

## Biologiczne podstawy terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem leków platynowych. Oddziaływanie z cytochromem c

Urszula Śliwińska-Hill, Marta Szumęłda

Przeciwnowotworowe leki platynowe są szeroko stosowane w praktyce klinicznej w terapii wielu nowotworów, jednakże skutki uboczne terapii z ich udziałem, m. in. zależna od dawki nefrotoksyczność oraz oporność komórek nowotworowych, limitują ich użycie. Cytochrom c jest małą hemoproteiną pełniącą funkcję transportera elektronów, ulokowaną w mitochondriach, która odgrywa również istotną rolę w procesie apoptozy komórki. Platynowanie specyficznych łańcuchów bocznych, które wpływa na biologiczne funkcje białek i enzymów poprzez tworzenie mocnych wiązań koordynacyjnych, może mieć wpływ na ogólny mechanizm aktywności i toksyczność leków platynowych. W celu zrozumienia natury tych oddziaływań przeanalizowane zostały oddziaływania cisplatyny i jej pochodnych z sygnałowym białkiem apoptozy — cytochromem c.

### Biological aspects of anticancer therapy with platinum drugs: interactions with cytochrome c

Platinum-based drugs are widely used in the clinical treatment of various cancers, however their toxic side effects, like concentration-dependent nephrotoxicity and resistance limit their usage. Cytochrome c is a small electron-carrier heme protein, located in the mitochondria, that plays a crucial role in apoptotic pathways. Platination of specific side chains, which can affect the function of biologically crucial proteins and enzymes through the formation of strong coordinative bonds, might play a relevant role in the overall mechanism and toxicity of platinum drugs. To understand the nature of those interactions, we have analysed the reactions of anticancer platinum drugs with cytochrome c — signalling apoptotic protein.

NOWOTWORY J Oncol 2016; 66, 2: 136–150

**Słowa kluczowe:** platynowe leki przeciwnowotworowe, cytochrom c, oporność komórek na terapię, apoptoza  
**Key words:** platinum based antitumour drugs, cytochrome c, resistance of tumour cells to therapy, apoptosis

### Wprowadzenie

Choroby nowotworowe towarzyszą ludzkości od początku jej istnienia. Początkowo głównym sposobem ich leczenia była interwencja chirurgiczna [1], dopiero poznanie mechanizmów nowotworzenia na poziomie molekularnym pozwoliło na pełne i świadome wykorzystanie innych metod, głównie chemio- i radioterapii. Przede wszystkim jednak zapoczątkowało to zupełnie nowy kierunek w walce z nowotworami, oparty na projektowaniu związków ingerujących w procesy nowotworzenia. Zjawisko to zaowocowało wprowadzeniem w latach 70. XX w. cisplatyny, która okazała

się skuteczna w leczeniu wielu nowotworów, m.in. jąder, jajników, nowotworów głowy i szyi. To z kolei przyczyniło się do intensywnego rozwoju badań nad jej pochodnymi. Z otrzymanych około 3 tys. związków tylko 30 osiągnęło etap prób klinicznych, z czego ponad połowa została odrzucona. Obecnie w lecznictwie funkcjonuje 6 kompleksów platyny: cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna oraz lobaplatyna, nedaplatyna i heptaplatyna, dopuszczone do użytku tylko w Chinach, Japonii i Korei Płd. Transplatyna, będąca izomerem cisplatyny, ze względu na swoją znaczną reaktywność prowadzącą do szybkiej dezaktywacji cechuje się niską

aktywnością przeciwnowotworową i nie jest stosowana w medycynie.

Początkowo celem poszukiwań nowych pochodnych kompleksów platyny było uzyskanie leków o większej skuteczności i mniejszej toksyczności w zestawieniu z cisplatyną, obecnie jednak większy nacisk kładzie się na projektowanie związków pozbawionych oporności krzyżowej (w stosunku do cisplatyny i karboplatyny). Więcej uwagi poświęca się również jakości życia pacjenta, stąd badania nad postaciami leków platynowych przystosowanych do podania doustnego, takich jak satraplatyna, będąca na etapie zaawansowanych badań klinicznych [2–4].

Stosowanie leków platynowych wiąże się z licznymi efektami ubocznymi, często znacznie pogarszającymi wyniki leczenia. Naturalną konsekwencją tego faktu jest rozwój nowego kierunku badań, skoncentrowanego na modelowaniu leków, których celem są inne niż DNA elementy komórki, kluczowe dla jej przeżycia. Stąd też zainteresowanie cytochromem c, będącym wielofunkcyjnym enzymem uczestniczącym zarówno w procesach życia, jak i śmierci komórki.

### Właściwości chemiczne i aktywność leków na bazie platyny

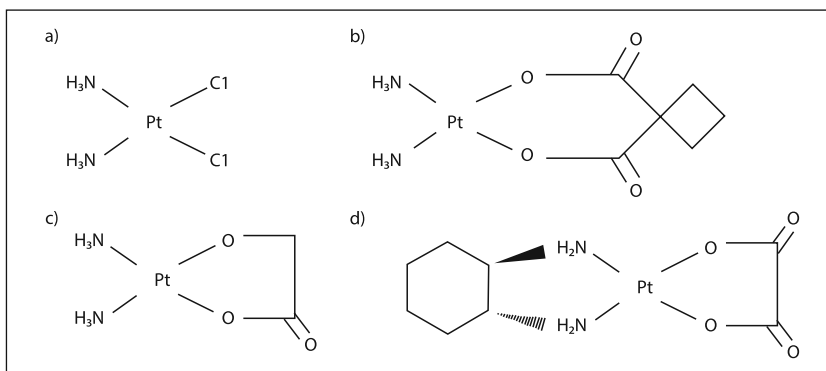
Budowa chemiczna oraz reaktywność leków platynowych decydują o ich mechanizmie działania przeciwnowotworowego. Poszczególne kompleksy różnią się między sobą ligandami, a więc również kinetyką ich wymiany, co skutkuje inną aktywnością i toksycznością tych związków. Elementem wspólnym cisplatyny, karboplatyny oraz neda-

platyny jest obecność dwóch grup aminowych w położeniu *cis*. Pozostałą część cząsteczki stanowią odpowiednio: dwie grupy chlorkowe, ligand cyklobutyloodikarbonylowy oraz ugrupowanie glikolanowe w przypadku nedaplatyny. Z kolei unikalna budowa oksaliplatyny prawdopodobnie odpowiada za jej skuteczność w leczeniu nowotworów niewrażliwych na cisplatynę, ponieważ charakter jej ligandów (grupa szczawianowa) w sposób odmienny wpływa na ilość oraz typ powstałych połączeń z DNA (ryc. 1).

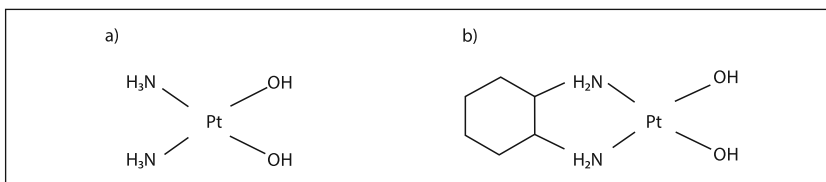
Po wprowadzeniu do organizmu leki platynowe ulegają procesowi hydrolizy. W pierwszej kolejności grupa chlorkowa zostaje podstawiona cząsteczką wody, a następnie grupą hydroksylową [4, 5]. W wyniku tego powstaje aktywny metabolit, którym w przypadku cisplatyny, karboplatyny i nedaplatyny jest *cis*-diaminadihydroksyplatyna(II); natomiast w wyniku biotransformacji oksaliplatyny tworzy się *trans*-diaminacykloheksan-dihydroksy-platyna(II) (ryc. 2). Dopiero te związki charakteryzują się działaniem farmakologicznym, stąd wymienione wcześniej kompleksy platyny mogą być traktowane jako proleki. Reakcje hydrolizy poszczególnych leków platynowych przebiegają z różną kinetyką; proces ten zachodzi bardzo szybko w przypadku cisplatyny, natomiast znacznie wolniej dla karbo- i nedaplatyny [3, 4].

### Mechanizm działania cytostatyków zawierających atom platyny

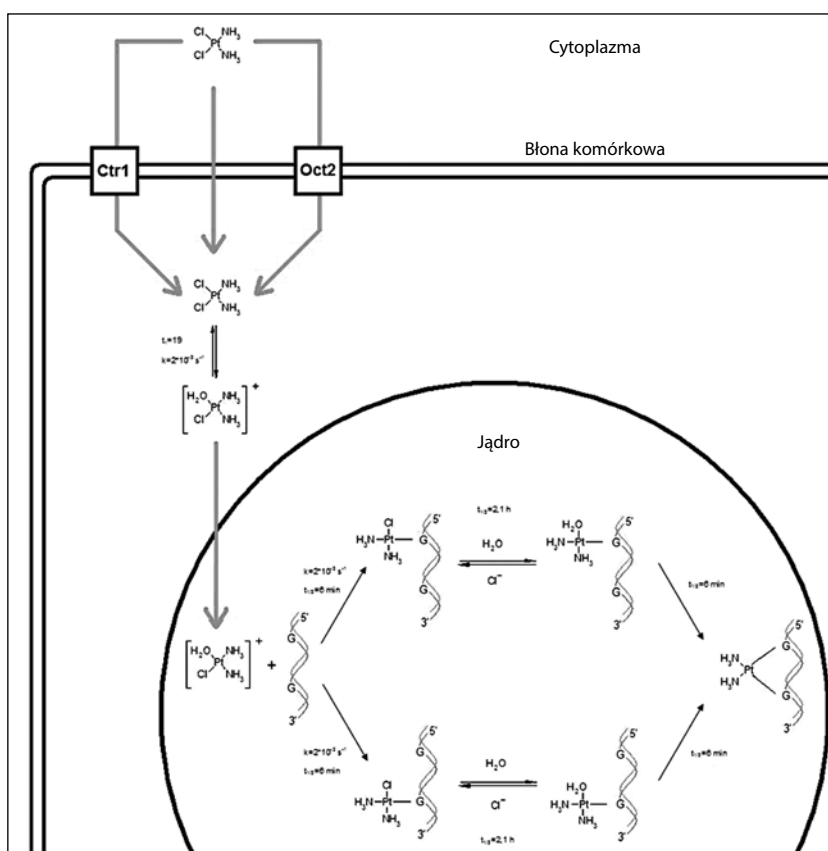
Skuteczność związków platyny przeciw komórkom nowotworowym jest związana z inhibicją przez nie syntezy DNA lub niezdolnością systemów naprawczych do usuwania



Rycina 1. Wzory strukturalne leków platynowych: a) cisplatyna, b) karboplatyna, c) nedaplatyna, d) oksaliplatyna



Rycina 2. Struktury aktywnych metabolitów kompleksów platyny: a) *cis*-diaminadihydroksy-platyna(II), b) *trans*-diaminacykloheksan-dihydroksy-platyna(II)



**Rycina 3.** Aktywacja, kinetyka i transport cisplatyny z przestrzeni międzykomórkowej do wnętrza komórki

powstałych adduktów Pt-DNA. Jednym z dowodów potwierdzających tę tezę może być fakt, że komórki ze wzmoczoną aktywnością naprawczą DNA są odporne na cisplatynę [4]. Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, po wnikięciu do komórki lek ulega hydrolizie. Proces ten w przypadku cisplatyny przebiega zgodnie z przedstawionym na rycinie 3 schematem.

Dzięki elektrofilowemu charakterowi jonu centralnego cząsteczka  $cis\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  może reagować ze składnikami komórki o właściwościach nukleofilowych, m.in. z DNA. Ligandy chlorkowe zostają finalnie zastąpione przez atomy azotu N7 guaniny, rzadziej adeniny [6, 7]. Częstsze przyłączenie kompleksu platynowego do atomów N7 guaniny nie jest zaskakujące, ponieważ są one położone w większym rowku podwójnej helisy, dzięki czemu są dobrze wyeksponowane i dostępne na elektrofilowy atak atomu platyny. Ponadto nie uczestniczą w tworzeniu wiązania wodorowego pomiędzy komplementarnymi parami zasad azotowych [7].

Badania wykazały, że cisplatyna i oksaliplatyna tworzą w przybliżeniu 60%–65% wiązań wewnątrznicowych GG pomiędzy sąsiadującymi guaninami, 25%–30% wiązań wewnątrznicowych typu AG, 5%–10% wewnątrznicowych GNG oraz 1%–3% międzynicowych GG [8]. Chociaż ostatni z wymienionych rodzajów wiązań formowany jest najrzadziej, cechuje się on silniejszym hamowaniem replikacji

i transkrypcji DNA, ponieważ uszkodzenie obejmuje obie komplementarne nici DNA i uniemożliwia prawidłowe działanie polimeraz DNA. Usunięcie wiązania krzyżowego między nimi wymaga zaangażowania zarówno mechanizmu naprawy przez wycięcie nukleotydu (*nucleotide excision repair* — NER), jak i naprawy rekombinacyjnej (*recombinational repair*). Pomimo generowania cięższych zakłóceń w budowie DNA ten typ połączeń jest tylko częściowo odpowiedzialny za aktywność przeciwnowotworową kompleksów platyny z powodu rzadkiego występowania [9].

Wiązanie krzyżowe modyfikuje całą strukturę przestrzenną DNA. W przypadku cisplatyny i karboplatyny następuje zgięcie podwójnej helisy o  $32\text{--}35^\circ$  w kierunku większego rowka [10]. Finalnie krzywizna i kształt uplatynowanego fragmentu podwójnej nici upodabnia się do tej obserwowanej w dupleksach DNA kompleksowanych przez proteiny SRY (*sex-determining region Y protein*) i LEF-1 (*lymphoid enhancer binding factor 1*) z rodziny białek HMG (*high mobility group*) [11–13]. W warunkach prawidłowych addukty cisplatyny z DNA są usuwane przez system NER, który obejmuje rozpoznanie (*recognition*), nacięcie (*incision*), wycięcie (*excision*), syntezę naprawczą (*repair synthesis*) i ligację (*ligation*). W momencie zakłócenia któregoś z wymienionych procesów prawdopodobieństwo przeżycia komórki nowotworowej zmniejsza się. Istnieją dwie nie-

wykluczające się hipotezy dotyczące roli białek z rodziny HMG w procesie naprawy DNA. Pierwsza mówi o tym, że wiązanie krzyżowe GG, które stabilizuje „otwarty” i spłaszczony większy rowek, stanowi niezbędną cechę strukturalną dla rozpoznania i związania proteiny HMG. Następuje tzw. *repair shielding*, czyli przestrzenne zasłonięcie uszkodzonego fragmentu nici, zatem defekt trwa dalej, prowadząc ostatecznie do apoptozy i śmierci komórki. Zgodnie z hipotezą drugą uszkodzone przez cisplatynę DNA „porywa” białka z rodziny HMG oraz inne jądrowe proteiny z dala od ich naturalnych miejsc wiązania, co prowadzi do stresu komórkowego i śmierci komórki [7].

### **Oporność komórek nowotworowych na leki platynowe**

Terapia lekami platynowymi skutkuje inhibicją replikacji DNA, następnie transkrypcji RNA, zatrzymaniem fazy G2 cyklu komórkowego i/lub programowaną śmiercią komórki. Zmiany w jakimkolwiek z elementów wpływających na tworzenie adduktów bądź też dalszą kaskadę reakcji prowadzącą do apoptozy mogą skutkować wytworzeniem oporności na lek, dlatego też badania nad tym zagadnieniem są wciąż pełne niejasności, ale też nadziei na poszerzenie terapeutycznego potencjału leków platynowych.

### **Wychwył oraz eliminacja komórkowa leków platynowych**

W komórkach opornych na cisplatynę często obserwuje się mniejsze stężenie wewnątrzkomórkowe leku spowodowane osłabieniem wychwyłu i/lub nasileniem usuwania cząsteczek do przestrzeni międzykomórkowej. Sposób, w jaki cisplatyna przenika do wnętrza, nie został dokładnie poznany. Domniemywa się jedynie, że jest to dyfuzja bierna, ponieważ czynnikiem hamującym wychwył jest stężenie leku.

Istnieją również wyniki badań dowodzące, że w wychwył cisplatyny zaangażowane są także białka błony komórkowej. Przykładem może być działanie niektórych aldehydów, które tworząc zasady Schiffa z proteinami błonowymi, hamują transport cisplatyny. Z kolei niższy poziom ekspresji białka membranowego o masie 48 kDa w komórkach opornych na cisplatynę świadczy o jego udziale w przeprowadzaniu cytostatyku przez membranę i w przyszłości może ono posłużyć jako potencjalny cel wykorzystany do polepszenia parametrów wychwyłu cisplatyny [14].

Na zmniejszenie akumulacji cytostatyku wewnątrz komórki może mieć również wpływ nasilenie jego eksportu do przestrzeni międzykomórkowej. Dzieje się tak w przypadku nadekspresji białka o przybliżonej masie 200 kDa (CP<sup>R</sup> – 200) [15] uczestniczącego w tym procesie i zawartego w błonach niektórych komórek opornych na cisplatynę [16].

### **Inaktywacja poprzez związki zawierające siarkę**

Badania wykazały, że oporność na leki platynowe może być wynikiem nasilonej inaktywacji przez wewnątrzkomórkowe proteiny. Przykładem może być działanie S-transferaz glutationowych (GSTs) błonowych i cytoplazmatycznych należących do rodziny enzymów II fazy detoksyfikacji, które katalizują koniugację glutationu z endo- i egzogennymi elektrofilowymi związkami. GSTs mogą odgrywać rolę w rozwoju oporności komórek na chemioterapeutyki, polegającą na bezpośredniej detoksyfikacji leku [17]. Cisplatyna zostaje kowalencyjnie związana z glutationem ( $\gamma$ -glutamylcysteinyloglicyna — GSH) po nukleofilowym ataku anionu tiolowego GSH, a następnie kompleks ten jest transportowany na zewnątrz komórki przez pompę zależną od ATP. Połączenie leku z glutationem powoduje zahamowanie tworzenia wiązań krzyżowych z DNA przez monoaddukty, przez co ich potencjał cytotoksyczny zostaje zredukowany. Potwierdzeniem powyższych założeń może być fakt, że w komórkach wrażliwych na działanie cisplatyny, jak np. rak jąder, wykazano niższy poziom GSH.

Drugą grupą związków zawierających siarkę zaangażowanych w powstawanie oporności komórek nowotworowych na cytostatyki są metalotioneiny. Jest to rodzina bogatych w cysteinę enzymów uczestniczących w utrzymywaniu homeostazy jonów Zn<sup>2+</sup> oraz usuwaniu z komórki metali ciężkich, np. kadmu. Metalotioneiny wiążą się z cisplatyną w stosunku 1:10 i mogą powodować zmniejszenie wrażliwości na lek [16].

### **Białka regulatorowe**

Zakłócenia w ekspresji onkogenów (np. *c-FOS*, *c-MYC*, *h-RAS*, *c-JUN*, *c-ABL*) i genów supresorowych (np. *p53*) prawdopodobnie również są zaangażowane w proces komórkowej oporności na leki, jednakże mechanizm leżący u podstaw tej oporności nie jest całkowicie wyjaśniony, ponieważ zmiany w ekspresji genów wywierają efekt plejotropowy na homeostazę komórki. Przykładem może być gen supresorowy *p53*, odpowiedzialny za kontrolę cyklu komórkowego, naprawę DNA oraz inicjację apoptozy. Zaburzenia jego ekspresji mogą wywierać wpływ na wrażliwość danej komórki na cytostatyki. Potwierdzeniem tego założenia są eksperymenty na komórkach chłoniaka, nowotworu jajników oraz płuc, posiadających zmutowany gen *p53* i charakteryzujących się większą opornością na cisplatynę niż komórki typu dzikiego. Z kolei wprowadzenie dzikiego typu *p53* do komórek NSCLC i nowotworu jajników uwarściwia je na działanie leku platynowego i skutkuje silną indukacją apoptozy [16].

### **Komórkowe mechanizmy naprawy DNA**

Wiązania krzyżowe powstałe w wyniku działania metabolitów leków platynowych na DNA prowadzą do zmian

konformacyjnych helisy, które są rozpoznawane przez specyficzne białka i następnie naprawiane przy pomocy szeregu różnych mechanizmów. Enzymy naprawcze DNA odgrywają istotną rolę w farmakologii leków na bazie platyny. Oksaliplatyna zapobiega syntezie DNA poprzez tworzenie wiązania, w konsekwencji prowadząc do apoptotycznej śmierci komórki. Aktywny system naprawy DNA usuwa lek z helisy, ocalając tym samym komórkę. Wobec tego efekt leczenia jest zależny od aktywności systemów naprawczych.

W sytuacji uszkodzenia jednej nici do naprawy zaangażowany zostaje system działający przez wycięcie nukleotydu (*nucleotide excision repair* — NER), naprawy przez wycięcie zasady (*base excision repair* — BER) bądź naprawy niesparowanych zasad (*mismatch repair* — MMR).

Pierwszy z nich rozpoznaje wszystkie trzy rodzaje wiązań generowanych przez leki platynowe, jednak najmniejszą skuteczność naprawy wykazuje dla 1,2-wewnątrznicowych wiązań krzyżowych, co świadczy o ich decydującym udziale w cytotoksyczności. Zwiększona ekspresja genów NER korelowała z wystąpieniem oporności na cisplatynę. W odróżnieniu od BER system NER rozpoznaje tylko uszkodzenia skutkujące zniekształceniem helisy DNA. Jest to istotna różnica, ponieważ pewne uszkodzenia, takie jak parowanie U-A, nie prowadzą do zniekształceń helisy i nie są usuwane przez NER, są natomiast naprawiane przez BER [18].

*XRCC1* — enzym naprawczy DNA, należy do systemu BER i posiada polimorficzny gen kodujący. *XRCC1* posiada domenę, która funkcjonuje jako interfejs białko-białko oddziałujący z polimerazą poli(ADP-rybozy) (PARP). Jest to palec cynkowy zawierający enzym, który wykrywa pęknięcia, a następnie usuwa białka z helisy DNA, dzięki czemu staje się ona bardziej dostępna dla enzymów naprawczych. W genie *XRCC1* zidentyfikowane zostały trzy mutacje z podstawieniem G w miejscu A w pozycji 2 kodonu 399, które skutkują zmianą (Arg399Gln) w domenie wiążącej PARP. W efekcie enzym ten jest mniej zdolny do inicjacji naprawy DNA z powodu zmienionej charakterystyki naprawczej [18]. Wśród pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego wykazano, że polimorfizm jest mocno związany z opornością na terapię oksaliplatyna/fluorouracyl [19]. Ponadto u osób z glutaminą zamiast argininy w kodonie 399 z powodu niewystarczającej naprawy lub zwiększonej tolerancji uszkodzeń wzrasta poziom markerów uszkadzających DNA. Pacjenci z glutaminą w pozycji 399 obciążeni są ponad pięciokrotnie wyższym ryzykiem niepowodzenia kombinowanej terapii oksaliplatyna/fluorouracyl w porównaniu z pacjentami z dzikim typem allele. W przeciwieństwie do tego inne mutacje, np. w kodonie 194 i 280, są нефункциjne i *in vivo* nie korelują ze wzrostem poziomu uszkodzeń DNA [18]. Reasumując, z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że istnieje zależność pomiędzy nadekspresją *XRCC1*

a opornością komórek nowotworowych na terapię lekami na bazie platyny [20–22].

MMR również został zaproponowany jako element przyczyniający się do rozwoju oporności komórkowej na leki platynowe. Uważa się, że pośredniczy on w apoptozie indukowanej przez cisplatynę i karboplatynę. Komórki nowotworowe mające deficyt MMR są 2–3-krotnie oporniejsze na terapię lekami platynowymi [10]. Tkanki jąder charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji genów *MMR*, dlatego też guzy tam powstałe są z powodzeniem leczone cisplatyną [16].

Homologiczna rekombinacja jest uważana za mechanizm naprawczy w przypadku uszkodzenia obu nici DNA, jak ma to miejsce podczas tworzenia międzyniciowych wiązań krzyżowych przez leki platynowe [10].

### **Komórkowa tolerancja adduktów**

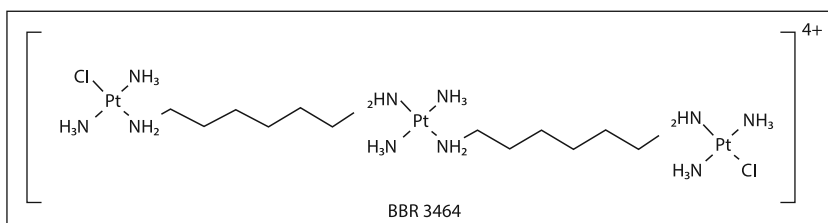
Badania na liniach komórkowych ludzkiego nowotworu jajników wykazały następującą zależność: poziom tolerancji komórki na addukty Pt-DNA jest odwrotnie proporcjonalny do jej wrażliwości na lek. Ponadto komórki odporne mają większą zdolność do dalszego pogłębiania zakresu tolerancji [16].

Zjawisko adaptacji komórki do przeżycia z uszkodzeniami DNA może być skutkiem procesu zwanego *replication bypass*. Zachodzi on wtedy, gdy polimeraza omija addukt platyny z DNA, co najczęściej ma miejsce w przypadku wewnątrznicowych uszkodzeń. Klasyczne replikacyjne polimerazy DNA typu  $\alpha$ ,  $\delta$  oraz  $\epsilon$  nie omijają uszkodzeń, natomiast kilka innych typów, m.in.  $\beta$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ , osiąga ten efekt poprzez syntezę ponad miejscem uszkodzenia (*translesion synthesis*) i wstawianiu zasad przez polimerazy w miejscach uszkodzenia. Nadekspresja genu kodującego polimerazę  $\beta$  została wykazana dla opornych komórek [10].

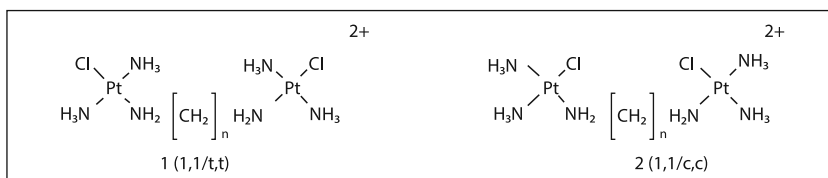
Zakłócenia w ekspresji regulatorów apoptozy również mogą przyczyniać się do rozwoju oporności. Dowodów dostarczyły eksperymenty na liniach komórkowych nowotworu jajników niereagujących na leczenie cisplatyną, które wykazały obniżenie poziomu ekspresji genu *Bax*, będącego promotorem programowanej śmierci komórki. Z kolei jego podwyższony poziom odnotowano w ludzkim raku płaskonabłonkowym szyi i głowy, cechującym się większą wrażliwością na cisplatynę zarówno w liniach komórkowych hodowlanych, jak i *in vivo* u zwierząt [16].

### **Nowe leki na bazie platyny**

W ostatnich latach zwrócono również uwagę na połączenia platyny, w których metal ten występuje na IV stopniu utlenienia, tworzy związki wielordzeniowe, w których występują dwa lub więcej centrów aktywnych oraz na kompleksy o izomerii *trans*. Związki te mogą tworzyć innego rodzaju połączenia z tarczami biologicznymi niż cisplatyna i jej analogi.



Rycina 4. Wzór strukturalny trójrzeniowego kompleksu platyny BBR 3464



Rycina 5. Wzory strukturalne dwurdzeniowych kompleksów platyny zawierające naładowane monofunkcjonalne centra platynowe [23]

### Związki wielordzeniowe

Związki koordynacyjne platyny zawierające w swym składzie co najmniej dwa atomy metalu otwierają nowe możliwości w walce z nowotworami. W ich modelowaniu decydującą rolę odgrywają trzy czynniki: 1) długość i sprężystość łańcucha, 2) zdolność tworzenia wiązań wodorowych i ładunek łańcuchów łączących oraz 3) geometria liganda chlorkowego.

Addukty Pt-DNA tworzone przez te związki różnią się od tych formowanych przez cisplatinę, dlatego też są one słabo rozpoznawane przez białka naprawcze DNA. Jedną z ich najważniejszych cech w wiązaniu z nicią kwasu deoksyrybonukleinowego jest zdolność do konformacyjnej, nieodwracalnej zmiany DNA z typu A na typ B. Największy odsetek wiązań stanowią wiązania międzyniciowe o zakresie od 1–2 do 1–6, co również odróżnia te związki od typowych połączeń platyny [23].

Najważniejszym związkiem wchodzącym w skład tej grupy kompleksów jest BBR3464 (ryc. 4). W tym kompleksie środkowe centrum aktywne dostarcza grup zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych z atomem tlenu O6 guaniny oraz O3 tyminy [23]. Seria eksperymentów porównawczych z cisplatiną na liniach komórkowych ludzkiego nowotworu jajników dostarczyła licznych dowodów różnic w działaniu obu leków, szczególnie względem komórek opornych na cisplatinę. W przeciwieństwie do cisplatyny ten trójrzeniowy kompleks zmienia potencjał membrany mitochondrialnej w komórkach niewrażliwych na cisplatinę, co skutkuje uwolnieniem aktywatorów proteaz, a następnie indukcją apoptozy zależnej od kaspaz [24]. Obecnie związek ten znajduje się w II fazie badań klinicznych i jest testowany pod kątem zastosowania go w terapii nowotworów przerzutowych trzustki i płuc [25, 26].

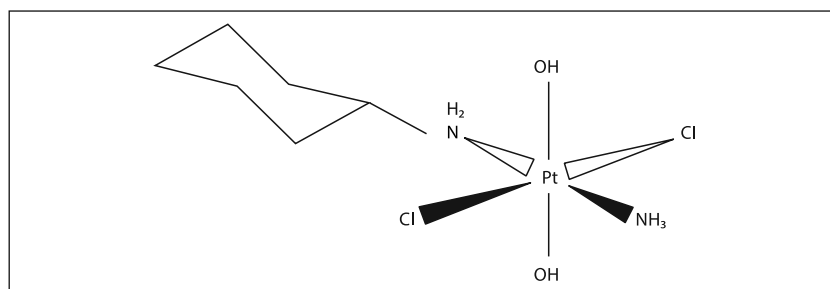
Wśród dwurdzeniowych kompleksów platyny na uwagę zasługują związki z serii 1,1/t,t oraz 1,1/c,c (ryc. 5), które są obdarzone ładunkiem dodatnim i zawierają jedną grupę chlorkową przy każdym z 2 centrów aktywnych. Charakteryzują się one dobrą rozpuszczalnością w wodzie oraz wysoką skutecznością wobec linii komórkowych nowotworów opornych na cisplatinę [23].

### Leki platynowe o izomerii *trans*

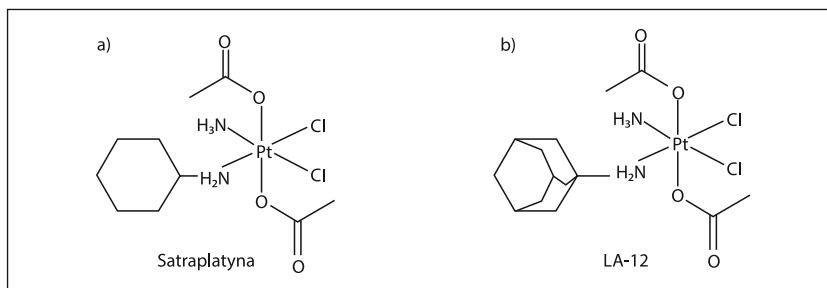
Obiecujące jako potencjalne leki przeciwnowotworowe wydają się również kompleksy platyny o izomerii *trans*. Związki te działają bardzo wybiórczo na komórki nowotworowe, dzięki czemu wykazują niezwykle korzystne profile toksykologiczne i farmakokinetyczne. Często też różnią się spektrum działania i są skuteczne w przypadku komórek opornych na cisplatinę [27]. Tworzą one cztery główne grupy kompleksów: 1) *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(L)(L')], gdzie L, L' = ligandy pirydynopodobne; 2) kompleksy platyny(IV) o wzorze *trans*-[PtCl<sub>2</sub>X<sub>2</sub>(L)(L')], gdzie X = ligand hydroksyloowy lub karboksyloowy, L, L' = amina; 3) *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(L)(L')], gdzie L = amina podstawiona ugrupowaniem alkilowym, L' = izopropylamina; 4) *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(L)(L')], gdzie L, L' = iminoeter.

Ponieważ niska aktywność przeciwnowotworowa *trans*platyny wynika z faktu, że jest ona metabolizowana do nieaktywnych pochodnych zanim dotrze do komórki nowotworowej [28], do cząsteczki nowych *trans*-kompleksów wprowadzono zawadę przestrzenną w postaci pirydyny i jej pochodnych, które zmniejszyły szybkość reakcji podstawiania atomów chloru. Obszerne ligandy utrudniają dostęp do atomu platyny, przez co hamują powstawanie związku pośredniego podatnego na wymianę [27].

Wśród aktywnych izomerów *trans* platyny(IV) z alifatycznymi aminami najlepiej przebadany został JM335 (ryc. 6),



Rycina 6. Wzór strukturalny JM335



Rycina 7 a, b. Wzory strukturalne kompleksów Pt(IV)

który wprawdzie wykazał porównywalną cytotoksyczność z cisplatyną, jednak nie jest z nią krzyżowo odporny [27].

Nowe analogi transplatyny — *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(piperydyna)], *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(piperazyna)] czy *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(4-hydroksymetylopirydyna)] — tworzą w podwójnej helisie stabilne wiązania krzyżowe wewnętrzniowe, które termodynamicznie destabilizują DNA, co znacznie utrudnia przekształcenie tych połączeń w międzyniciowe [28].

### Związki platyny(IV)

Przed osiągnięciem ostatecznego celu, jakim jest DNA komórki, duża część leków platynowych zawierających Pt(II) jest zatracana w wyniku wiązania z białkami osocza oraz reakcji ubocznych prowadzących do działań niepożądanych [29]. W celu poprawy parametrów farmakokinetycznych leków platynowych zsyntetyzowano związki platyny(IV), pełniące funkcję proleków, które poprzez redukcję do Pt(II) nabywają cytotoksyczną aktywność. Związki te cechują się lepszą skutecznością oraz mniejszą szkodliwością, gdyż są aktywowane wewnątrz komórki.

Kompleksy Pt(IV) zawierają dwa dodatkowe ligandy w stosunku do związków Pt(II), czego konsekwencją jest zmiana geometrii z planarnej na oktaedryczną. Te cechy w połączeniu z wysoką kinetyczną obojętnością dostarczają wielu możliwości w projektowaniu nowych leków platynowych — łatwiejsza modulacja właściwości farmakokinetycznych, stworzenie terapii celowanej, poprawa komfortu życia pacjenta poprzez stosowanie postaci doustnych [30].

Satraplatyna (ryc. 7a) jest kompleksem Pt(IV), który zakończył m.in. II fazę badań klinicznych w monoterapii pacjentek z przerzutowym nowotworem piersi [31] oraz terapii skojarzonej z bevacizumabem u pacjentów z przerzutowym rakiem prostaty [32] i paclitaxelem w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca [33]. Ponieważ jest ona na tyle stabilna, aby przetrwać niekorzystne dla wielu leków warunki panujące w przewodzie pokarmowym, może być podawana doustnie. W połączeniu z kwasem etakrynowym, który jest inhibitorem wszystkich izoenzymów S-transferazy glutationu, prezentuje pierwszy przykład związku Pt(IV), wykazującego jednocześnie działanie przeciwnowotworowe oraz niwelującego oporność, dzięki czemu może być stosowana w terapii celowanej [34].

Adamplatyna(IV) (LA-12) (ryc. 7b), analog satraplatyny, wszedł w I fazę badań klinicznych [30]. Sposób wiązania tego leku z DNA, typ głównie tworzonych adduktów oraz rozpoznawanie przez białka rodziny HMG nie różnią się znacznie od tych prezentowanych przez cisplatynę, jednakże wiązania 1,2-GG wewnętrzniowe adamplatyny są mniej skutecznie usuwane przez NER. Ponadto badania wykazały, że dezaktywacja LA-12 przez związki zawierające siarkę (np. glutation czy metalotioneiny) odgrywa znacznie mniejszą rolę w mechanizmie oporności na ten lek, w przeciwieństwie do cisplatyny. Zwiększona akumulacja adamplatyny w komórkach, silniejsza inhibicja polimeryzacji DNA i osłabiona naprawa jego uszkodzeń oraz tworzenie wiązań krzyżowych z proteinami różnią się od tych obserwowanych po podaniu

cisplatyny. Te unikalne właściwości LA-12 mogą w przyszłości przyczynić się do jego szerokiego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej [35].

### **Nowe trendy w terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem kompleksów metali**

Terapia chorób nowotworowych klasycznymi lekami platynowymi cechuje się dużą skutecznością, jednak obciążona jest wieloma efektami ubocznymi, znacznie pogarszającymi jakość życia pacjentów, a czasami wręcz zagrożającymi ich życiu. Dlatego też prowadzone badania nad nowymi środkami przeciwnowotworowymi skupiają się na bardziej selektywnym dostarczaniu cytostatyków do komórek nowotworowych i/lub ich aktywacji w komórce (w przypadku proleków) oraz poszukiwaniu nowych połączeń skierowanych na nieklasyczne cele — białka i enzymy nowotworzenia.

W klasycznej chemioterapii lek platynowy, aby zadziałać, musi dostać się do wnętrza komórki, w przeciwnym razie wykazuje on swoją aktywność poza nowotworem, co prowadzi do toksyczności ogólnej bądź też sprawia, że zostaje szybko usunięty z organizmu w formie niezmienionej. Skonstruowanie systemów dostarczających leki bezpośrednio do komórki pozwoliło na rozwiązanie tych problemów. Jednym z przykładów może być inkapsulacja cisplatyny i karboplatyny w ferrytynie, magazynującej w normalnych warunkach żelazo, która jest internalizowana przez niektóre tkanki nowotworowe. Nośnikami leków mogą być również otrzymany z bakterii minikomórki (o wielkości 400 nm) pozbawione jądra, które oznaczone specyficznymi przeciwciałami — docierają z ładunkiem (np. cisplatyną) do odpowiednich komórek nowotworowych [36].

Do przenoszenia leków wykorzystuje się także jednościenne nanorurki węglowe (*single-walled carbon nanotube* — SWNT), które transportują małe molekuly do komórek poprzez zależną od klatryny endocytozę. SWNT jest związana z substratem za pomocą wiązań disiarczkowych, które w redukującym środowisku endosomu zostają przerwane, i następuje uwolnienie substancji transportowanej oraz jej internalizacja w komórce. Ten sposób został wykorzystany do dostarczania kompleksów Pt(IV) o wzorze  $c,c,t$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OEt)(O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)] bezpośrednio do komórek raka jąder. W normalnych warunkach były one niewrażliwe na ten związek, jednak przy pomocy SWNT stężenie leku w cytoplazmie wzrosło 6-krotnie, dzięki czemu ujawnił on swoją cytotoksyczność [37].

Sadler i wsp. zastosowali reakcję fotoaktywacji związków Pt(IV) i w ten sposób udało im się osiągnąć kontrolowaną redukcję tych kompleksów. Metoda ta może być użyteczna w terapii nowotworów łatwo dostępnych na działanie promieniowania. Pierwsze udane próby dotyczyły nowotworu pęcherza moczowego oraz skóry [36].

### **Cytochrom c jako sygnałowe białko apoptozy**

Mitochondrium to unikalna organella komórkowa, dbająca o zachowanie homeostazy. Jedną z najważniejszych protein wchodzących w jej skład jest cytochrom c. Jest to wielofunkcyjny enzym zaangażowany zarówno w procesy zapewniające przeżycie, jak i śmierć komórki. Uczestniczy w transporcie elektronów przez łańcuch oddechowy, a zatem jest niezbędnym elementem dla wytwarzania energii oraz bierze udział w formowaniu apoptosomu. Najnowsze badania nad dodatkowymi funkcjami cytochromu c, takimi jak aktywność peroksydacyjna względem kardiolipin [38–41] czy też wykrycie czterech miejsc fosforylacji, pokazują, że rodzaj działania podjętego przez tę hemoproteinę jest zależny od ścieżki sygnalizacyjnej, jaka na nią aktualnie wpłynie. Dlatego też tak istotne jest poznanie mechanizmów regulujących te ścieżki, co pozwoliłoby na stworzenie terapii celowanych w różnych chorobach związanych z procesem apoptozy.

### **Ścieżki apoptozy**

Zgodnie z najnowszymi doniesieniami z literatury istnieje kilkanaście procesów odpowiedzialnych za śmierć komórki. Są one podzielone na dwie grupy. Procesy typowe, do których zaliczane są apoptoza, nekroza, autofagia i kornifikacja, oraz procesy nietypowe, na które składa się m.in. katastrofa mitotyczna, anoiksis, pyroptoza czy netoza [42, 43]. Najważniejszym z nich jest jednak apoptoza (programowana śmierć komórki typu 1) — kluczowy, fizjologiczny proces niezbędny do utrzymania prawidłowego rozwoju tkanek i zachowania homeostazy organizmu, obejmujący pojedyncze komórki. Jednocześnie jakiegokolwiek zakłócenie w jej przebiegu może przyczynić się do wystąpienia licznych stanów patologicznych, takich jak choroby neurodegeneracyjne, sercowo-naczyniowe, autoimmunologiczne oraz nowotwory. Po raz pierwszy apoptozę opisali około 40 lat temu Kerr, Wyllie oraz Currie. Zauważyli oni szereg cech morfologicznych towarzyszących temu zjawisku, np. tworzenie pęcherzyków, kondensację chromatyny, fragmentację jądra, utratę zdolności adhezyjnych (w przypadku komórek wykazujących wcześniej tę właściwość), zaokrąglenie oraz kurczenie. Do biochemicznych cech związanych z apoptozą należy zaliczyć wysoką masę cząsteczkową, fragmentację DNA, eksternalizację fosfatydyloseryny i proteolityczne cięcie wielu wewnątrzkomórkowych substratów. Zmiany struktury błony komórkowej powodują szybką fagocytozę komórek apoptotycznych, co pozwala uniknąć uwolnienia ich składników do przestrzeni międzykomórkowej i zapoczątkowania procesu zapalnego [44].

Programowana śmierć komórki jest ściśle kontrolowanym zjawiskiem, w którym obumarcie zostaje wyegzekwowane poprzez aktywację odpowiednich ścieżek sygnalizacyjnych. Pomimo tego, iż biochemiczne i molekularne



czynniki biorące udział w apoptozie są skomplikowane i niecałkowicie poznane, dotychczasowe badania wyróżniają jako istotne „receptory śmierci” (*death receptors*) kaspazy, mitochondria, rodzinę białek BCL-2 oraz geny supresorowe nowotworu.

W zależności od czynnika inicjującego bądź rodzaju komórek aktywowane mogą być dwie główne ścieżki apoptotyczne: zewnętrzna i wewnętrzna. Pierwsza zachodzi za pośrednictwem „receptorów śmierci”, druga zostaje zapoczątkowana wewnątrz komórki wskutek zakłócenia jej homeostazy i uczestniczą w niej liczne organelle, takie jak retikulum endoplazmatyczne, aparaty Golgiego, lizosomy oraz mitochondria, które prawdopodobnie odgrywają najistotniejszą rolę w przebiegu tego procesu [45].

### **Zewnętrzna ścieżka apoptotyczna**

W zewnętrznej ścieżce apoptotycznej sygnał lub ligand pochodzący z przestrzeni międzykomórkowej oddziałuje z receptorem osadzonym w błonie komórkowej, inicjując tym samym kaskadę zdarzeń prowadzących do programowanej śmierci. Rodzina „receptorów śmierci” składa się m.in. z białek FAS i TNF (*tumor necrosis factor* — czynnik martwicy nowotworów). Receptory te zbudowane są z dwóch elementów — zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligandy, bogatej w cząsteczki cysteiny, oraz wewnątrzkomórkowej „domeny śmierci” (*death domain* — DD). W momencie przyłączenia liganda „receptory śmierci” przekazują sygnał cytozolowym białkom adaptorowym np. FADD (*Fas-associated death domain*), RIP, które z kolei aktywują kaskadę kaspaz i/lub inne ścieżki sygnalizacyjne, np. kinazy MAP [45]. Czynniki uszkodzające DNA często oddziałują na receptory ścieżki zewnętrznej, np. kompleks DIS, składający się z FADD, prokaspazy 8 i 10, przez co pośrednio inicjują kaskadę kaspaz, zakończoną strawieniem nici kwasu deoksyrybonukleinowego przez DNA-zę CAD (*caspase-activated DNase*), a także jednoczesną inaktywację komórkowych protein jako wynik działania kaspazy 3 i 7 [46].

Kaspazy należą do grupy cytozolowych proteaz i pełnią ważną rolę inicjującą oraz wykonawczą w procesie apoptozy. Ze względu na specyficzność względem substratu i rodzaj wykonywanych funkcji dzielą się na kaspazy inicjatorowe (np. kaspaza 8, 9 i 10), które dają początek sygnałowi apoptotycznemu i nasilają go, oraz kaspazy efektorowe (np. kaspaza 2, 3, 6 i 7), rozkładające wiele ważnych składników komórki. W momencie przyłączenia liganda wywołującego apoptozę do „receptora śmierci” białka adaptorowe domen śmierci bezpośrednio aktywują kaspazy inicjatorowe [45].

### **Wewnętrzna ścieżka apoptotyczna**

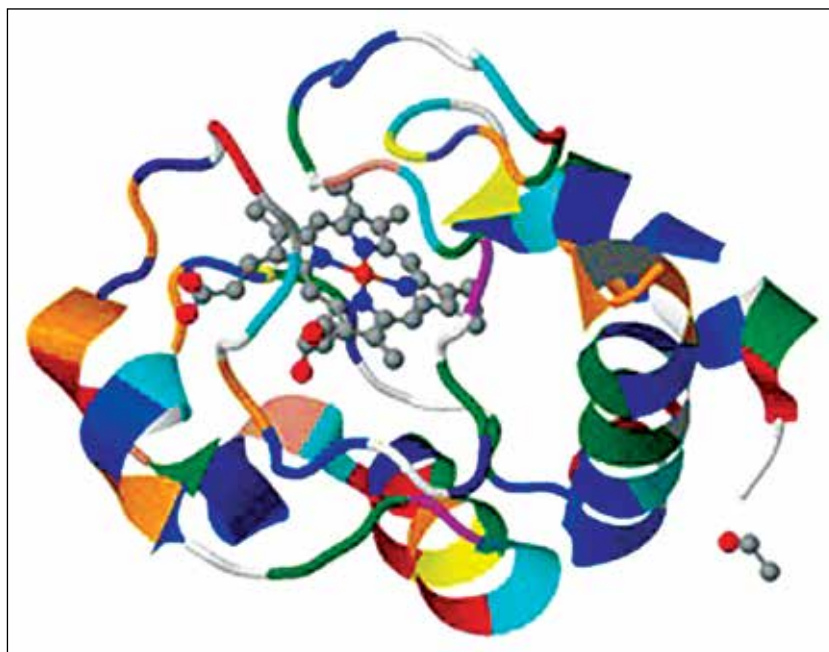
W przeciwieństwie do zewnętrznej ścieżki apoptotycznej wewnętrzna ścieżka zapoczątkowana zostaje wewnątrz komórki jako skutek zakłócenia homeostazy [45]. Istotną rolę w jej przebiegu pełnią mitochondria, które w komórkach

apoptotycznych pozostawały nienaruszone, podczas gdy jądrowa chromatyna i inne składniki komórkowe ulegały kondensacji. Prawidłowa produkcja ATP zapewniona wyłącznie przez nienaruszone mitochondria wydaje się być niezbędna przy przeprowadzaniu kontrolowanej delecji komórki [47].

O nieodwracalnym rozpoczęciu procesu apoptozy świadczy wystąpienie dwóch zjawisk: kaskada aktywacji kaspaz oraz zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej. W przeciwieństwie do błony zewnętrznej przepuszczalność błony wewnętrznej mitochondrium z towarzyszącym jej obrzękiem mitochondrium nie zawsze pojawia się podczas programowanej śmierci komórki. Białka przebywające w przestrzeni międzybłonowej w prawidłowych warunkach — cytochrom c, drugi mitochondrialny aktywator kaspaz, kinaza adenylanowa, czynnik indukcji apoptozy (*apoptosis inducing factor* — AIF), a także niektóre prokaspazy (np. 2, 3 oraz 9) podczas apoptozy zostają uwolnione do cytoplazmy. Wydostanie się cząsteczek proapoptotycznych poza mitochondrium skutkuje szybkim zapoczątkowaniem kaskady reakcji prowadzącej do śmierci komórki. Mechanizmy odpowiedzialne za apoptotyczną przepuszczalność błony zewnętrznej oparte są na dwóch teoriach. Według pierwszej zewnętrzna błona mitochondrialna ulega nieswoistemu przerwaniu; druga zakłada powstawanie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej kanałów, które umożliwiają wpływ cytochromu c [48].

Jednym z czynników wpływających na zmianę przepuszczalności błony mitochondrium są białka rodziny BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), należące do grupy protoonkogenów. W momencie aktywacji białko proapoptotyczne BAX zostaje umieszczone w membranie mitochondrium i zwiększa jej przepuszczalność, przyczyniając się w ten sposób do uwolnienia zawartości macierzy i w następstwie — apoptozy. Z kolei antyapoptotyczne białko BCL-2 hamuje aktywność BAX, dzięki czemu potencjał błony mitochondrialnej nie ulega zmianie. Przedstawione fakty świadczą o tym, że śmierć komórki w dużej mierze zależy od równowagi pomiędzy obiema frakcjami tych białek.

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej są reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species* — ROS). Wolne rodniki tlenowe produkowane są w mitochondrium na poziomie łańcucha oddechowego. W wyniku zachwiania homeostazy komórki przez różne czynniki uszkodzające może dojść do nadprodukcji ROS. Ich nadmiar skutkuje zwiększeniem przepuszczalności błony mitochondrialnej oraz dalszym zakłóceniem łańcucha oddechowego, co dodatkowo nasila produkcję kolejnych wolnych rodników tlenowych. Powstaje więc sprzężenie zwrotne dodatnie. Uszkodzenie membrany mitochondrium bezpośrednio ułatwia wpływ cytochromu c do cytozolu [47]. Badania wykazały, że ROS mogą również pośrednio zwiększać utratę tej hemoproteiny z macierzy mitochondrialnej poprzez interakcję z kardioli-



**Rycina 8.** Struktura przestrzenna cząsteczki cytochromu c [55]

pinami — fosfolipidami wchodzącymi w skład wewnętrznej błony mitochondrialnej, które zawierają podatne na atak ROS nienasycone kwasy tłuszczowe. W prawidłowych warunkach cytochrom c pozostaje przyłączony do cząsteczki kardiolipiny. Peroksydacja lipidów powoduje zerwanie tego połączenia i uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy [49], poza tym eksperymenty wykazały udział ROS w zewnętrznej ścieżce apoptotycznej w powiązaniu z TNFR i FAS. Tworzenie wolnych rodników tlenowych często jest związane z ekspozycją na metale, co też uważa się za główną przyczynę apoptozy przez nie indukowanej.

Geny supresorowe nowotworów także zdolne są do wywoływania programowanej śmierci komórki. W wyniku uszkodzenia DNA zostaje aktywowany gen *p53*, który hamuje ekspresję genów dla białka BCL-2, a jednocześnie nasila ekspresję proapoptotycznych genów, takich jak *BAX* czy *FAS* [45].

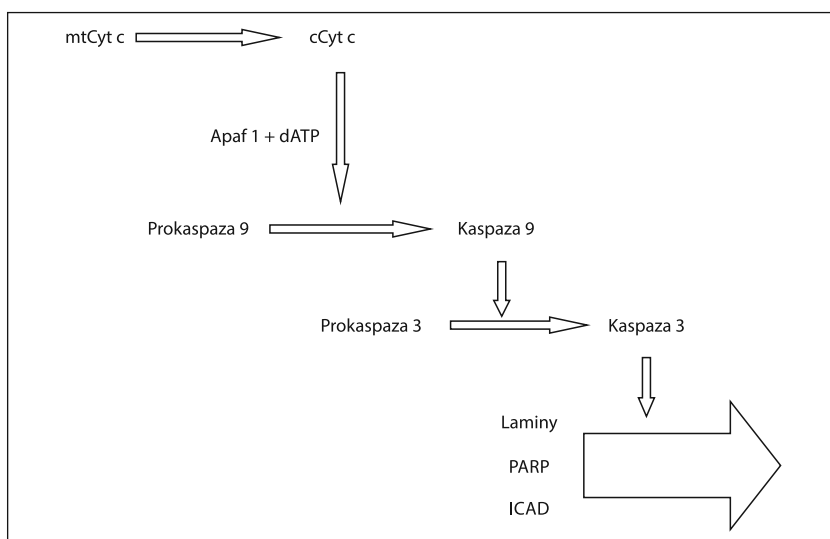
Chociaż przez lata śmierć komórki na drodze apoptozy uważana była za proces nie-immunogeny, najnowsze badania pokazują, że oksaliplatyna prowadzi do śmierci komórki nowotworowej na drodze immunogennej apoptozy [50–52]. Aby do apoptozy komórki doszło w wyniku odpowiedzi immunologicznej konieczne jest spełnienie wielu warunków, a w szczególności wymagana jest proapoptotyczna ekspozycja karletikuliny i postapoptotyczne uwolnienie białka HMGB1. Pomimo wielu podobieństw pomiędzy cisplatiną i oksaliplatiną mechanizm ich działania, prowadzący do apoptozy komórki nowotworowej, jest różny. Najważniejsza różnica na poziomie biochemicznym dotyczy poziomu ekspozycji karletikuliny (CRT) — pierw-

szego czynnika niezbędnego do immunogennej śmierci komórki. Oksaliplatyna w odróżnieniu od cisplatyny stymuluje translokację CRT z retikulum endoplazmatycznego do przestrzeni komórki. Jakkolwiek oba związki w podobny sposób indukują uwolnienie HMGB1 — drugiego wyznacznika immunogenności, uważa się, że cisplatina wywołuje śmierć komórki na drodze nieimmunogennej apoptozy. Różnica ta może być prawdopodobnym wyjaśnieniem braku skuteczności cisplatyny w terapii chorych z zaawansowanym rakiem jelita grubego oraz innych nowotworów wrażliwych na oksaliplatinę [51].

## **Budowa i funkcje cytochromu c**

### ***Budowa cytochromu c***

Cytochrom c jest mitochondrialną proteiną kodowaną przez DNA jądrowe, zbudowaną u ssaków ze 104 aminokwasów (ryc. 8). Synteza formy prekursorowej, zwanej apocytochromem c, zachodzi na rybosomach w cytoplazmie. Następnie zostaje ona przetransportowana do zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Cząsteczka apocytochromu c nie posiada hemu, dopiero jego przyłączenie za pomocą enzymu — liazy hemowej — skutkuje powstaniem czynnej fizjologicznie holoproteiny [47, 54]. Grupa hemowa połączona jest kowalencyjnie z łańcuchem peptydowym za pomocą wiązań pomiędzy ugrupowaniami tioeterowymi reszt cysteiny 14 i 17 a grupami winylowymi protoporfiryny. Żelazo hemowe znajduje się w konfiguracji heksakoordynacyjnej z His-18 i Met-80 jako ligandami aminokwasowymi. Wiązanie pomiędzy żelazem hemowym a Met-80 powoduje powstanie słabego pasma absorpcyj-



**Rycina 9.** Schemat przedstawiający kaskadę aktywacji kaspaz zainicjowaną uwolnieniem cytochromu c do cytoplazmy (mtCyt c — mitochondrialny cytochrom c; cCyt c — cytozolowy cytochrom c; PARP — poli(ADP-rybozo)polimeraza) [47]

nego przy długości fali 695 nm na widmie utlenionego cytochromu c. Grupa hemowa znajduje się w środowisku hydrofobowym wskutek sąsiedztwa łańcuchów bocznych aromatycznych i alifatycznych aminokwasów oraz ligandów żelaza — Met-80 i His-18. Tylko 7,5% powierzchni hemu jest eksponowane na otaczający proteinę rozpuszczalnik i fragment ten stanowi miejsce przenoszenia elektronów od kompleksu  $bc_1$  do oksydazy cytochromowej [53].

### **Rola cytochromu c w procesie fosforylacji oksydacyjnej**

Celem procesu fosforylacji oksydacyjnej jest wytworzenie ATP (adenozyno-5'-trifosforan), będącego nośnikiem energii chemicznej niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania komórki. Proces ten zachodzi w kompleksie związków zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, z których część tworzy łańcuch transportujący elektrony (*elektron transport chain* — ETC), a część — syntazę ATP. Syntaza ATP to obrotowy nano-silnik zmieniający potencjał membranowy w energię rotacyjną, a następnie chemiczną, związaną w wysokoenergetycznym wiązaniu powstałym przez przyłączenie reszty fosforanowej do ADP. Fosforylacja oksydacyjna jest napędzana dzięki różnym cząsteczkom dostarczającym elektrony do łańcucha oddechowego, np. NADH i  $FADH_2$ . Przemieszczaniu elektronów przez dehydrogenazę NADH (kompleks ETC I), kompleks  $bc_1$  (III) i oksydazę cytochromową (IV) towarzyszy uwolnienie energii, która jest wykorzystywana do przepompowywania jonów  $H^+$  z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Różnica w stężeniach protonów po obu stronach błony skutkuje powstaniem potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ). Jest on wykorzystywany przez syntazę ATP (kompleks V) do produkcji cząsteczek adenosyno-5'-trifosforanu.

Cytochrom c jest pojedynczym przenośnikiem elektronów pomiędzy kompleksem  $bc_1$  a oksydazą cytochromową w końcowej części ETC. Na tym etapie zredukowany cytochrom c przekazuje elektron kompleksowi IV, co po czterech cyklach pozwala na redukcję atomu tlenu poprzez wytworzenie z protonami cząsteczki wody. Zjawisku temu towarzyszy wydzielenie wolnej energii  $\Delta G^0 = -100$  kJ/mol [53].

### **Rola cytochromu c w procesie apoptozy**

Fundamentalne znaczenie cytochromu c dla rozwoju i życia komórki wynika nie tylko z jego udziału w produkcji ATP, lecz także pełnienia kluczowej roli w procesie apoptozy. Obecnie przyjęto, że najistotniejszym etapem w wyzwalaniu mitochondrialnej ścieżki apoptotycznej jest uwolnienie do cytoplazmy cytochromu c (ryc. 9) [53]. Tam uczestniczy on w tworzeniu apoptosomu, czyli kompleksu aktywującego kaspazę 9. Eksperymenty wykazały, że cytochrom c, APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), prokaspaza 9 i dATP/ATP są konieczne i zarazem wystarczające do utworzenia apoptosomu, aczkolwiek mogą być również zaangażowane dodatkowe proteiny, np. XIAP (*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis*). APAF-1 występuje w cytoplazmie w formie nieaktywnego monomeru o zamkniętej konformacji. Przyłączenie się cytochromu c do domeny WD40 APAF-1 stabilizuje uzyskaną przez niego konformację otwartą i pozwala na hydrolizę dATP/ATP, związanego uprzednio z kompleksem apoptosomu przy pomocy domeny wiążącej nukleotydu. Następuje wymiana nukleotydu, a po niej oligomeryzacja z wytworzeniem polimeru zbudowanego z 7 cząsteczek APAF-1. Heptamer rekrutuje i aktywuje cząsteczki prokaspazy 9 przy udziale domeny CARD (*caspase recruitment domain*) [56]. Związane kaspazy 9 aktywują poprzez cięcie kaspazy 3, które są uważane za główne en-

zymy efektorowe apoptozy. Duże znaczenie cytochromu c dla przebiegu tego procesu potwierdziły badania, które wykazały, że w komórkach pozbawionych cytochromu c występuje znaczne osłabienie aktywacji kaspaz 3 po ekspozycji na czynniki stymulujące apoptozę. Inne eksperymenty dostarczyły dowodów na to, że uwolnienie cytochromu c stymuluje wiązanie trifosforanu inozytolu (IP3) do receptorów, skutkujące wyrzutem jonów  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy, i w konsekwencji aktywacją AIF (*apoptosis inducing factor*).

Uwalnianie cytochromu c z przestrzeni międzymbłonowej mitochondrium może być selektywnym procesem wymagającym przekroczenia pewnego progu stężenia tej hemoproteiny w cytozolu. W takich warunkach przebiega on nieodwracalnie w kierunku programowanej śmierci komórki [53].

Badacze przypuszczają, że stopień utlenienia cytochromu c również może wpływać na formację apoptosomu; utleniona i zredukowana forma cytochromu c mogą różnić się między sobą powinowactwem do APAF-1 i/lub zdolnością jego aktywacji [56].

Zaburzenia funkcjonowania cytochromu c często prowadzą do wystąpienia ciężkich schorzeń. Przykładem mogą być choroby neurodegeneracyjne, spowodowane zniszczeniem neuronów wskutek indukcji apoptozy. Nieprawidłowości w działaniu mitochondrium i w konsekwencji uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, a następnie programowana śmierć komórki zostały wykazane zarówno dla ostrych urazów neurologicznych (np. udar mózgu), jak i wielu chorób przewlekłych (pląsawica Huntingtona, choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne). Zapobieganie apoptozie poprzez jak największe zmniejszenie uwalniania cytochromu c do cytozolu daje nadzieję na spowolnienie progresji wyżej wymienionych chronicznych chorób neurologicznych [53].

### **Oddziaływanie kompleksów platyny z cytochromem c**

Stosowanie leków platynowych niesie ze sobą wiele działań niepożądanych, dlatego też prowadzone są badania nad nowymi, lepszymi pochodnymi. Powoli odchodzi się również od projektowania związków platyny, których głównym celem ataku jest DNA. Zwraca się natomiast uwagę na inne elementy komórki, które są kluczowe dla jej żywotności. Stąd też zainteresowanie cytochromem c będącym wielofunkcyjnym enzymem uczestniczącym zarówno w procesach przeżycia, jak i śmierci komórki.

Badania dowiodły, że cisplatyna wykazuje duże powinowactwo do związków zawierających siarkę, co skutkuje występowaniem wielu efektów ubocznych podczas farmakoterapii. W celu dokładniejszego zbadania tego zagadnienia przeprowadzono serię eksperymentów z różnymi związkami zawierającymi atomy siarki, w tym również z cytochromem c [57]. W miarę rozwoju badań i odkrywania kolejnych funkcji, jakie w komórce spełnia ta hemoproteina, udowodniono,

że poprzez działanie leków platynowych na cytochrom c można wpłynąć na szereg procesów kluczowych dla funkcjonowania komórki, w tym na proces apoptozy.

### **Określenie miejsc wiązania kompleksów platyny z białkiem**

Jak wcześniej wspomniano, cisplatyna wykazuje nieco wyższe powinowactwo do donorów siarkowych w porównaniu z N-donorami [58]. W przypadku cytochromu c szczególnie predysponowane do przyłączenia kompleksów Pt(II) są łańcuchy boczne kilku aminokwasów, tj. cysteiny, metioniny i histydy. W celu określenia potencjalnych miejsc wiązania leków platynowych dokonano analizy sekwencji aminokwasowej białka oraz jego struktury krystalicznej, a następnie wytypowano 7 aminokwasów cechujących się dobrą dostępnością: Cys-14, Cys-17, Met-65, Met-80, His-18, His-26 i His-33 [59]. Z wymienionych aminokwasów Met-80 ma szczególne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania cytochromu c, ponieważ tworzy ona wiązanie z żelazem jednostki hemowej, odpowiedzialne za wysoki potencjał redukcyjny tej hemoproteiny. Wiązanie to generuje specyficzne pasmo przy długości fali równej 416 nm w widmie uzyskanym za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Pasma to jest wskaźnikiem obecności wiązania aksjalnego Fe(III)-Met-80 i zanika w przypadku jego uszkodzenia lub zerwania, spowodowanego zmianą konformacji białka wywołaną przez środki denaturujące lub przyłączenie cząsteczek wykazujących powinowactwo do tej hemoproteiny [60].

Zaangażowanie Met-80 i His-18 w utworzenie wiązania z żelazem jednostki hemowej, a dwóch reszt cysteinowych (Cys-14 i Cys-17) w przyłączenie grupy hemowej do łańcucha polipeptydowego, powoduje, że są one mało podatne na interakcję z kompleksami Pt(II) [59].

Pierwsze badania mające na celu dokładne określenie miejsc wiązania leków platynowych z cytochromem c zostały przeprowadzone z użyciem techniki protonowego rezonansu jądrowego  $^1H$  NMR. Produkty reakcji kompleksów platyny z cytochromem c poddano chromatografii jonowymiennej, w wyniku czego uzyskano 3 frakcje, nazwane odpowiednio A, B i C. Frakcję A stanowił głównie natywny cytochrom c, natomiast frakcje B i C zawierały addukty cisplatyna-cyt c w stosunku molowym Pt:Fe równym 1:1. Następnie wykonano widmo  $^1H$  NMR każdej z frakcji. Widma B i C były prawie identyczne i posiadały, odróżniający je od widma A, pik pochodzący od Met-65. Przesunięcia chemiczne His-26 i His-33 nie różniły się między sobą w żadnym z widm, co pozwalało na stwierdzenie, że leki platynowe wiążą się z cytochromem c poprzez grupę tioeterową Met-65 [61]. W tym miejscu należy przypomnieć, że wiązanie cisplatyny z siarką tioeterową metioniny odgrywa decydującą rolę w metabolizmie leku, jego wiązaniu z białkami i transferze do DNA [62, 63]. Z drugiej strony badania metodą rentgeno-

grafii strukturalnej pokazały, że histydyna odgrywa kluczową rolę w wiązaniu leków na bazie platyny z białkami [64–67].

Późniejsze badania potwierdziły prawdziwość założenia, że pierwszorzędowym miejscem wiązania leków platynowych z cytochromem c jest Met-65, natomiast His-26 i His-33 stanowią miejsca drugorzędowe. Jeden z eksperymentów polegał na poddaniu procesowi trawienia trypsyną naturalnego cytochromu c oraz jego adduktów z cisplatyną, a następnie analizie produktów za pomocą spektrometrii masowej z transformacją Fouriera. Wysoka dokładność tej techniki pozwoliła na ustalenie miejsc wiązania z niezwykłą precyzją. Badania te dowiodły również, że wzrost stosunku molowego Pt:cyt c zwiększa odsetek powstałych adduktów lek-białko [68].

W najnowszych badaniach strukturalnych adduktu cisplatyna-cytochrom c próbowano ostatecznie potwierdzić sposób i miejsca wiązania leku. Uzyskane monokryształy pokazały, że cisplatyna z cytochromem c tworzy 2 typy adduktów. Pierwszy z nich tworzy fragment  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ , skoordynowany w sposób monokleszczowy z Met65, drugi,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^+$ , związany jest w sposób dwukleszczowy jednocześnie z Met65 oraz Glu65. Nie były obserwowane wiązania z resztami histydynowymi uważanymi za niezwykle istotne w wiązaniu leków platynowych z białkami. Interesujący jest fakt, że wiązanie cisplatyny z cytochromem c nie wpływa znacząco na ogólną konformację białka i jednostki hemowej. Obok niewielkich modyfikacji w pozycji łańcuchów bocznych najbardziej znaczące różnice w strukturze cytochromu obserwowane były blisko miejsc wiążących platynę [69].

Reasumując, przeprowadzone dotychczas badania wykazują, że platynowanie białka ma różny charakter, nawet w tym samym systemie białkowym, a także w obrębie jednego miejsca wiążącego sposób wiązania leku (jedno- lub dwukleszczowy) może być różny.

### **Określenie ilości leku związanego z białkiem**

W badaniach przeprowadzonych przez Casini i wsp. z użyciem technik spektroskopowych [70] próbki karboplatyny oraz cytochromu c przygotowano w warunkach zbliżonych do fizjologicznych i zastosowano trzykrotny nadmiar leku w stosunku do białka. Analiza otrzymanych widm wykazała tworzenie dwóch różnych strukturalnie adduktów, jednak oba posiadały stosunek molowy Pt:cyt c równy 1:1. Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym przez Gabbiani i wsp. [59], w którym próbki przygotowano w ten sam sposób. Również w tym przypadku na widmie ESI-MS kompleksów karboplatyny z cytochromem c wykazano obecność dwóch głównych multipletów odpowiadających powstałym dwu typom adduktów. Pierwszym był kompleks cytochromu c z grupą  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  (ok. 12586 Da), natomiast drugim — połączenie hemoproteiny z cząsteczką karboplatyny, która nie utraciła liganda cyklobutylo-dikarboksyłowego (12700-12750 Da). Zmiana warunków

inkubacji (wydłużenie czasu trwania inkubacji z trzech dni do tygodnia, zwiększenie stosunku molowego wyjściowych reagentów — Pt:cyt c = 10:1) nie wpłynęła na rodzaj tworzonych adduktów — nadal przeważającą grupę stanowiły monoaddukty [59].

Ilościową analizę oddziaływania cisplatyny z cytochromem c przeprowadzili m.in. Jiang i wsp. [61]. Reakcję tych dwu reagentów prowadzono w środowisku buforu fosforanowego o pH = 5,50 oraz 7,00 i inkubowano w temperaturze 25°C przez 24 h. Po tym czasie przeprowadzono rozdział w kolumnie chromatograficznej. W wyniku rozdziału otrzymano trzy frakcje, z których jedna okazała się być natywnym cytochromem c, natomiast dwie pozostałe zawierały addukty cisplatyny z hemoproteiną o masie zbliżonej do 1,2·10<sup>4</sup> Da, co oznaczało, że cisplatyna w warunkach eksperymentu tworzy z cytochromem c monomery. Zmiana warunków przygotowania próbek, tj. zwiększenie temperatury inkubacji do 37°C oraz wydłużenie czasu jej trwania do 72 h, doprowadziło do otrzymania niewielkich ilości dimerów cytochromu c z cisplatyną. Nie wykluczono zatem, że w drastyczniejszych warunkach eksperymentu siarka grupy tiolowej cysteiny w łańcuchu aminokwasowym cytochromu c zwiększa labilność grupy aminowej cisplatyny, powodując zmianę jej położenia w cząsteczce z *cis* na *trans*, dzięki czemu możliwe staje się przyłączenie drugiej molekuly białka [61]. Z kolei wyżej wspomniane badania Casini i wsp. [70] dostarczyły szczegółowych informacji na temat produktów powstałych w wyniku reakcji cisplatyna-cyt c przy trzykrotnym nadmiarze cytostatyku. Na podstawie ICP-OES ustalono poziom uplatynowania cytochromu c jako 1,2–1,5 mola Pt na 1 mol białka. Widma ESI-MS pomogły określić stosunki molowe składników wytworzonych adduktów. Intensywny multiplet, odpowiadający masie 12589 Da, stanowił cytochrom c związany z resztą  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ . Drugi multiplet wystąpił przy masie 12816 Da dla adduktu złożonego z hemoproteiny i dwóch reszt  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ . Zaobserwowano również słabe sygnały odpowiadające stosunkowi Pt:cyt c równemu 3:1. Zatem wyniki tych badań wykazały, że cisplatyna tworzy z cytochromem c wiele adduktów, w których stosunek Pt-białko przyjmuje wartości w zakresie od 1:1 do 3:1 [70]. Badania przeprowadzone przez Zhao i Kinga z użyciem ESI-MS [68] wykazały, że głównym produktem tworzonym przez cisplatynę i cytochrom c jest monoaddukt cyt c-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O), natomiast brak jest połączenia cyt c-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl, co oznacza, iż białko jest przyłączane w miejscu cząsteczki wody podwójnie uwodnionej cisplatyny.

W porównawczym badaniu interakcji transplatyny z cytochromem c, opisanym przez Casini i wsp. [70], wykazano, że w przypadku tego związku otrzymano również jeden multiplet przy masie 12589 Da (cytochrom c+ $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ ), natomiast nie wykazano sygnałów korespondujących z adduktami o stosunku Pt/cytochrom c równym 2:1 lub 3:1 (w podanych wcześniej warunkach eksperymentu). Jakkol-

wiek widma ESI-MS adduktów utworzonych przez związki platyny i cytochrom c w zaostrzonych warunkach inkubacji dowiodły wytworzenia poliadduktów składających się z jednej cząsteczki hemoproteiny i dwóch, trzech lub czterech reszt kompleksu platyny, to zjawisko to, jak wspomniano wcześniej, nie dotyczyło karboplatyny.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

**Dr Urszula Śliwińska-Hill**

Katedra i Zakład Chemii Analitycznej  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
ul. Borowska 211 A, 50-566 Wrocław  
e-mail: urszula.sliwinska-hill@umed.wroc.pl

Otrzymano: 2 czerwca 2015 r.

Przyjęto do druku: 22 października 2015 r.

### Piśmiennictwo

- Mould RF. Evolution of the knowledge of cancer from earliest times to the end of the 18th century. *Nowotwory J Oncol* 2008; 58: 172–185.
- Malinowska K, Modranka R, Kędziora J. Leki przeciwnowotworowe stosowane w lecznictwie oraz będące w fazie badań klinicznych. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 165–169.
- Trynda-Lemiesz L, Śliwińska-Hill U. Kompleksy metali w terapii nowotworowej. Teraźniejszość i przyszłość. *Nowotwory J Oncol* 2011; 61: 1–21.
- Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42: 317–325.
- Martin RB. Hydrolytic equilibria and N7 versus N1 binding in purine nucleosides of cis-diamminedichloroplatinum(II). *ACS Symp Ser* 1983; 209: 231–244.
- Kozelka J, Legendre F, Reeder F i wsp. Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes. *Coord Chem Rev* 1999; 190–192: 61–82.
- Pizarro AM, Sadler PJ. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* 2009; 91: 1198–1211.
- Chaney SG, Campbell SL, Bassett E i wsp. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 3–11.
- Suchankova T, Kubicek K, Kasparkova J i wsp. Platinum-DNA interstrand crosslinks: molecular determinants of bending and unwinding of the double helix. *J Inorg Biochem* 2012; 108: 69–79.
- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinum agents. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 9–23.
- Gelasco A, Lippard SJ. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* 1998; 37: 9230–9239.
- McDonald ES, Randon KR, Knight A i wsp. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 305–313.
- Hellberg V, Wallin I, Eriksson S i wsp. Cisplatin and oxaliplatin toxicity: importance of cochlear kinetics as a determinant for ototoxicity. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 37–47.
- Bernal SD, Speak JA, Boenheim K i wsp. Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cis-platinum. *Mol Cell Biochem* 1990; 95: 61–70.
- Kawai K, Kamatani N, Georges E i wsp. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *J Biol Chem* 1990; 265: 13137–13142.
- Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478: 23–43.
- Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7369–7375.
- van der Straaten T, Kweekeel D, Tiller M i wsp. Multiplex pyrosequencing of two polymorphisms in DNA repair gene XRCC1. *J Mol Diagn* 2006; 8: 444–448.
- Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S i wsp. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3075–3079.
- Siddiqui-Jain A, Bliesath J, Macalino D i wsp. CK2 inhibitor CX-4945 suppresses DNA repair response triggered by DNA-targeted anticancer drugs and augments efficacy: mechanistic rationale for drug combination therapy. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 994–1005.
- Kudo K, Gavin E, Das S i wsp. Inhibition of Gli1 results in altered c-Jun activation, inhibition of cisplatin-induced upregulation of ERCC1, XPD and XRCC1, and inhibition of platinum-DNA adduct repair. *Oncogene* 2012; 31: 4718–4724.
- Xu W, Wang S, Chen Q i wsp. TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1055.
- Wheate NJ, Collins JG. Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coord Chem Rev* 2003; 241: 133–145.
- Orlandi L, Colella G, Bearzatto A i wsp. Effects of a novel trinuclear platinum complex in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines: interference with cell cycle progression and induction of apoptosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: 649–659.
- (2015, 08 October) ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. Online.. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00014547?term=bbr+3464&rank=1/>
- (2015, 08 October) ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. Online. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00024362?term=bbr+3464&rank=2>
- Natile G, Coluccia M. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coord Chem Rev* 2001; 216–217: 383–410.
- Kasparkova J, Marini V, Bursova V i wsp. Biophysical studies on the stability of DNA intrastrand cross-links of transplatin. *Biophys J* 2008; 95: 4361–4371.
- Hall MD, Mellor HR, Callaghan R i wsp. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J Med Chem* 2007; 50: 3403–3411.
- Varbanov H, Valiahdhi SM, Legin AA i wsp. Synthesis and characterization of novel bis(carboxylato)dichloridobis(ethylamine) platinum(IV) complexes with higher cytotoxicity than cisplatin. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 5456–5464.
- (2015, 09 October) ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. Online.. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00265655?term=satraplatin&rank=5>
- (2015, 09 October) ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. Online.. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00499694?term=satraplatin&rank=12>
- (2015, 09 October) ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health. Online.. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00268970?term=satraplatin&rank=7>
- Ang WH, Khalaila I, Allardyce CS i wsp. Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 1382–1383.
- Kasparkova J, Novakova O, Vrana O i wsp. Molecular aspects of anti-tumor effects of a new platinum(IV) drug. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1708–1719.
- Bruijnincx PC, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12: 197–206.
- Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai H i wsp. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum(IV) anticancer drug design. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 8438–8439.
- Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardioprotection and mitochondrial protection by cytochrome c free. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 188–189.
- Tyurina YY, Kini V, Tyurin VA i wsp. Mechanisms of cardioprotection by cytochrome c: relevance to pro- and antiapoptotic functions of etoposide. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 706–717.
- Li XX, Tsoi B, Li YF i wsp. Cardioprotection and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2015; 63: 301–311.
- Ascenzi P, Marino M, Polticelli F i wsp. Cardioprotection modulates allosterically the nitrite reductase activity of horse heart cytochrome c. *J Biol Inorg Chem* 2014; 19: 1195–1201.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P i wsp. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3–11.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM i wsp. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19: 107–120.
- Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (4 Suppl): S99–103.
- Pulido MD, Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533: 227–241.
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced apoptosis: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 2013; 332: 237–248.

47. Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 139–149.
48. Rupniewska Z, Bojarska-Junak A. Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Post Hig Med Dosw* 2004; 58: 538–547.
49. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolesse M i wsp. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis. *FEBS Lett* 2001; 509: 435–438.
50. Inoue H, Tani K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ* 2014; 21: 39–49.
51. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V i wsp. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 2010; 29: 482–491.
52. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U i wsp. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009; 28: 578–590.
53. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M i wsp. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 2011; 11: 369–381.
54. Muga A, Mantsch HH, Surewicz WK. Apocytochrome c interaction with phospholipid membranes studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 1991; 30: 2629–2635.
55. Protein Data Bank. Online. <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=36>.
56. Brown GC, Borutaite V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 877–881.
57. Moreno-Gordaliza E, Cãnas B, Palacios MA i wsp. Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC–ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach. *Talanta* 2012; 88: 599–608.
58. Messori L, Merlino A. Cisplatin binding to proteins: molecular structure of the ribonuclease a adduct. *Inorg Chem* 2014; 53: 3929–3931.
59. Gabbiani C, Casini A, Mastrobuoni G i wsp. Peculiar mechanistic and structural features of the carboplatin-cytochrome c system revealed by ESI-MS analysis. *J Biol Inorg Chem* 2008; 13: 755–764.
60. Santucci R, Ascoli F. The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *J Inorg Biochem* 1997; 68: 211–214.
61. Lijuan J, Yu C, Guozi T i wsp. Studies on the interaction between cytochrome c and cis-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. *J Inorg Biochem* 1997; 65: 73–77.
62. Reedijk J. Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes. *Platinum Met Rev* 2008; 52: 2–11.
63. Wu B, Droge P, Davey CA. Site selectivity of platinum anticancer therapeutics. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 110–112.
64. Helliwell JR, Tanley SW. The crystal structure analysis of the relative binding of cisplatin and carboplatin in a mixture with histidine in a protein studied at 100 and 300 K with repeated X-ray irradiation. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* 2013; 69: 121–125.
65. Tanley SW, Schreurs AM, Kroon-Batenburg LM i wsp. Structural studies of the effect that dimethyl sulfoxide has on cisplatin and carboplatin binding to histidine in a protein. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* 2012; 68: 601–612.
66. Tanley SW, Schreurs AM, Kroon-Batenburg LM i wsp. Room-temperature X-ray diffraction studies of cisplatin and carboplatin binding to His15 of HEWL after prolonged chemical exposure. *Acta Crystallogr, Sect F: Struct Biol Cryst Commun* 2012; 68: 1300–1306.
67. Karasawa T, Sibrian-Vazquez M, Strongin RM i wsp. Identification of cisplatin-binding proteins using agarose conjugates of platinum compounds. *PLoS One* 2013; 8: e66220.
68. Zhao T, King FL. Direct determination of the primary binding site of cisplatin on cytochrome c by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20: 1141–1147.
69. Ferraro G, Messori L, Merlino A. The X-ray structure of the primary adducts formed in the reaction between cisplatin and cytochrome c. *Chem Commun* 2015; 51: 2559–2561.
70. Casini A, Gabbiani C, Mastrobuoni G i wsp. Exploring metaldrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: the reaction of anticancer platinum drugs with horse heart cytochrome c. *ChemMedChem* 2006; 1: 413–417.