 2025-02-20].
53. REID, Brett M.; PERMUTH, Jennifer B. a SELLERS, Thomas A., 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. Online. *Cancer Biol Med*. Roč. 14, č. 1, s. 9-32. ISSN 2095-3941. Dostupné z: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>. [cit. 2024-12-16].
54. ROB, Lukáš; MARTAN, Alois a CITTERBART, Karel, 2008. *Gynekologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-501-7.
55. ROETT, Michelle A. a EVANS, Patricia, 2009. Ovarian Cancer: An Overview. Online. *American Family Physician*. Roč. 80, č. 6, s. 609-616. ISSN 1532-0650. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2009/0915/p609.html#prognosis>. [cit. 2024-12-16].
56. ROCHE, 2020. *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. Online. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/167/504/11644793001.pdf>. [cit. 2025-02-19].
57. ROCHE, 2021. *Cell Proliferation Reagent WST-1*. Online. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/218/542/cellpro-ro.pdf>. [cit. 2025-02-20].
58. ROMANI, Andrea M.P., 2022. Cisplatin in cancer treatment. Online. *Biochemical Pharmacology*. Roč. 206. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115323>. [cit. 2025-03-03].

59. ROMERO-CANELÓN, Isolda; SALASSA, Luca a SADLER, Peter J., 2013. The Contrasting Activity of Iodido versus Chlorido Ruthenium and Osmium Arene Azo- and Imino-pyridine Anticancer Complexes: Control of Cell Selectivity, Cross-Resistance, p53 Dependence, and Apoptosis Pathway. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 56, č. 3, s. 1291-1300. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jm3017442>. [cit. 2025-03-30].
60. ROZTOČIL, Aleš, 2024. *Moderní gynekologie. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: GRADA Publishing. ISBN 978-80-271-2005-5.
61. SAMBASIVAN, Suchetha, 2022. Epithelial ovarian cancer: Review article. Online. *Cancer Treatment and Research Communications*. Roč. 33. ISSN 24682942. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100629>. [cit. 2025-02-05].
62. SÁNCHEZ-PRIETO, Manuel; SÁNCHEZ-BORREGO, Rafael; LUBIÁN-LÓPEZ, Daniel Maria a PÉREZ-LÓPEZ, Faustino R., 2022. Etiopathogenesis of ovarian cancer. An inflamm-aging entity? Online. *Gynecologic Oncology Reports*. Roč. 42. ISSN 23525789. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gore.2022.101018>. [cit. 2024-12-16].
63. SHIH, Ie-Ming; WANG, Yeh a WANG, Tian-Li, 2021. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. Online. *The American Journal of Pathology*. Roč. 191, č. 1, s. 26-39. ISSN 00029440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.006>. [cit. 2024-12-15].
64. SKOUPILOVÁ, Hana a HRSTKA, Roman, 2019. Progress in the Utilisation of Organometallic Compounds in the Development of Cancer Drugs. Online. *Klinická Onkologie*. Roč. 32, č. Suppl 3. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko20193S25>. [cit. 2025-02-15].
65. SONG, Mengdi; CUI, Mingxiao a LIU, Kehai, 2022. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 232. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114205>. [cit. 2025-02-12].

66. SOUKUPOVÁ, Jana, 2022. Genetic testing in ovarian cancer. Online. *Onkologie*. 2022-8-24, roč. 16, č. 4, s. 195-199. ISSN 18024475. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/xon.2022.037>. [cit. 2024-12-15].
67. STEWART, Christine; RALYEA, Christine a LOCKWOOD, Suzy, 2019. Ovarian Cancer: An Integrated Review. Online. *Seminars in Oncology Nursing*. Roč. 35, č. 2, s. 151-156. ISSN 07492081. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>. [cit. 2024-12-15].
68. ŠEVČÍK, Libor, 2015. Léčba karcinomu ovaria v současnosti. Online. *Onkologie*. Roč. 9, č. 4, s. 106-108. ISSN 1802-4475. Dostupné z: https://onkogynekologie.cz/resources/publikace/Lecba_karcinomu_ovaria_v_soucasnosti_2015.pdf. [cit. 2025-02-04].
69. ŠEVČÍK, Libor, 2017. Inhibitory PARP v léčbě karcinomu ovaria. Online. *Onkologická revue*. Roč. 2, s. 38-45. ISSN 2464-7195. Dostupné z: https://www.onkogynekologie.cz/resources/publikace/Inhibitory_parp_v_lecbe_karcinomu_ovaria.pdf. [cit. 2025-02-04].
70. ŠPAČEK, Jiří; KALOUSEK, Ivo a JÍLEK, Petr, 2018. *Vybrané kapitoly z gynekologie*. Edice Postgraduální medicíny. Praha: Mladá fronta. ISBN 978-80-204-4646-6.
71. ŠTELLMACHOVÁ, Júlia; VRTĚL, Petr; VRTĚL, Radek; JANÍKOVÁ, Mária; KOLAŘÍKOVÁ, Kristýna et al., 2022. Ovarian tumors and genetic predisposition. Online. *Česká gynekologie*. Roč. 87, č. 3, s. 211-216. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://doi.org/10.48095/cccg2022211>. [cit. 2024-12-15].
72. VAN RIJT, Sabine H. a SADLER, Peter J., 2009. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. Online. *Drug Discovery Today*. Roč. 14, č. 23-24, s. 1089-1097. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.003>. [cit. 2025-02-14].

73. VAN RIJT, Sabine H.; MUKHERJEE, Arindam; PIZARRO, Ana M. a SADLER, Peter J., 2010. Cytotoxicity, Hydrophobicity, Uptake, and Distribution of Osmium(II) Anticancer Complexes in Ovarian Cancer Cells. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. Roč. 53, č. 2, s. 840-849. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jm901556u>. [cit. 2025-03-03].
74. VLASÁK, Pavel; BOUDA, Jiří; KOSTŮN, Jan; BEREZOVSIIY, Denis a PRESL, Jiří, 2018. Nové trendy v systémové léčbě ovariálního karcinomu. Online. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. Roč. 10, s. 4-9. ISSN 1803-9588. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2018_215.pdf. [cit. 2025-02-04].
75. VOKURKA, Samuel a TESAŘOVÁ, Petra, [2018]. *Onkologie v kostce*. Medicus. Praha: Current Media. ISBN 978-80-88129-37-0.
76. VORLÍČEK, Jiří; ZDENĚK, Adam a KREJČÍ, Marta, 2011. *Obecná onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-796-7. Dostupné také z: <https://www.bookport.cz/kniha/obecna-onkologie-3560/>.
77. ZÁVESKÝ, Luděk, 2011. Karcinom ovaria - na cestě k lepší diagnostice a léčbě. Online. *Interní medicína pro praxi*. Roč. 13, č. 12, s. 490-492. ISSN 1212-7299. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201112-0007_Karcinom_ovaria-na_cestě_k_lepsi_diagnostice_a_lecbe.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dz%25E1vesk%25FD%26sfrom%3D0%26spage%3D30. [cit. 2024-12-16].
78. ZIKÁN, Michal; FORETOVÁ, Lenka; CIBULA, David; KOTLAS, Jaroslav a POHLREICH, Petr, 2006. Hereditární karcinom ovaria. Online. *Česká gynekologie*. Roč. 71, č. 3, s. 246-251. ISSN 12107832. Dostupné z: <https://www.cs-gynekologie.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2006-3/hereditarni-karcinom-ovaria-4624/download?hl=cs>. [cit. 2024-12-15].