

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

**Stanovení cytotoxicity organokovových komplexů
přechodných kovů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Lucie Šebestová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Biological and Biochemical Sciences

**Determination of cytotoxicity of organometallic
complexes containing transitional metal**

BACHELOR'S THESIS

Author: Lucie Šebestová

Leader: doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Šebestová**
Osobní číslo: **C09399**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Stanovení cytotoxicity organokovových komplexů přechodných kovů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Na základě provedené literární rešerše popsat současný stav poznání o účinku organokovových komplexů přechodných kovů na nádorové buňky.
 - b) Zaměřit se především na vysvětlení jejich možného mechanismu účinku a stanovení cytotoxicity.
- 2) Praktická část:
 - a) Osvojit si techniky práce s buněčnou linií MOLT-4, její kultivaci a pasážování.
 - b) Provést stanovení cytotoxicity vybraných komplexů přechodných kovů pomocí WST-1 testu.
 - c) Naměřená data zpracovat za pomoci odpovídajících počítačových programů.
 - d) Na základě získaných hodnot IC₅₀ diskutovat vliv centrálního kovu a ligandů na hodnotu nalezeného cytostatického účinku.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.

Katedra obecné a anorganické chemie

Konzultant bakalářské práce:

doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Datum zadání bakalářské práce:

3. října 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně s využitím literárních pramenů a informací, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 19. června 2012

Lucie Šebestová

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Jaromíru Vinklárkovi, Dr. za odborné vedení a projevenou trpělivost při vypracovávání mé práce, Katedře obecné a anorganické chemie Fakulty chemicko – technologické Univerzity Pardubice za poskytnuté sloučeniny, Ústavu lékařské biochemie Karlovy univerzity v Hradci Králové za zázemí pro vykonání práce a možnosti konzultace a paní Naděždě Mazánkové za poskytnutou pomoc a cenné rady s prací v laboratoři.

Velké díky patří také mé rodině a přátelům za nepostradatelnou pomoc a podporu během celého studia.

První krok pro to, abyste od života získali to, co chcete, je rozhodnout se, co to je.

Ben Stein

Souhrn

Tato práce je zaměřená na studium cytotoxické aktivity organokovových sloučenin přechodných kovů. Testování bylo provedeno na buněčné linii MOLT-4 odvozené od lymfocytární T-buněčné leukémie pomocí WST-1 testu. Celkově bylo provedeno zkoumání a hodnocení inhibičního účinku (IC_{50}) u 42 organokovových komplexů obsahujících jako centrální atom přechodný kov vanad, niob a molybden. V každé skupině obsahující různý kov byla nalezena sloučenina s cytostatickou aktivitou odpovídající inhibiční aktivitě dosud nejpoužívanějšího protirakovinného léčiva, *cis*-DDP. Tyto nejúčinnější sloučeniny dále obsahovaly chelátově vázaný fenantrolin a stericky náročné ligandy (methoxyfenyl, cyklopentadienyl nebo indenyl).

Klíčová slova: rakovina, cytostatika, organokovové sloučeniny, stanovení cytotoxicity, apoptóza

Summary

This bachelor's thesis deals with cytotoxic activity of organometallic compounds of transition metals. The tests were done with the WST-1 test on the cell line MOLT-4 derivated from lymphocytic T-cell leukemia. Overall, the 42 complexes with the vanadium, niobium and molybdenum central atom were investigated. In each group one compound with the cytotoxic activity same as the cis-DPP, the most frequently used cytostatic drug, was found. These most efficient compounds also contain the chelate-bounded phenanthroline and sterically large ligands (methoxyphenyl, cyclopentadienyl or indenyl).

Keywords: cancer, cytostatic, organometallic compounds, determinative of cytotoxicity, apoptosis

Obsah

1	Úvod	13
2	Teoretická část	14
2.1	<i>Biologie nádorového růstu</i>	<i>14</i>
2.2	<i>Antitumorově aktivní organokovové sloučeniny</i>	<i>15</i>
2.2.1	Platinové komplexy I. generace	16
2.2.2	Platinové komplexy II. generace	18
2.2.3	Platinové komplexy III. generace	19
2.2.4	Komplexy titanu	20
2.2.5	Komplexy vanadu	21
2.2.6	Molybden	21
2.2.7	Ostatní prvky IV., V., VI. skupiny	22
2.2.8	Technecium	23
2.2.9	Železo	23
2.2.10	Ruthenium	24
2.2.11	Osmium	25
2.2.12	Kobalt	26
2.2.13	Rhodium	26
2.2.14	Iridium	26
2.2.15	Stříbro	27
2.2.16	Zlato	27
2.3	<i>Testování cytotoxicity, stanovení cytotoxicity in vitro</i>	<i>28</i>
2.3.1	Redukce tetrazoliových solí	28
2.3.2	Test cytotoxicity s Neutrální červení	31
2.3.3	Ostatní testy	31
2.4	<i>Lymfoblastická leukémie a buněčná linie MOLT-4</i>	<i>32</i>
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1	<i>Použité vybavení</i>	<i>33</i>
3.2	<i>Chemikálie a roztoky</i>	<i>34</i>
3.2.1	Iskova modifikace Dulbeccova média (IMDM)	34

3.2.2	Kultivační médium	34
3.2.3	Trypanová modř.....	35
3.2.4	Sterilní fosfátový pufr PBS.....	35
3.2.5	WST- 1 činidlo.....	35
3.2.6	WST – 1 roztok.....	35
3.3	<i>Pasážování a kultivace buněčné linie MOLT-4.....</i>	35
3.4	<i>Příprava buněčné suspenze</i>	36
3.5	<i>Příprava koncentrační řady.....</i>	36
3.6	<i>Příprava mikrotitrační destičky.....</i>	37
3.7	<i>Inkubace.....</i>	39
3.8	<i>Detekce</i>	39
3.9	<i>Vyhodnocení WST - 1 testu.....</i>	39
4	Výsledky a diskuze.....	40
5	Závěr	43
	<i>Příloha 1:.....</i>	<i>47</i>
	<i>Příloha 2:.....</i>	<i>52</i>

Seznam použitých zkratek

5-FU	5 – fluoracil
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovinní sérový albumin
CD	cluster od differentiation
<i>cis</i> -DDP	diaminodichloroplatnatý komplex
CoA	koenzym A
Cp	cyklopentadien (η^5 -C ₅ H ₅)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	elektrony vázající činidlo
ER α	na estrogeneru závislý α receptor
FICT	fluoresceinisothiokyanát
hGR	lidská glutationreduktáza
HIV	Human Immunodeficiency Virus = virus lidské imunodeficiency
hTRxR	lidská thioredoxinreduktáza
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
IMDM	Iscova modifikace Dulbeccova média
KP1019	imidazolium <i>trans</i> -[tetrachlorobis(1 <i>H</i> -indazol)-ruthenitý] komplex
LLC-PK	renální buněčná rakovinná linie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidová sůl
NAD ⁺	nikotinamiddenindinukleotid
NADH	redukována forma nikotinamidenindinukleotidu
NAMI-A	imidazolium <i>trans</i> -[tetrachloro-(<i>S</i> -dimethyl sulfoxid)(1 <i>H</i> -imidazole) ruthenitý] komplex
ORL	otorhinolaryngologie
OTf	trifluoromethansulfonát
PI	propidiumjodid
RNA	ribonukleová kyselina
RS	mitochondriální sukcinát – tetrazolium reduktázový systém
SRB	sulphur rhodamine buffer
TDC	titanocendichlorid, Ti(η^5 -C ₅ H ₅) ₂ Cl ₂
VDC	vanadocendichlorid, V(η^5 -C ₅ H ₅) ₂ Cl ₂
WST-1	(4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5]-tetrazoliová sodná sůl
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

1 Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Již řadu let se drží na druhé příčce nejčastějších příčin předčasného úmrtí.¹ V roce 2000 bylo v EU zaznamenáno 1 122 000 úmrtí na rakovinu. S předpokladem konstantního počtu obyvatel se odhaduje v roce 2015 zvýšení mortality na 1 405 000.²

Tato onemocnění se vyznačují infiltračním a destruktivním růstem včetně tvorby metastáz. Léčiva proti zhoubnému bujení potlačují rozvoj a množení rychle rostoucích buněk. V současné době lze ovlivnit řadu maligních procesů. Cílem je kombinovanou léčbou navodit přechodnou nebo trvalou remisi onemocnění (zástava růstu nádoru),³ nebo ještě lépe eradikovat (zlikvidovat) zhoubné buňky a zabránit relapsu (znovuobnovení nádorového růstu).⁴

Pokroky v molekulární biologii a genetice vedly k hlubšímu poznání mechanismů kancerogeneze a patofyziologie nádorového onemocnění. Byla syntetizována a izolována řada sloučenin, které cíleně blokovaly nitrobuněčné pochody u nádorových buněk. Postupem času se zdokonalovalo poznání podstaty a funkce vztahů, došlo ke zdokonalení chemické syntézy a technologie s možností počítačového modelování, což mělo kladný vliv na racionální syntézu nových látek.¹

V 60. a 70. letech minulého století se každým rokem objevovalo až 40 000 nových látek s protinádorovým účinkem, ale jen malá část se dočkala preklinického testování a pouze nepatrná část testování klinického. Pravděpodobnost, že lék projde klinickým testováním, je asi 0,001–0,005%, přičemž vývoj jednoho léku trvá až 10 let.⁵

V obsahu mé bakalářské práce byla provedena studie na předpokládané cytotoxické vlastnosti nových organokovových sloučenin přechodných kovů. Testování bylo provedeno na buněčné linii MOLT-4 odvozené od lymfocytární T-buněčné leukémie pomocí WST-1 testu.

2 Teoretická část

2.1 Biologie nádorového růstu

Nádory (novotvary) vznikají jako důsledek nadměrného a neregulovatelného bujení tkáně, při němž selhal imunitní systém jako „dozor“, který za normálních podmínek dohlíží na buněčné dělení, růst, diferenciaci a jejich programovanou smrt.⁶

Růst nádorové buňky se vymkl normálním zákonitostem. Je navozen působením onkogenů, jejichž produkty mohou sloužit jako receptory pro růstové faktory, které jsou umístěny v membránách plazmatických buněk. Tímto principem dojde ke zvýšení buněčné proliferace. U nádorových buněk je porušena rovnováha mezi přírůstkem a zánikem nových buněk ve prospěch přírůstku, což vede k postupnému narůstání jejich počtu. Růst je exponenciální, největší rychlosti dosahuje na začátku nádorového bujení. Příčinou následného zpomalení je jednak nedostatečná nutrice a jednak vznik faktorů zodpovědných za nekrózu/apoptózu. Klinicky zjistitelné nádory se většinou nacházejí mimo období exponenciálního množení. Při hmotnosti nádoru 1 mg je přítomno asi 10^6 nádorových buněk. Již je možný vznik prvních metastáz. Při stonásobném zmnožení buněk je možno detekovat nádor pomocí radiodiagnostiky. Klinická diagnóza bývá možná až u nádorů těžších než 1 g (10^9 buněk). Při zmnožení nádorových buněk nad 10^{12} dochází k úmrtí pacienta.

Průběh růstu je zaznamenán na *schématu 1*. Opakují-li se léčebné kúry s dostatečnou frekvencí, lze dosáhnout snížení počtu maligních buněk nebo dokonce uzdravení. Ze schématu je vidět, že včasná diagnóza a kombinovaná léčba zvyšují šanci na přežití pacienta.⁴

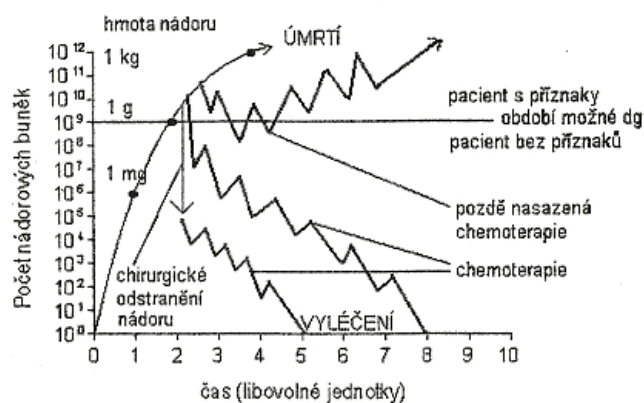


Schéma 1 Růst nádoru a jeho vliv na režim léčby.⁴

Nádory rozdělujeme na maligní (zhoubné, neoplastické, rakovina) a benigní (nezhoubné). Nezhoubné nádory jsou ohraničené, rostou pomalu a netvoří sekundární nádory = metastázy.⁶

Pro maligní nádory je charakteristické:

- **Invazivní růst = pronikání buněk do dalších tkání**, popř. orgánů.⁷ Tento stav je zpravidla vyvolán chybějícími faktory, které regulují buněčnou adhezi a motilitu, což dovoluje migraci nádorových buněk extracelulárním prostorem a jejich usazení v jiných tkáních.⁴
- **Hyperplázie = nekontrolovaná proliferace**. Příčina je ve zvýšené funkci růstových faktorů a/nebo selhání zpětnovazebných kontrolních mechanismů.⁷ Podáním cytostatik usilujeme o usmrcení rychle rostoucích buněk.⁴
- **Aplázie = ztráta původní funkčnosti** buňky.⁷ Je dána ztrátou funkčnosti diferenciací, buňky se více podobají primitivním nebo embryonálním buňkám, u nichž je zpomalena nebo zcela chybí diferenciací funkce. Snahou chemoterapie je dosažení diferenciací a tím ukončení nekonečného množení buněk.⁴
- **Tvorba metastáz = dceřiná ložiska zhoubných nádorů**, která jsou tvořena buňkami uvolněnými z primárního nádoru.⁷

Kořeny snahy eliminovat růst a proliferaci zhoubných onemocnění pomocí chemických sloučenin sahají na počátek 19. stol., kdy se Lissauer (1865) pokusil léčit leukémií arsenem (tzv. Fowlerův roztok, 1% roztok KH_2AsO_4).¹ Cílem protinádorové terapie je vyvolat cytotoxické účinky, které účinně zasáhnou do buněčného cyklu maligní buňky, inhibovat buněčnou proliferaci a stimulovat apoptózu a zároveň co nejméně poškodit zdravou tkáň.³

2.2 Antitumorově aktivní organokovové sloučeniny

Využití organokovů je nejen v léčbě rakoviny, svou roli hrají v terapii HIV, malárie, objevují se také v klinických aplikacích jako radioterapeutika a antibiotika.⁸ Molekuly s přímou vazbou kov – uhlík se vyskytují i jako přírodní látky. Příkladem je methyl kobalamin (Co-CH_3) působící jako methylující činidlo v biochemických reakcích, jako například syntéza methioninu z homocysteinu.⁹ Dalšími nepostradatelnými organokovy v organismu jsou vitamín B_{12} a koenzym B_{12} , které se účastní krvetvorby.⁸

Dále sem může být řazen enzym acetyl-CoA syntetáza katalyzující reverzní redukci CO₂ na CO.⁹

Organokovové sloučeniny obsahující ve svém centru různý přechodný kov byly zkoumány pro svoji potenciální biologickou aktivitu. V *tabulce 1* jsou výrazně označeny kovy, u kterých byla v jejich sloučeninách potvrzena cytotoxická aktivita.¹⁰

Tabulka 1 Umístění přechodných kovů v periodickém systému s vyznačením prvků s nalezenou cytotoxickou aktivitou.¹⁰

III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd
La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg

2.2.1 Platinové komplexy I. generace

➤ **Cis – diaminodichloroplatnatý komplex**

Mezi nejznámější a nejrozšířenější chemoterapeutika s centrálním atomem kovu je *cis* - diaminodichloroplatnatý komplex (*cis*-DDP).¹ Jedná se o čtvercově planární koordinační anorganickou sloučeninu dvojmocné platiny, kde na centrální atom platiny jsou navázány dva atomy chlóru a dvě amino skupiny v *cis* geometrii.¹¹ Poprvé se s ní setkáme pod názvem Peyronův chlorid, kdy byla v roce 1844 syntetizována Michaelem Peyronem. Antitumorový účinek objevil v roce 1965 Barnett Rosenberg na Michiganské státní univerzitě při pokusech sledujících vliv elektrického pole na růst bakterií. V experimentu byly použity platinové elektrody v roztoku chloridu amonného. Při elektrolýze se vytvořil amoniumhexachloroplatnatý komplex, který byl vlivem expozice komplexu na sluneční záření přeměněn na *cis*-diammintetrachloroplatičitý komplex. Ten způsobil zástavu buněčného cyklu na mikrobiální kultuře *Escherichiae coli*.¹² Postupnými experimenty byla objevena nejúčinnější forma komplexu *cis* – diaminodichloroplatnatý komplex, dnešní *cis*-DDP.¹

Biologický účinek spočívá ve výměně slabě navázaných chloridů jinými substituenty. Do těla je podávána intravenózně. V extracelulární tekutině (v krevním oběhu) je vysoká koncentrace Cl⁻ (97 - 108 mM¹³), substituce atomů chlóru je tímto inhibována. Po vstupu

do cytoplazmy buňky prostou difúzí, kde je nízká koncentrace chloridů (3 - 10 mM¹³), dochází k výměně atomu chloridů za H₂O nebo -OH. Jen takto hydratované, kladně nabitě částice se můžou navázat na nukleofilní centrum DNA, RNA nebo proteinu a působit jako alkylační látky.^{14, 15} Dochází k vytvoření monofunkčního aduktu, který se může uzavřít v bifunkční. Všechny adukty tvořené platinovým komplexem na DNA ovlivňují sekundární strukturu DNA tím, že dojde k navázání k dusíku N7 guaninu nebo adeninu a tím k vytvoření příčných vazeb mezi guaninem a adeninem/guaninem – guaninem (Schéma 2).¹

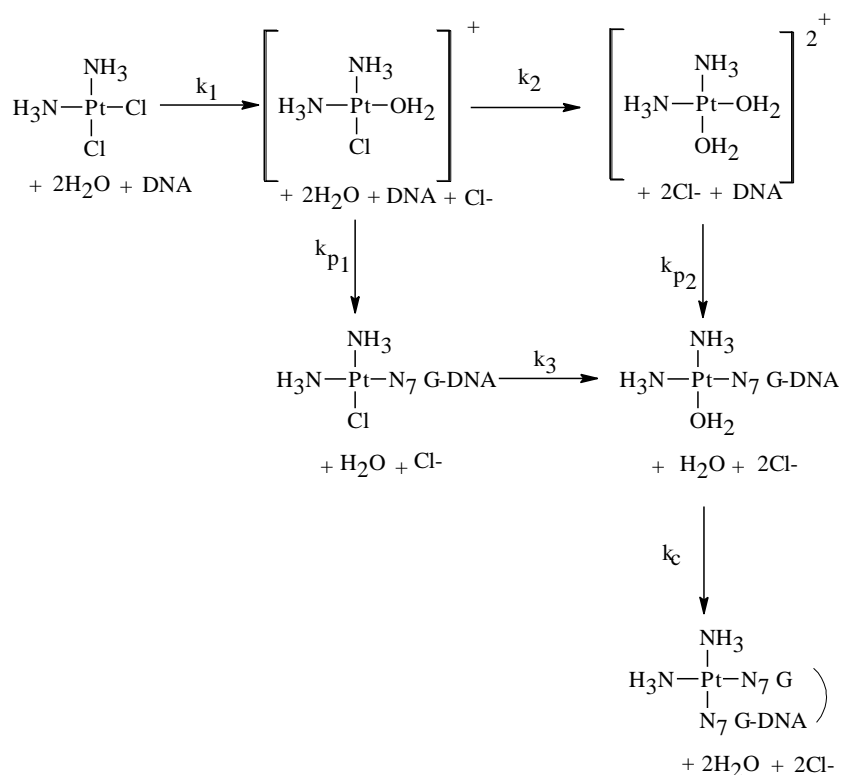


Schéma 2 Mechanismus tvorby aduktu cis-DDP na DNA.¹⁵

Kde: k_1, k_2, k_3 jsou rychlostní konstanty hydratace. k_{p1} a k_{p2} jsou rychlostní konstanty tvorby komplexu s DNA, k_c je rychlostní konstanta tvorby chlátku.¹⁵

V roce 1978 byla cis-DDP zavedena do klinické praxe pod názvem Platinol.¹⁶ V dnešní době je lékem první volby u onemocnění testikulárním a ovariálním a nádorem. Dále je podávána při léčbě malobuněčného a nemalobuněčného bronchogenního karcinomu, karcinomů cervixu, endometria, prostaty, močového měchýře, melanomů, sarkomů, nádorů ORL, karcinomů mozaikového epitelu a maligních lymfomů.¹⁷

Její první testování nebylo úspěšné, vykazovala vysokou až fatální nefrotoxicitu. Díky hyperhydrataci pacienta před jejím podáním a následnou forsírovanou diurézou se podařilo toxicitu *cis*-platiny omezit a tím výrazně obohatit arzenál cytostatik.¹

2.2.2 Platinové komplexy II. generace

Roku 1993 bylo klinicky testováno 23 sloučenin, nejznámější sloučeniny jsou uvedeny na *schématu 3*.¹⁸

➤ **Karboplatina**

Záměnou chloridových iontů *cis*-DDP za více stabilní cyklobutandikarboxylovou skupinu byl v roce 1986 do klinické praxe zaveden *cis*-diammin-1,1-cyklobutandikarboxyl platnatý komplex = karboplatina.¹⁹ Odstupující skupinou je zde karboxylový ligand, který je ve vodném prostředí disociován pomaleji než chloridový v *cis*-DDP. Mechanismus cytotoxického účinku je jako u *cis*-DDP, tvorba kovalentních vazeb platiny mezi bázemi DNA, kdy následným efektem je apoptóza buňky.²⁰

Hlavní indikační oblasti karboplatiny jsou ekvivalentní s *cis*-DDP, tedy nádory ovárií, dále pak nádory varlat, močového měchýře, malobuněčný karcinom plic a nádory hlavy a krku.²¹ Zásadní problém *cis*-DDP však karboplatina nevyřešila. Její nižší toxicita je dána pomalejší hydrolýzou v krevním řečišti.²²

➤ **Oxaliplatina**

Dalším analogem je oxaliplatina. Vznikla ve Francii nahrazením chlorových ligandů molekulami oxalátu.²³ Mechanismus spočívá v interakci hydratovaného metabolitu s DNA. Existuje korelace mezi hydrofobními vlastnostmi oxaliplatiny a jejím vstupem do buňky. Biotransformace je urychlena přítomností iontů HCO_3^- a H_2PO_4^- za vzniku monochloro-, dichloro- a hydratované formy s nukleofilními vlastnostmi, které mohou dále reagovat s DNA, proteiny a dalšími makromolekulami.^{24, 25}

Oproti *cis*-DDP vykazuje vyšší lipofilitu a lepší rozpustnost ve vodě. Užívá se k léčbě metastazujícího kolorektálního karcinomu III. stádia a k adjuvantní léčbě po resekci primárního tumoru. Používá se samostatně nebo v kombinaci s 5-fluorouracilem (5-FU), s kyselinou listovou nebo bez ní. Oxaliplatina a 5-FU mají synergický účinek a jejich současné užití při léčbě kolorektálního karcinomu významně zvýšilo léčebnou účinnost

a prodloužilo dobu přežívání pacientů. Z nežádoucích účinků se objevuje neutropenie, trombocytopenie, průjem, nevolnost, zvracení.²⁶

2.2.3 Platinové komplexy III. generace

Derivátem oxaliplatinu je lobaplatina (Schéma 3). V porovnání s ostatními komplexy má nižší toxicitu a vyšší účinnost. V Japonsku je registrovaná k léčbě nádorů hlavy a krku, ovarii a děložního čípku nedaplatina (Schéma 3). Dále se testovaly sloučeniny s neštěpitelným ligandem pyridinem, imidinem nebo tiazolem (Schéma 3), které zvýšily lipofilicitu a elektrofilitu, avšak do klinické praxe nebyly zavedeny.²⁷ V poslední době byla do klinické praxe zavedena cytostatika na bázi komplexů Pt⁴⁺, např. ormaplatina a pravotočivá forma dexormaplatina.⁶ Nejlépe v preklinických testech dopadla iproplatina (Schéma 3), která se ovšem dále projevila vysokou gastrotoxicitou. Nejznámějším čtyřmocným komplexem platiny, který je v klinických testech, je satraplatina. Jedná se o látku s orální aplikací vykazující podobnou toxicitu jako *cis*-DDP. Velmi slibný lék byl syntetizován v ČR firmou Lachema, derivát pod kódem LA-12. Tato sloučenina obsahuje adamantylamin, který umožňuje vyšší stabilitu v roztocích, perorální podání a nižší nežádoucí účinky.²⁷

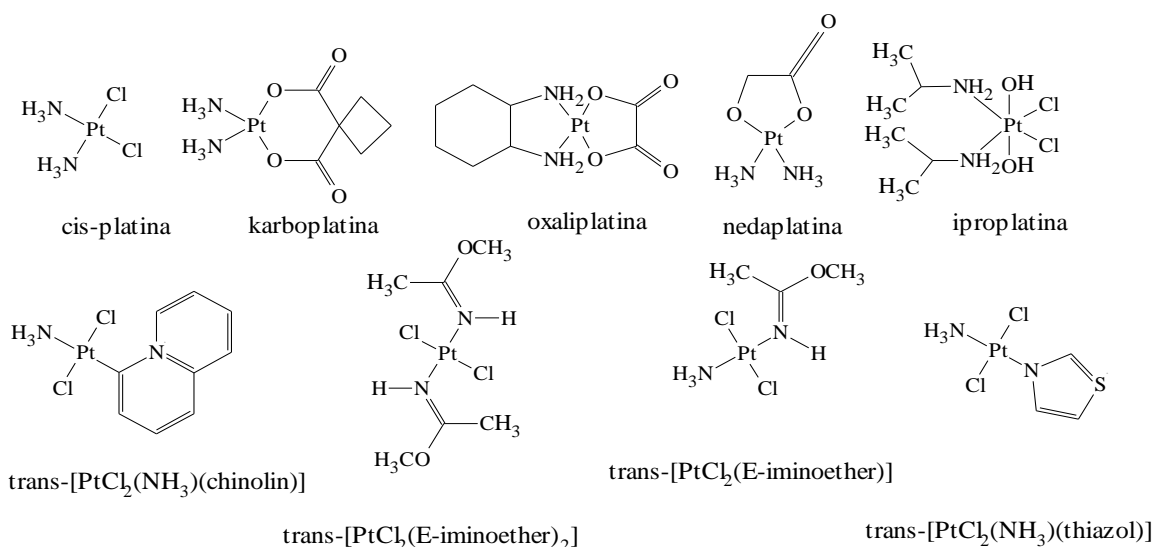


Schéma 3 Deriváty platiny.

2.2.4 Komplexy titanu

Jako první neplatinový komplex s Ti^{IV} byl pro klinické zkoušky schválen budotitan (*Schéma 4*), ale z důvodu špatné rozpustnosti a hydrolyzy bylo testování opuštěno.⁹

Největší cytostatický účinek vykazoval titanocendichlorid ($\text{Ti}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Cl}_2$; TDC). Jedná se o *cis*-chloridový motiv (*Schéma 4*) podobný *cis*-DDP, ale s vyšší afinitou k fosfátové vazbě DNA. Do klinických testů vstoupil roku 1993, testování probíhalo na renální buněčné rakovinné linii (LLC-PK), přičemž nefrotoxicita byla omezena dávkou podaného léku. Studie ukazuje ztrátu Cp kruhů ve fyziologických podmínkách a dále, že Ti^{IV} vystupuje v terapeutickém účinku jako solvát k Fe v transferinu, což usnadňuje vstup do buňky.⁸

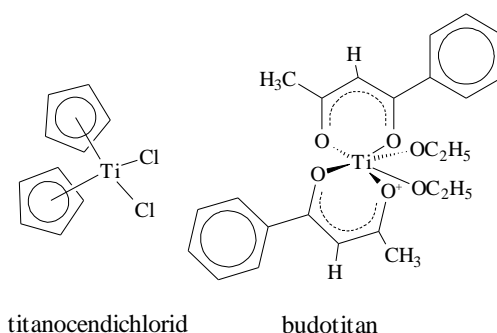


Schéma 4 Struktura titanocendichloridu a budotitanu.^{8, 9}

Benzyl substituované deriváty (*Schéma 5*) vykazují v testech na LLC-PK vyšší hodnoty IC_{50} . Na více buněčných liniích bylo provedeno testování methoxyfenyl titanocenového derivátu. Dále byl připraven výměnou chloridových ligandů za chelátující oxalátový ligand oxalátový *ansa* - titanocenový derivát (dva Cp kruhy jsou kovalentně spojeny *ansa* - můstkem) (*Schéma 5*). Chelátující ligand je více stabilní vůči hydrolyze dichloridů v prekurzoru bez výrazně snižující se rozpustnosti ve vodě.⁸

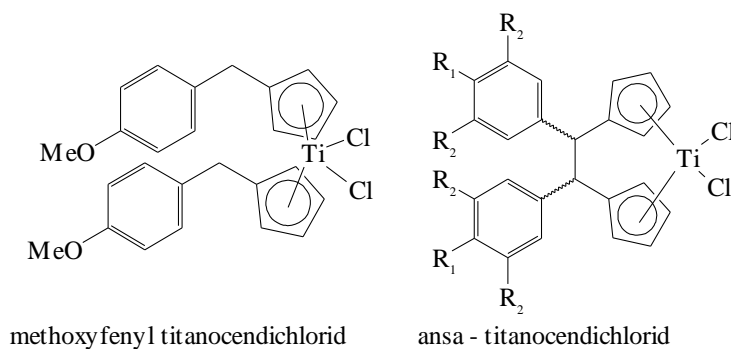


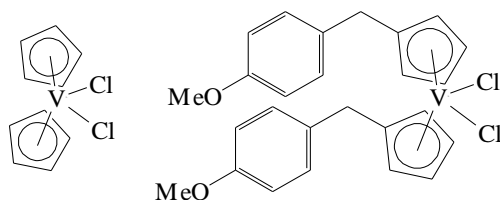
Schéma 5 Struktura titanocenových derivátů.⁸

2.2.5 Komplexy vanadu

Důvodem, proč začaly být intenzivně zkoumány anti – tumorové účinky komplexů vanadu, byl objev tohoto účinku u stěžejní sloučeniny vanadocendichloridu (Cp_2VCl_2 ; VDC) (Schéma 6) manžely Köpfovými.²⁸ Ve srovnání s Cp_2TiCl_2 vykazuje Cp_2VCl_2 vyšší cytotoxickou aktivitu in vitro, již srovnatelnou s hodnotou *cis*-DDP.²⁹ Bylo zjištěno, že vanad v oxidačním stavu +IV funguje jako modulátor buněčného redox potenciálu a regulátor enzymatické fosforylace. Biomedicíální aplikace je limitována velmi variabilní disociací, rozpustností a následnou hydrolýzou ve vodných roztocích.²⁸ Nízká afinita VDC k fragmentům DNA vedla k vývoji proteinových nosičů, což má za následek vychytávání vanadu apotransferinem a tím usnadněnému vstupu komplexu do buňky.³⁰

Mechanismus účinku všech vanadocenových komplexů není jednoznačně dán, předpokládá se však inhibice proteinkinázy a topoisomerázy II.^{28, 30} Cytotoxický účinek byl největší v nádorových buňkách varlat Tera – 2 a NTera – 2. Výhodou léčby vanadocendichloridu oproti *cis*-DDP je menší poškození epitelu varlat, které dříve často vedlo k neplodnosti mužů.³¹

Podobně jako u sloučenin titanu se cytotoxické účinky vanadu ukázaly s benzyl-substituovanými deriváty na buněčné linii LLC PK. V sérii testovaných látek se nejvíce účinnou látkou stal methoxyfenyl vanadocendichlorid (Schéma 6).²⁹



vanadocendichlorid methoxyfenyl vanadocendichlorid

Schéma 6 Struktura vanadocenových derivátů.^{28, 29}

2.2.6 Molybden

První pozorování cytotoxické aktivity molybdenu byly pozorovány u sloučeniny molybdenanu sodného Na_2MoO_4 , jež se ukázal účinný proti rakovině žaludku a jícnu.³² Po vzoru *cis*-DDP byla zkoumána biologická aktivita u cyklopentadienylových komplexů molybdenu. Tyto sloučeniny jsou charakteristické svou strukturou (Schéma 7), na které ring kruh znázorňuje cyklopentadienyl nebo indenyl, Y^n může být alkyl, alken, aryl,

halogen, C(O)R, CHRCO₂R', CHROH, CHRCO₂R, kyano nebo nitro skupina. L a L' reprezentují dva vázané ligandy koordinované přes donorové atomy C, N, O, P, S nebo halogenu. Z⁺ značí celkový náboj Mo^{II} komplexu. A⁻ je vhodný a farmaceuticky akceptovatelný kompenzující aniont. Experimentálními testováními na buněčných liniích střevního a prsního karcinomu bylo zjištěno, že tyto deriváty vykazují silnější cytotoxickou aktivitu než samotný Cp₂MoCl₂.³³

V případě thiolových sloučenin molybdenu, konkrétně tetrathiomolybdenanu, byl pozorován výrazný antiangiogenní účinek. Princip spočívá ve schopnosti chelátovat měď, která je esenciálním faktorem v tvorbě nových cév tumoru. Tímto principem dochází ke snížení hladiny mědi a zastavení angiogeneze bez velkých vedlejších účinků.³⁴

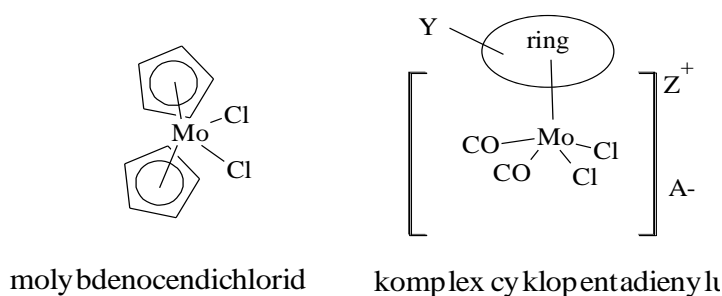


Schéma 7 Struktura komplexů molybdenu.³³

2.2.7 Ostatní prvky IV., V., VI. skupiny

Po objevu protinádorového účinku titanocendichloridu byly zahájeny biologické experimenty s komplexy dalších přechodných kovů. Krom testování již zmíněných sloučenin vanadu a molybdenu se do popředí zájmu dostaly také cyklopentadienylové komplexy s centrálním atomem zirkonu, hafnia, niobu (Schéma 8) a wolframu (Schéma 8). Testování probíhalo in vivo na Ehrlichově ascitovaném nádoru myši. K uzdravení myši došlo v případě léčby niobocendichloridem a wolframocendichloridem. Jako neúčinné se k tomuto nádoru ukázaly být metalloceny s atomem zirkonu a hafnia.³⁵

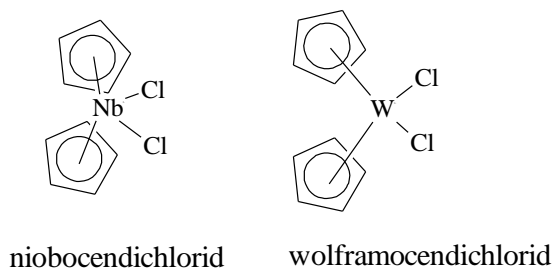


Schéma 8 Struktura niobocendichloridu a wolframocendichloridu.³⁵

2.2.8 Technecium

Využití tohoto kovu v medicíně je k léčbě myokardiální perfúze v podobě [Tc(methoxy-2-methylpropylisokyanid) (Schéma 9). Komplexy obsahující [Tc^I(CO)₃]⁺ jsou po vzoru Ru^I v současné době zkoumány v oblasti radioimunoterapie.⁹

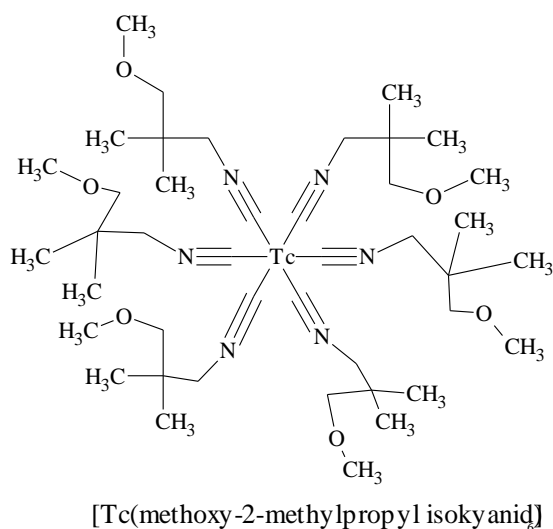


Schéma 9 Struktura derivátu technecia.⁹

2.2.9 Železo

Za objasnění struktury ferrocenu (Schéma 10) byla udělena Wilkinsonovi a Fisherovi na počátku roku 1950 Nobelova cena. Samotný ferrocen není toxický, jedovatými se stávají až jeho deriváty. Mechanismus působení spočívá v reakci s kyslíkatými látkami, např. hydroxylovými radikály, které jsou schopné poškodit DNA. Nejzajímavějšími látkami jsou ferrocifeny (Schéma 10). Jedná se o modifikace tamoxifenu (lék proti rakovině prsu závislý na přítomnosti α receptoru estrogen závislých buněk), kdy jeho β -fenylový kruh byl substituován ferrocenem. Estrogeny jsou zodpovědné za růst nádoru způsobenou interakcí s ER α . Při léčbě rakoviny prsu se používají inhibitory estrogenů = antiestrogeny v kombinaci s dalšími léčivy, např. hydroxytamoxifen. Ferrocifen ukazuje slibnou antiproliferační aktivitu ve tkáních nezávislých na hormonech, kde je hydroxytamocifen neaktivní.⁸

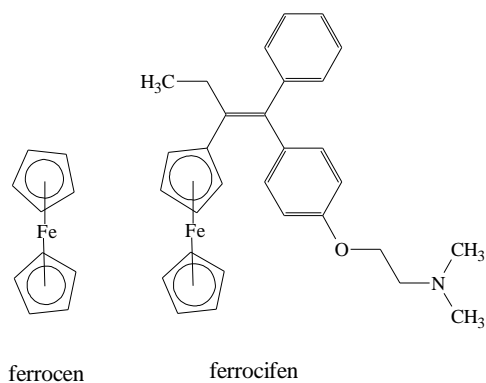


Schéma 10 Struktura ferrocenu a jeho cytotoxicky aktivního derivátu.³⁶

Dále byla připravena řada ferrocifenových analogů s hydroxybenzenovou skupinou (v mnohých sloučeninách je tato skupina chráněna jako ethylether).⁸ Jsou však velmi nestabilní a rozkládají se ve vodném roztoku.¹² Cytotoxická aktivita je přisuzována redoxním vlastnostem Fe^{II} komplexu (v přítomnosti pyridinu⁸), vedeného k oxidativnímu poškození DNA. Obdobným účinkem disponuje i ruthenium s rozdílem, že oxidace železnatého centra ($\text{Fe}^{\text{II}} \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) je od ruthenia ($\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{Ru}^{\text{III}}$) reversibilní.³⁶

2.2.10 Ruthenium

Byla provedená první úspěšná fáze klinických zkoušek dvou koordinačních komplexů a to imidazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazol)-ruthenititého] komplexu, KP1019 (Schéma 11) a imidazolium *trans*-[tetrachloro-(*S*-dimethyl sulfoxid)(1*H*-imidazole)ruthenititého] komplexu, NAMI-A (Schéma 11).⁸ Rozdílem těchto dvou sloučenin je chování k buňkám. KP1019 je cytotoxický k rakovinným buňkám, NAMI-A je relativně netoxická a má antimetastatickou aktivitu (předchází rozšíření rakoviny).⁹

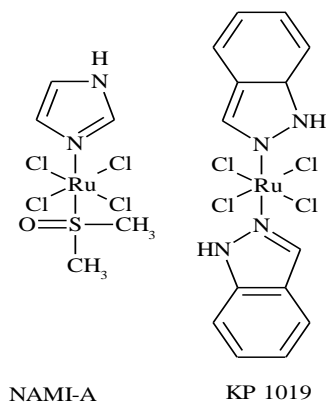


Schéma 11 Struktura sloučenin ruthenia.⁸

Nově jsou zkoumány Ru^{II} arenové polosendvičové komplexy, které jsou ve vodě rozpustné, stabilní a se slibnou cytotoxickou aktivitou *in vitro* i *in vivo*. Typická struktura těchto sloučenin je „pianová stolička“, komplex je ukázán na *schématu 12*. Cytotoxicita komplexu $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{en})(\text{Cl})]^+$ byla zkoumána na ovariálních rakovinných buňkách. Bylo zjištěno, že se aktivita zvyšuje s velikostí koordinovaného arenu: benzen, p-cymen, bifenyl, dihydroantracen, tetrahydroantracen. Bipyridinový komplex má podobnou cytotoxicitu jako karboplatina a tetrahydroantracénový komplex je tak aktivní jako *cis*-DDP. Substituce chloridů za jiné halogenidy má pouze nepatrný vliv na cytotoxicitu. Tyto sloučeniny se vážou koordinačně k N7 guaninu v DNA a tím ji poškozují.⁹

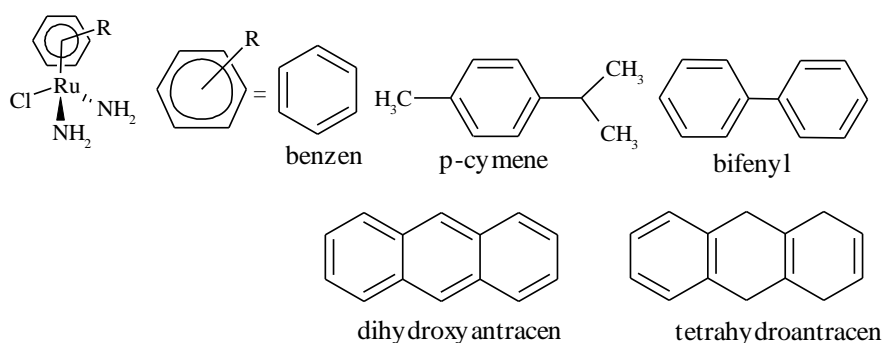


Schéma 12 *Struktura ruthenia jako pianové stoličky.*⁹

2.2.11 Osmium

Protirakovinný potenciál osmia (Os^{II}) byl donedávna díky toxicitě OsO_4 málo prozkoumaný, avšak byly syntetizovány Os^{II} arenové komplexy (*Schéma 13*) s buněčnou cytotoxicitou, která je porovnatelná s karboplatinou. Interakce Os^{II} arenů s DNA je obdobná s ruthenovými analogy, tj. vazba k N7 guaninu v kombinaci s vytvořením vodíkové vazby a nekovalentní aren-DNA interakcí.³⁶

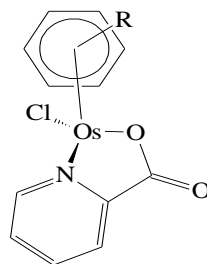


Schéma 13 Sloučenina Os^{II} arenu s protinádorovou aktivitou.³⁶

2.2.12 Kobalt

Hexakarbonyldikobaltové komplexy jsou sloučeniny obsahující v jednom nebo více ligandech oxid uhelnatý. Alkynhexakarbonyldikobalt byl připraven již v roce 1987, ale podrobného studování se dočkal až o 20 let později. Toxicita spočívá ve schopnosti inhibovat cyklooxygenázu I a II, čímž zpomalí růst nádoru, což vede k lepší odezvě na konvenční terapii proti buňkám rakoviny prsu.³⁶

2.2.13 Rhodium

Výzkumem bylo objeveno několik Rh a Ru komplexů, které vykazují v přítomnosti kyslíku protirakovinnou aktivitu. Například Barton a kol. prokázali, že některé oktaedrální Rh^{III} komplexy s prodlouženými diiminovými ligandy se v nepřítomnosti světla vážou pouze slabě k DNA. Po fotoaktivaci dojde k navázání na DNA a následnému rozštěpení. Tyto účinky in vitro však nejsou shodné s aktivitou in vivo.³⁶

2.2.14 Iridium

Ir^{III} a jeho protinádorová aktivita nejsou podrobně zkoumány ve srovnání s ostatními prvky, nicméně se ukázala aktivita Ir^{III} (Schéma 14) s ligandem hexamethylbenzenem nebo pentamethylcyklopentadienylem. Předpokládá se vazba na DNA a následná interkalace.¹²

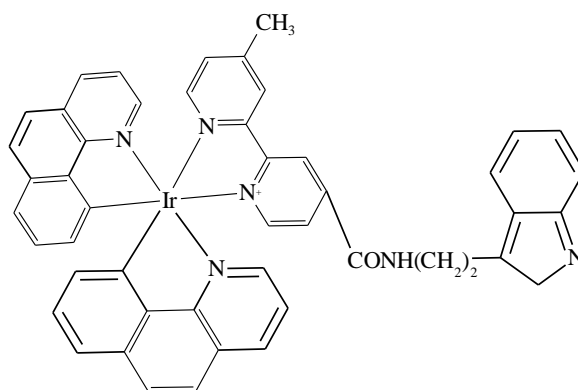


Schéma 14 Cytotoxicky aktivní sloučenina Ir^{III}.¹²

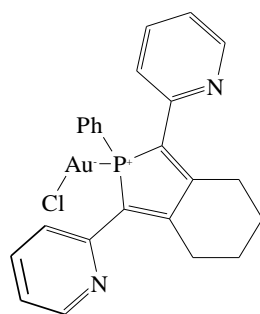
2.2.15 Stříbro

Stříbrné komplexy byly užívané jako antimikrobiální látky, později jako antiseptika. Mechanismus působení zahrnuje uvolnění Ag^I, který vstupuje do buněčné membrány a ruší její funkci. Inhibice růstu buněk byla testována na bakteriích *Escherichiae coli*, *Stafylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*.⁸

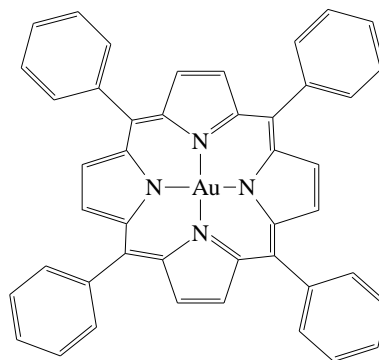
2.2.16 Zlato

Zlaté komplexy jsou známá farmaceutika používaná k léčbě revmatických zánětů. Tetraedrální Au^I fosfiny (Schéma 15) vykazují spektrum protinádorové aktivity i proti *cis*-DDP rezistentním buněčných liniím. Mechanismus cytotoxicity je dán schopností inhibovat nevratně lidský glutationreduktázu a lidskou thioredoxinreduktázu (hTRxR), jejichž fyziologické funkce jsou antioxidační ochrana a zajištění redoxní homeostázy.³⁶ Fosfor - Au^I jsou inhibitory hTRxR, testování bylo provedeno na glioblastomických buňkách s velmi nízkou IC₅₀, srovnatelnou s *cis*-DDP.³⁷

Au^{III} sloučeniny jsou isoelektronové a isostrukturální s platnatými komplexy.³⁶ Avšak zlatité komplexy jsou nestabilní, citlivé na světlo a díky vysokému redox potenciálu jednoduše redukovatelné na kovové zlato i ve fyziologických podmínkách.⁸ V posledních letech se nicméně objevují zlatité komplexy s porfyriny (Schéma 15) či bipyridinové sloučeniny, jejichž hlavním biologickým cílem jsou mitochondrie v hepatocelulárním (díky propojení p53 a mitochondriální apoptózy³⁷) a nasofaryngeálním karcinomu.³⁶



Au(I) - fosforilový komplex



Au(III) - porfyrinový komplex

Schéma 15 Struktura Au komplexů s cytotoxickou aktivitou.¹⁴

2.3 Testování cytotoxicity, stanovení cytotoxicity in vitro

Aby lék mohl být zaveden do klinické praxe, musí projít úspěšně preklinickým testováním, následně třemi fázemi testů klinických a v poslední řadě registrací.⁵ Testování probíhá buď v živém organismu (in vivo), anebo ve zkušence na linii buněk (in vitro). Buněčná linie použitá k hodnocení cytotoxické aktivity ve zkušence musí být kultivována v prostředí, které co nejpřesněji kopíruje prostředí v lidském organismu, tj. teplota 37°C, atmosféra obohacená o 5% CO₂, také kultivační médium je obohaceno o složky přítomné v extracelulární tekutině (anorganické soli, puify, glukóza, vitamíny, bílkoviny, MK, ...).³⁸

Při hodnocení se zpravidla sleduje koncentrační závislost toxicity na logaritmické řadě koncentrací. Výsledkem je určení koncentrace, kdy dochází k 50% inhibici dané biologické aktivity = IC₅₀.³⁹

2.3.1 Redukce tetrazoliových solí

Nejnámějším a nejrozšířenějším způsobem, jak hodnotit cytotoxickou aktivitu, je pomocí redukce tetrazoliových solí (*Schéma 16*). Tetrazoliový kruh byl objeven švédským chemikem Bladinem v roce 1885. O něco později, v roce 1892, Pechmann a nezávisle na něm Bamberger se zabývali působením oxidačních činidel na formazany a připravili z nich první tetrazoliové soli.

Tetrazoliové soli jsou kvartérní amoniové soli poměrně dobře rozpustné ve vodě. Jejich roztoky jsou bezbarvé nebo slabě nažloutlé. Jejich charakteristickou vlastností je redukce, po níž dávají intenzivně zbarvené ve vodě nerozpustné látky, označované jako

formazany. Stanovení se opírá o kolorimetrické měření životaschopnosti buněk. Ke konverzi barevné změny dochází působením mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk, zatímco u mrtvých či poškozených buněk nikoliv.⁴⁰

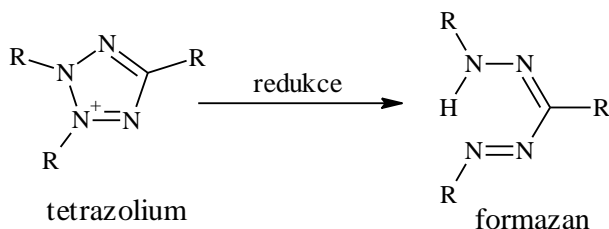


Schéma 16 Redukce tetrazoliové soli na formazan.⁴⁰

➤ WST – 1

Podstatou je bioredukce WST-1 tetrazoliové soli ((4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H 5])), zejména na povrchu buňky, kdy vzniká působením mitochondriální dehydrogenázy barvivo formazan (Schéma 17), které přímo koreluje s počtem životaschopných buněk. Buňky jsou inkubované s WST-1 činidlem 3 hodiny. Po této době lze formazan kvantifikovat spektrofotometrem v rozsahu vlnových délek 420 – 480 nm.⁴¹

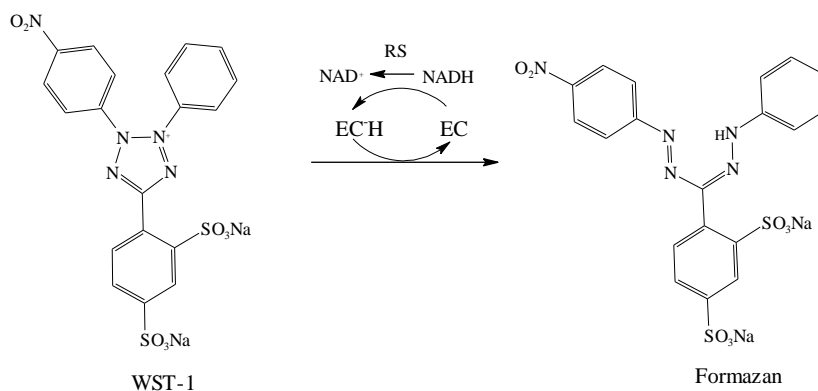


Schéma 17 Štěpení tetrazoliové soli WST – 1 na formazan, EC – elektrony vázající činidlo, RS – mitochondriální sukcinát – tetrazolium reduktazový systém.⁴¹

➤ MTT

Žlutá 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidová sůl (MTT) je redukována na modrofialový formazan (Schéma 18). Enzymatická reakce je zastavena

přidáním roztoku HCl/2-propanolu. Barevná změna je následně detekována spektrometricky. Absorpční maximum formazanu je při vlnové délce 570 nm.⁴²

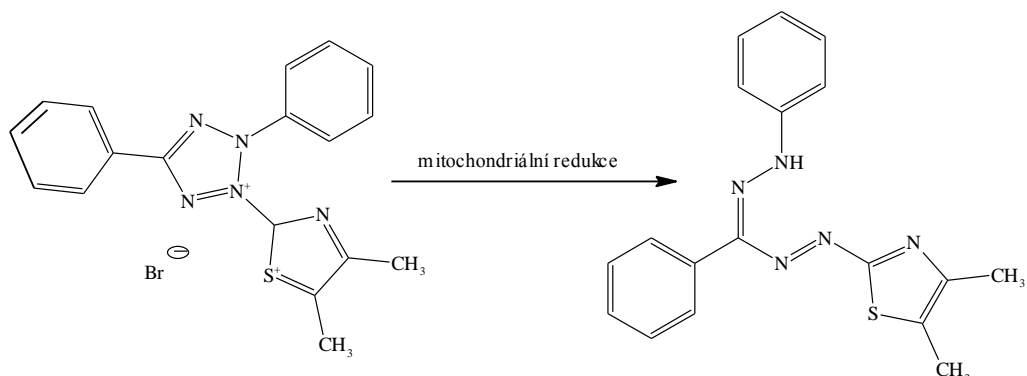


Schéma 18 Štěpení MTT soli.⁴²

➤ XTT test

Metoda je založena na schopnosti metabolicky aktivních buněk štěpit žlutou tetrazoliovou sůl XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) za vzniku oranžového formazanového barviva (Schéma 19).⁴³

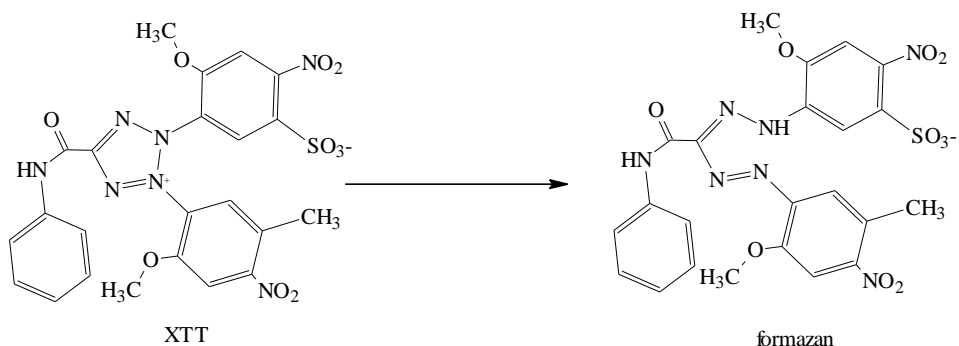


Schéma 19 Štěpení XTT soli.⁴³

➤ Trypan Blue Exclusion Test

Tento test životaschopnosti je založen na principu, kdy živá buňka s neporušenou buněčnou membránou má schopnost efluxu = aktivního odčerpání určité látky či barviva z intracelulárního prostoru např. propidiumjodid (PI), trypanová modř (Schéma 20) apod. Pod mikroskopem se pak hodnotí procenta zastoupení živých (neobarvených) buněk.³⁹

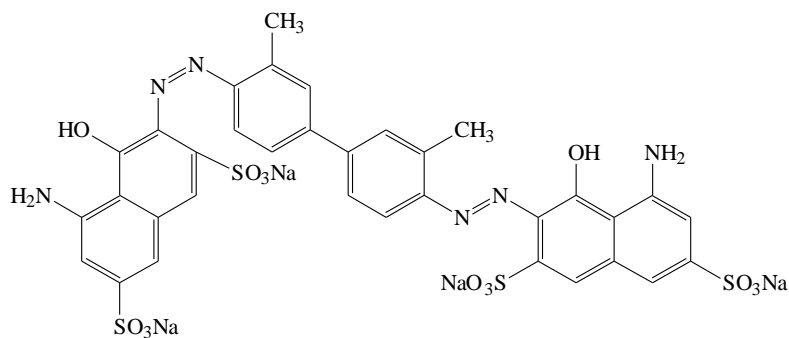


Schéma 20 Struktura trypanové modři.³⁹

2.3.2 Test cytotoxicity s Neutrální červení

Cytotoxicitní test s Neutrální červení je založen na schopnosti živých buněk vychytávat a vázat Neutrální červeně. Jedná se o kladně nabitě barvivo (Schéma 21), které snadno difunduje přes buněčnou membránu buněk, akumuluje se v buněčné cytoplazmě a je skladováno v kyselém prostředí lysozomů. Podstatou testu je fakt, že Neutrální červeně je schopna absorbovat a vázat pouze živé buňky, zatímco u poškozených či mrtvých buněk se tato schopnost snižuje. Množství akumulované Neutrální červeně je tak přímo úměrné množství živých buněk v buněčné kultuře.⁴⁴

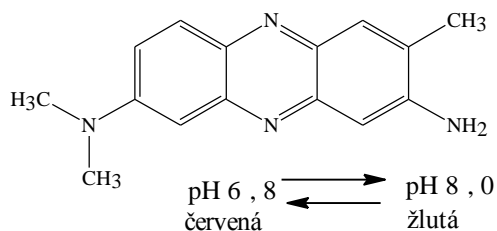


Schéma 21 Struktura Neutrální červeně.⁴⁴

2.3.3 Ostatní testy

Apoptest – měření programované buněčné smrti. Ke sledování průběhu apoptózy slouží lokalizace fosfatidylserinu na vnitřní straně buněčné membrány živých buněk a jeho detekce pomocí fluorescenčního signálu fluoresceinisothiokyanátu (FICT) nebo PI díky průtokové cytometrii.⁴⁵

TUNEL test – metoda využívající k detekci apoptických buněk fragmentací DNA. K roztoku je přidána terminální deoxynukleotidtransferáza a digoxigenin-11-d-UTP, který

se začleňuje na konce nukleotidů fragmentů DNA. Následně je pomocí průtokové cytometrie vyhodnocen fluorescenční signál značené protilátky FITC proti digoxigeninu.⁴⁶

SRB-test (sulphur rhodamine buffer) – buňky jsou po fixaci kyselinou trichloroctovou barveny 0,02% roztokem SRB. Barvivo se váže na nepoškozené buněčné elementy. Intenzita zbarvení stanovená fotometricky je úměrná množství živých buněk.⁴⁷

2.4 Lymfoblastická leukémie a buněčná linie MOLT-4

Hematologické malignity jsou klonální choroby vzniklé z hemopoetických buněk. Rozdělují se na myeloidní (vycházejí z myeloidních buněk) a lymfoidní (vycházející ze zárodečného progenitoru pro lymfocytární řadu nebo již z vyzrálých lymfatických buněk).⁴⁸

T-lymfocytární leukémie je nemoc diagnostikovaná nejen u dospělých, dokonce je nejčastěji léčeným nádorovým onemocněním u dětí.⁴⁹ Vychází z prekursoru buněk T-buněčné lymfoidní linie. V některých případech mohou lymfoblasty napodobovat zralé lymfocyty, které jsou dále rozlišitelné imunofenotypizační diagnostikou. Společným znakem je pozitivita CD (cluster of differentiation): CD1, CD2, CD3, CD4, CD4 a CD8.⁴⁸

Buněčná linie MOLT-4 je odvozena z akutní lymfoblastické leukémie buněčného typu T-lymfoblastu. Na svém povrchu obsahuje CD1 (49%), CD2 (35%), CD3 A (26%) B (33%) C (34%), CD4 (55%), CD5 (72%), CD6 (22%), CD7 (77%).

Jedná se o lidské buňky s hypertetraploidním počtem chromozomů, čtyři kopie na buňku.⁵⁰ Je přítomen „wild“ typ genu p53, jehož exprese je potlačena. Dojde-li ale k vyvolání genetického stresu (poškození DNA) nebo onkogenní signalizaci (aberantní mitogenní stimuly) působením např. cytostatik, dojde k indukci proteinu p53, jeho následné posttranslační modifikací, jako je fosforylace a acetylace. Takto stabilizovaná forma se naváže na DNA a změní expresi cílových genů. Výsledkem je zástava buněčného cyklu, spuštění opravných mechanismů DNA nebo vyslání apoptického signálu a indukce mitochondriální apoptózy. Tímto mechanismem dochází k eliminaci počínající nádorové buňky a ochraně organismu před rakovinou.¹

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vybavení

Tabulka 2 Použité přístroje a pomůcky.

Přístroje/pomůcky	Výrobce	Typ	Technický parametr
Laminární box	TRIGON PLUS	JOUAN MSC 12	Teplota: 5-40°C Max vlhkost pro teplotu 22°C: 80%
Spektrofotometr	TECAN	INFINITY 200	Režimy měření: Intenzitafluorescence, Fluorescenční rezonanční přenos energie, Fluorescenční polarizace, Flash luminiscence, Glow luminiscence, Absorbance
Inkubátor	TRIGON – PLUS	Thermo Forma Direct Heat	teplota: rozsah 5-50°C CO ₂ : rozsah 0-20% Rel.vlhkost: až do 95% při 37°C
Centrifuga	Hettich zentrifugen	ROTINA 420R	RPM: 15 000 RCF: 2440
Mikroskop	CARL ZEISS JENA	-	Celkové zvětšení při pozorování: 160x
Ultrazvuková lázeň	Sonorex super	RK31	Rozměr: 190x085x060
Třepačka	IKA	Vortex 3	Rozsah otáček: 0-2500 min Frekvence: 50/60 Hz
Lednička + mraznička	ZANUSSI	ZRT 623 W	Celkový objem 230 Mrazicí výkon 3 kg/24 h

Plynový kahan	TRIGON -PLUS	fuego SCS basic	Teplota plamene: 1300°C Příkon: 2 VA
Analytické váhy	KERU	ABJ 220-4M	Max 220g Mín 10 mg
Sada plastových zkumavek	PTT	-	V: 5 ml, 15 ml, 50 ml
Mikrotitrační destička	PTT	Corning 96 Flat bottom Transparent Polystyrol	96 jamek, typ P
Počítací komůrka	Meopta	Počítací komůrka dle Bürkera	Hloubka: 0,1 mm Plocha 1 sítě: 9 mm ²
Inkubační láhev	PTT	-	V: 75 cm ² , 25cm ²
Kyveta	Eppendorf AG	Safe – Lock Tubec	V: 1,5 ml

3.2 Chemikálie a roztoky

3.2.1 Iskova modifikace Dulbeccova média (IMDM)

Médium je komerčně dodáváno od firmy PAA Laboratories GmbH. Obsahuje mimo jiné inzulin 10 mg/ml, transferin 10 mg/ml, selen 5 µg/ml, BSA 0,005 - 0,1 mg/ml, penicilin/streptomycin, dextran sulfát 1,5 µM - 1mM, cholesterol 0,1 - 8,8 mg/ml, stearát 10 µg/ml.

3.2.2 Kultivační médium

Je použita Iskova modifikace Dulbeccova média, které obsahuje IMDM, 20% fetální telecí sérum (od firmy SIGMA), 2 mM L - glutamin (od firmy SIGMA), penicilin a streptomycin.

Na přípravu 50 ml roztoku je třeba 10 ml fetálního telecího séra + 0,5 ml L-glutaminu + 0,5 ml penicilinu se streptomycinem a 39 ml IMDM.

3.2.3 Trypanová modř

Trypanová modř obsahuje 0,5 % vodný roztok Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide. 100 ml barvy připravíme rozpuštěním 0,5 g práškové barvy ve 100 ml destilované vody.

3.2.4 Sterilní fosfátový pufr PBS

PBS fosfátový pufr je rovněž komerčně dodáván od firmy PAA Laboratories GmbH. V jeho složení nacházíme 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄.

3.2.5 WST- 1 činidlo

Jedná se o sterilní roztok tetrazoliové soli s elektrony vázajícím činidlem rozpuštěný v sodném fosfátovém pufru. Roztok je dodáván v hotové podobě od firmy Roche.

3.2.6 WST – 1 roztok

WST – 1 roztok připravíme pomocí 1 dílu WST-1 činidla a 4 dílů PBS. Na jednu testovanou cytostatickou sloučeninu je zapotřebí 1 ml WST – 1 činidla + 4 ml PBS.

3.3 Pasážování a kultivace buněčné linie MOLT-4

Buňky T-lymfocytární leukémie linie MOLT-4 byli získány z Evropské sbírky buněčných kultur ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Jejich kultivace je prováděna v kultivačním médiu, jejich inkubace se provádí při 37°C a v kontrolované atmosféře s 5% CO₂.

Pro stanovení počtu buněk je použito barvení Trypanovou modří. K 50 µl Trypanové modří přidáme 50 µl buněčné linie. Po promíchání naplníme Bürkerovu komůrku a počítáme buňky v 50 středních čtvcích (*Schéma 22*), přičemž platí zásada dvou stran (počítáme všechny buňky, které se dotýkají dvou zvolených přilehlých stran uvnitř i vně strany čtverce, buňky, které jsou v kontaktu se zbylými dvěma stranami nepočítáme).

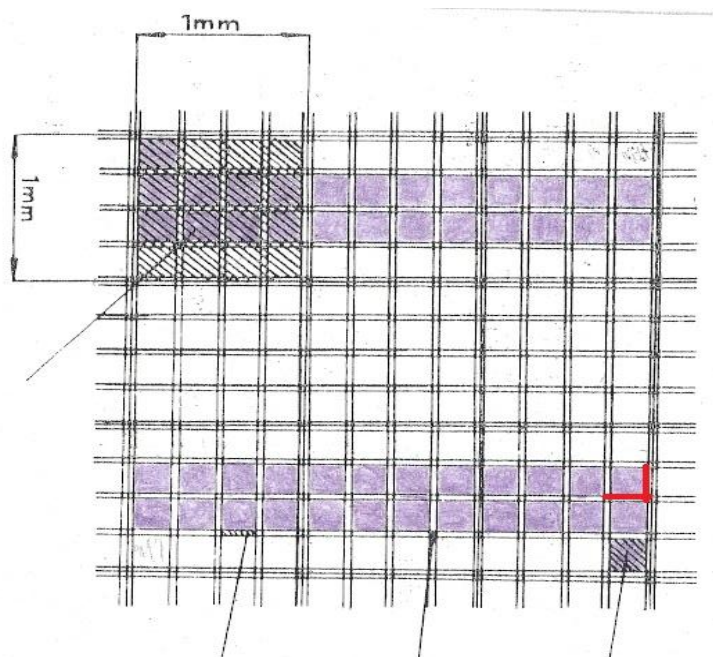


Schéma 22 Zobrazení mřížky v Bürkerově komůrce. Fialově jsou vyznačeny počítané střední čtverce, červeně jsou zobrazeny dvě zvolené strany pro splnění zásady dvou stran.

Spočítané buňky jsou v koncentraci 10^4 v 1 ml. Každý druhý den je jejich množství upraveno pomocí kultivačního média na hodnotu $2 \cdot 10^5$ v 1 ml. Pro zachování jejich standardních vlastností je pasážování prováděno maximálně 20x.

3.4 Příprava buněčné suspenze

Před začátkem testu přepočítáme buňky v Bürkerově komůrce pod mikroskopem pro zjištění jejich aktuální koncentrace. Pomocí IMDM upravíme koncentraci buněk na hodnotu 3×10^5 buněk v 1 ml.

Takto upravené buňky kultivujeme v inkubátoru při teplotě 37°C a kontrolované atmosféře s 5% CO_2 po dobu 24 hodin. Po inkubaci buněčnou suspenzi znovu naředíme čerstvým IMDM na výslednou koncentraci 5×10^5 buněk v ml média.

3.5 Příprava koncentrační řady

Pro změření účinku cytostatika na buněčnou linii MOLT-4 byly použity tři roztoky s koncentrací $1000 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$.

➤ **Příprava 1000 μM roztoku = A**

Navážku cytostatika s hmotností menší než 2 mg rozpustíme ve vypočteném objemu IMDM, dle vzorce:

$$V = \frac{m}{M \cdot c} * 10^3$$

Kde *V* je objem (ml), *m* je hmotnost (mg), *M* molární hmotnost a *c* je koncentrace (μmol/l).

Pokud dané cytostatikum není v IMDM rozpustné, je použito rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO), ale v maximálním množství, které odpovídá jen 1% z celkového objemu IMDM potřebného na rozpuštění cytostatika, aby nedošlo k porušení buněčné integrity.

➤ **Příprava 100 μM roztoku = B**

100 μM roztok, tj. 10x zředěný roztok A ⇒ 900 μl IMDM + 100 μl roztoku A

➤ **Příprava 10 μM roztoku = C**

10 μM roztok, tj. 100x zředěný roztok A ⇒ 990 μl IMDM + 10 μl roztoku A

3.6 Příprava mikrotitrační destičky

Každá cytostatická sloučenina byla testována na samostatné mikrotitrační destičce, která obsahuje 96 jamek. Každé jamce je přiřazena určitá koncentrace cytostatické látky. Rozložení mikrotitrační destičky je znázorněno na *schématu 23*.

Do každé jamky bylo napipetováno 100 μl buněčné suspenze, což odpovídá 50 000 buněk, a podle požadované koncentrace cytostatické látky v každé jamce bylo přidáno IMDM a cytostatikum v roztoku podle následující tabulky (*Tabulka 3*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M	M	M	M	M	M	K	K	K	K	K	K
B	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1
C	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5
D	9	9	9	9	9	9	16	16	16	16	16	16
E	28	28	28	28	28	28	50	50	50	50	50	50
F	90	90	90	90	90	90	160	160	160	160	160	160
G	280	280	280	280	280	280	500	500	500	500	500	500
H	K	K	K	K	K	K	M	M	M	M	M	M

Schéma 23 Experimentální uspořádání mikrotitrační destičky se zvoleným rozmezím koncentrace cytostatika od 0,5 – 500 $\mu\text{mol/l}$.

Kde: M označení je pro minimální koncentraci. Tyto jamky obsahují pouze 200 μl IMDM. Jedná se o slepý vzorek (blank). V tomto případě slouží jako dolní hranice koncentračního rozmezí.

K označení je pro maximální kontrolní vzorky. Do těchto jamek je dáno 100 μl buněčné suspenze + 100 μl IMDM a tato hodnota tvoří horní hranici koncentračního rozmezí.

Každá koncentrace (popř. M, K) byla na destičku nanášena v šesti duplikátech z důvodu omezení chyby při pipetování. Ze šesti hodnot byl vypočítán průměr a stanovena směrodatná odchylka.

Tabulka 3 Rozpis objemů jednotlivých roztoků pro dané koncentrace.

koncentrace	Buněčná suspenze (μl)	Roztok (μl)	IMDM (μl)
0,5	100	10 C	90
1	100	20 C	80
3	100	60 C	40
5	100	10 B	90
9	100	18 B	82
16	100	32 B	68
28	100	56 B	44
50	100	10 A	90
90	100	18 A	82
160	100	32 A	68
280	100	56 A	44
500	10	100 A	0

3.7 Inkubace

Po napipetování mikrotitrační destičky buněčnou linií a požadovanou koncentrací cytostatické látky, včetně zhotovení minimální (M) a maximální (K) kontroly, byla destička přenesena na 24 hodin do inkubátoru s nastavenou teplotou 37°C a hlídanou atmosférou s 5% CO₂.

3.8 Detekce

Po uplynutí 24 hodinové inkubační doby bylo do každé jamky napipetováno 50 µl WST – 1 roztoku (1 ml WST – 1 + 4 ml PBS) a destička byla znova 3 hodiny inkubována za stále stejných podmínek, tj. 37°C s 5% CO₂).

Po uplynutí 3. hodiny byla změřena hodnota absorbance pro každou jamku na destičce pomocí spektrofotometru INFINITE M200. Z manuálu firmy Roche má formazan absorpční maximum v rozmezí od 420 – 480 nm, pro mé měření byla zvolena vlnová délka 440 nm.

3.9 Vyhodnocení WST - 1 testu

Důležitým parametrem ve farmakologickém průmyslu s cytostatickými léčivy je hodnota inhibice IC₅₀. Tato hodnota stanovená in vitro udává 50% inhibici biochemických a biologických vlastností buněčné linie díky cytostatickým účinkům testované sloučeniny.

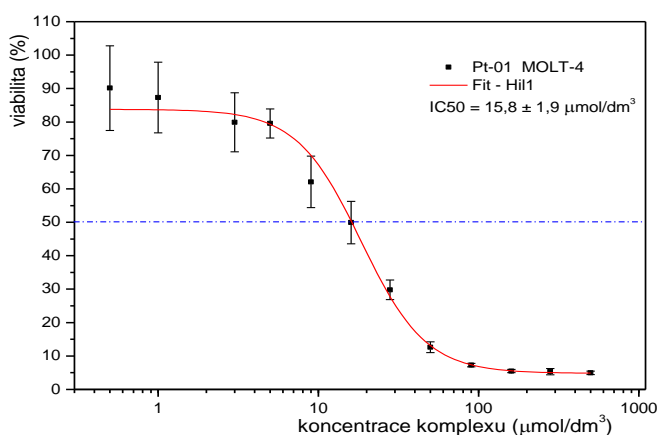
Jak bylo uvedeno výše, každá koncentrace (maximální a minimální kontrola) se prováděla v šesti duplikátech, ze kterých byla spočítána průměrná hodnota absorbance. Hodnoty absorbance byly zaneseny do grafu (závislost absorbance na příslušné koncentraci) a zpracovány pomocí softwaru Origin Pro (version 8, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) v bloku “Analyses” pomocí statistické metody “ANOVA”. Typ křivky byl na základě hodnoty vycházející z analýzy různého typu odchylek. Konkrétně pro tento typ křivek byly použity funkce „Boltzman, DoseResp a Hill1“. Z takto vyhodnocených dat byla odečtena hodnota IC₅₀.

4 Výsledky a diskuze

Pro testy cytostatické aktivity bylo na základě vhodných terapeutických vlastností (rozpuštnost a stabilita ve fyziologických roztocích) vybráno 42 nově připravených organokovových sloučenin přechodných kovů. Seznam testovaných sloučenin je z důvodu rozsáhlosti tohoto bloku uveden v *příloze 1* této práce v *tabulce 4*.

Testování inhibičního účinku komplexů obsahujících centrální kov vanad, niob a molybden a srovnávacího vzorku *cis*-DDP bylo provedeno na buněčné linii MOLT-4 odvozené od lymfocytární T-buněčné leukémie a pomocí WST-1testu.

Pro možnost srovnání a zavedení metodiky měření a vyhodnocení získaných hodnot byl jako první testován komplex *cis*-DDP. Hodnoty byly zpracovány pomocí softwaru Origin Pro 8, tak jak bylo uvedeno v kapitole 3.9. Z výsledného grafu byla odečtena hodnota IC_{50} (*Graf 1*). Pro *cis*-DDP byla nalezena hodnota $IC_{50} = 15,8 \pm 1,9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ což odpovídá údajům uvedených v literatuře⁵¹ $IC_{50} = 15,5 \pm 4,2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Obdobným způsobem byly zpracovány a vyhodnoceny všechny sloučeniny, jež byly připraveny na katedře obecné a anorganické chemie. Získané grafy závislosti životaschopnosti buněk na příslušné koncentraci, s fitovanou křivkou a vyznačenou hodnotou IC_{50} byly z důvodu celistvosti a přehlednosti této kapitoly umístěny do *přílohy 2*. Nejsou zde uvedeny grafy s nalezenou hodnotou $IC_{50} \geq 200 \mu\text{M}$. Přehled naměřených hodnot IC_{50} je uveden v *tabulce 5*.



Graf č. 1: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Pt-01.
 $IC_{50} = 15,8 \pm 1,9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$

Tabulka 5 Přehled hodnot IC_{50} pro testované sloučeniny.

Označení	IC_{50} MOLT ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Označení	IC_{50} MOLT ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	Označení	IC_{50} MOLT ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)
Pt-01	15,8 ± 1,9	V-14	128 ± 7	Nb-12	104,9 ± 15
V-01	86,4 ± 10,2	V-15	24,9 ± 4,3	Nb-13	84,2 ± 2,2
V-02	124 ± 7	V-16	29,7 ± 1,4	Nb-14	31,0 ± 7,2
V-03	150 ± 18	Nb-01	49,3 ± 5,1	Nb-15	≥ 200
V-04	≥ 200	Nb-02	61,2 ± 10,2	Nb-16	14,3 ± 1,1
V-05	≥ 200	Nb-03	28,9 ± 4,8	Nb-17	≥ 200
V-06	≥ 200	Nb-04	≥ 200	Mo-01	11,3 ± 0,6
V-07	117 ± 9	Nb-05	80,6 ± 11,4	Mo-02	51,6 ± 13,3
V-08	≥ 200	Nb-06	≥ 200	Mo-03	19,9 ± 0,7
V-09	8,0 ± 1,4	Nb-07	60,3 ± 2,4	Mo-04	16,9 ± 0,7
V-10	8,1 ± 1,2	Nb-08	113,4 ± 5,4	Mo-05	4,9 ± 0,7
V-11	3,2 ± 0,4	Nb-09	≥ 200	Mo-06	74,5 ± 5,3
V-12	15,5 ± 1,0	Nb-10	≥ 200	Mo-07	171,7 ± 11
V-13	75,8 ± 7,5	Nb-11	≥ 200	Mo-08	71,7 ± 19
				Mo-09	≥ 200

Uvedený soubor hodnot IC_{50} můžeme na základě porovnání s klinicky používanou látkou *cis*-DDP rozdělit na tři skupiny komplexů. Komplexy s hodnotou $IC_{50} \geq 200 \mu\text{M}$ - neúčinné, s hodnotou IC_{50} menší než $200 \mu\text{M}$, ale větší než pro *cis*-DDP - účinné a nakonec sloučeniny s hodnotou IC_{50} srovnatelnou nebo menší než byla stanovena pro *cis*-DDP - vysoce účinné.

Pro testování sloučenin obsahujících jako centrální kov vanad v oxidačním stavu IV byly vybrány vanadocenové komplexy s různými substituenty na cyklopentadienylových kruzích nebo deriváty vanadocendichloridu připravené substitucí chloridových ligandů. Výchozí sloučenina, vanadocendichlorid, byl v minulosti testován na cytotoxickou aktivitu s hodnotou⁵² $IC_{50} = 86 \pm 4,2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Z výsledků našich testů vyplynulo, že deriváty sloučeniny **V-04** až **V-06** a **V-08** s hodnotou $IC_{50} \geq 200 \mu\text{M}$ se jeví jako neúčinné. Ve všech případech se jedná o deriváty vandocendichloridu a vanadocendibromidu

substituované jednoduššími substituenty na cyklopentadienylových kruzích. Komplexy **V-01** až **V-03**, **V-07** a **V-13** až **V-16** jsou účinné. Sloučeniny **V-01** až **V-03** a **V-07** jsou většinou cytotoxicky méně aktivní menší než u vanadocendichloridu a derivátů bipyridinu **V-13** až **V-16** s účinností větší než v případě výchozí sloučeniny. Vysoká cytotoxická aktivita byla nalezena u komplexů **V-09** až **V-12**. Ve všech případech se jedná o vanadocenové nebo dimethylvanadocenové komplexy s chelátově vázaným fenantrolinem. Nejvyšší hodnota cytostatické aktivity (nejmenší hodnota IC_{50}) byla nalezena pro sloučeninu **V-11** [$Cp_2V(phen-NH_2)]OTf_2$.

O cytotoxické aktivitě niobocenových komplexů je možné najít v literatuře⁵³ zmínku pouze v souvislosti s molybdendichloridem. Tento komplex vykazoval srovnatelný biologický účinek s vanadocendichloridem. Z tohoto důvodu bylo pro testy cytotoxické aktivity vybráno poměrně široké spektrum niobocenových komplexů. S výsledků našich testů vyplynulo, že deriváty sloučeniny **Nb-04**, **Nb-06**, **Nb-09** až **Nb-11**, **Nb-15** a **Nb-17** s hodnotou $IC_{50} \geq 200 \mu M$ se jeví jako neúčinné. Jedná o deriváty niobocendichloridu a niobocendibromidu substituované na cyklopentadienylových kruzích. Komplexy **Nb-01** až **Nb-03**, **Nb-07**, **Nb-08**, **Nb-09** a **Nb-12** až **Nb-14** jsou účinné. Do této skupiny se také zařadily výchozí sloučeniny jako niobocendichlorid **Nb-01** a niobocendibromid **Nb-02** s cytotoxickou aktivitou odpovídající izostrukturálním vanadocenovým komplexům. Vysoká cytotoxická aktivita byla nalezena pouze u komplexu **Nb-16**. Jedná se o niobocenový komplex substituovaný na cyklopentadienylovém kruhu stericky náročným substituentem (*para*-methoxyPheCp)₂NbCl₂.

Protože cytotoxická aktivita dicyklopentadienylových molybdenocenových komplexů je v literatuře popsána bylo pro testy zvoleny molybdenocenové komplexy odlišného typu. S výsledků našich testů vyplynulo, že bipyridinový derivát **Mo-09** s hodnotou $IC_{50} \geq 200 \mu M$ se jeví jako neúčinný. Komplexy **Mo-02** a **Mo-06** až **Mo-08** se jeví jako účinné. Poměrně početná je skupina komplexů molybdenu s vysokou cytotoxickou aktivitou **Mo-01** a **Mo-03** až **Mo-05** svědčící o biologické aktivitě přítomného kovu. Nejvyšší hodnota cytostatické aktivity (nejmenší hodnota IC_{50}) byla nalezena pro sloučeninu **Mo-05**, kde je na centrální atom chelátově vázaný fenantrolin, dva monodentátně vázané karbonyly a η^5 -vázaný substituovaný indenyl.

5 Závěr

Celkově bylo provedeno zkoumání a hodnocení inhibičního účinku 42 komplexů obsahujících jako centrální atom přechodný kov. Testování bylo provedeno na buněčné linii MOLT-4 odvozené od lymfocytární T-buněčné leukémie a pomocí WST-1 testu byla nalezena cílová hodnota poloviční inhibiční koncentrace životaschopnosti buněk (IC_{50}). V každé skupině obsahující různý kov byla nalezena sloučenina s cytostatickou aktivitou odpovídající inhibiční aktivitě dosud nejpoužívanějšího protirakovinného léčiva, *cis*-DDP.

Struktury neúčinnějších organokovových komplexů přechodných kovů jsou uvedeny na *schématu 24*. Shodným znakem objevujícím se prakticky u všech sloučenin je přítomnost chelátově vázaného fenantrolinu.

Příprava nových organokovových komplexů bude na základě těchto výsledků zaměřena na přípravu niobocenových fenantrolinových sloučenin popřípadě nového typu N,N-chelátových ligandů.

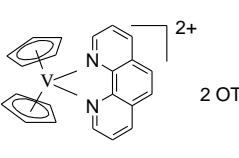
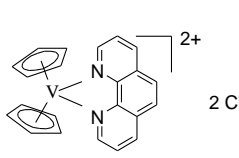
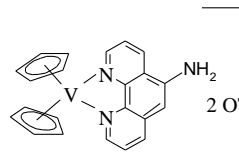
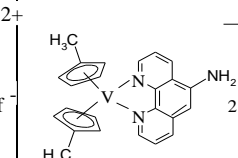
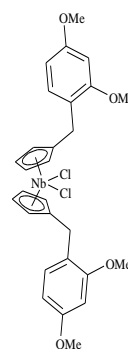
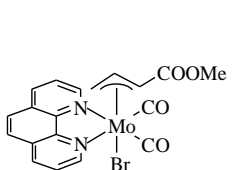
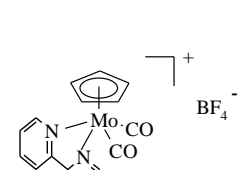
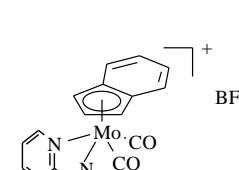
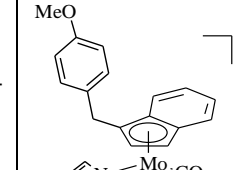
				
V-09	V-10	V-11	V-12	
				
Mo-01	Mo-03	Mo-04	Mo-05	

Schéma 24 Velmi účinné organokovové komplexy s IC_{50} srovnatelnou s *cis*-DDP.

Naměřené hodnoty byly použity:

Jan Honzíček ^{a,*}, Jaromír Vinklárek ^b, Zdeňka Padělková ^b, Lucie Šebestová ^c,
Karolína Foltánová ^d, Martina Řezáčová ^d

The effect of substitution on the cytotoxicity of molybdenum(II) and tungsten(II) compounds.

Journal of Organometallic Chemistry 2012 submitted

**Iva KLEPALOVÁ, ^{a)} Jan HONZÍČEK, ^{b)} Jaromír VINKLÁREK, ^{a)} Lucie ŠEBESTOVÁ, ^{c)}
Martina ŘEZÁČOVÁ ^{d)}**

Cytotoxicity of vanadocene complexes substituted in cyclopentadienyl rings

Acta of the International Symposia on Metal Complexes – ISMEC Acta, Volume 2

ISMEC 2012, June 18th – 22nd 2012 – Lisbon (Portugal) poster

Seznam použité literatury

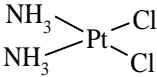
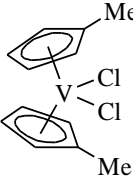
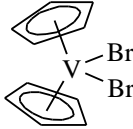
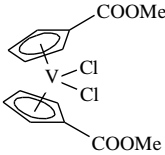
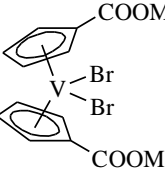
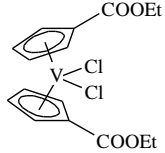
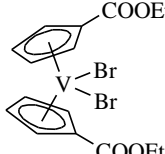
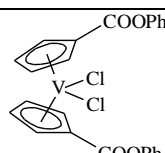
- 1 Klener P., Klener P.: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, 1. vyd., 209 s. Grada Publishing, Praha 2010, ISBN 978-802-4728-087.
- 2 Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M.: *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No*, 5th ed., IARC Press, Lyon 2004.
- 3 Petrlík F.: Základy farmakologie: klinická a speciální farmakologie, 1. vyd., 147-151 s., Praha: Karolinum 2005, ISBN 80-246-1139-2.
- 4 Hynie S.: Speciální farmakologie, 2.přepřac. vyd., 166 s. Praha: Karolinum 2003, ISBN 80-246-0656-9.
- 5 Votava M.: *Vývoj nového léčiva*.
- 6 Hampf F., Rádl S., Paleček J.: Farmakochemie, 2. rozš. vyd., 379-394 s. Praha: VŠCHT 2007, ISBN 978-80-7080-639-5.
- 7 Květina J., Herink J., Vopršalová M.: Základy farmakologie, 1. vyd., 71 – 84 s. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Farmaceutická fakulta 2000, ISBN 80-730-5391-8.
- 8 Hartinger Ch. G., Dyson p. J.: *Bioorganometallic chemistry - From teaching paradigms to medicinal applications*. Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 391–401, DOI: 10.1039/b707077m.
- 9 Yan Y. K., Melchart M., Habtemariam A., Sadler P. J.: *Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes*. Chem. Commun., 2005, 4764–4776, DOI: 10.1039/b508531b.
- 10 Farrer N. J., Salassa L., Sadler P. J.: *Photoactivated chemotherapy (PACT): the potential of excited-state d-block metals in medicine*. Dalton Trans., 2009, 10690–10701.
- 11 Drobník, J.: *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, 1983, 10, 145-153.
- 12 Lippert B.: *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. New York: Wiley-VCH, 1999, 563 s. ISBN 39-063-9020-9.
- 13 Racek J.: *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 1999, 317 s. ISBN 80-718-4971-5.
- 14 Reedijk J., Chem. Rev., 1999. 99: p. 2499-2510.
- 15 Holler E.: *Mechanism of action of tumor-inhibiting metal complexes. Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, ed. B.K. Keppler. 1993, Weinheim, New York: VCH Verlagsgesellschaft, VCH Publishers. 434.
- 16 Brabec V.: *Mechanism of the anti-tumor activity of platinum complexes. In Advances in Cell and Molecular Biology* (J. Berger, Ed.). Kopp, České Budějovice 2005.
- 17 Lümman H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, Grada Publishing 2004.
- 18 Návrh změny výše a podmínek úhrady z moci úřední skupiny vzájemně terapeuticky porovnatelných přípravků s obsahem léčivé látky cisplatin: SUKLS113019. 2009.
- 19 Poklar N., Pilch D.S., Lippard S.J., Redding E.A., Dunham S.U., Breslauer K.J., Proc. Natl. Acad. Sei. USA 93 (1996) 7606-7611.
- 20 Blommaert F.A., et al.: *Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: Different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells*. Biochemistry, 1995, 34 (26), p.8474-8480.
- 21 Návrh změny výše a podmínek úhrady z moci úřední léčivé látky karboplatina.: SUKLS114419. 2009.
- 22 Natarajan G., Malathi R., Holler E.: *Increased DNA binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (Carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: Activation theory revisited*. Biochem, Pharmacol., 1999. 58(10): p. 1625-1629.
- 23 Song I. S., Savaraj N., Siddik Z. H., Liu P., Wei Y., Wu C. J.: *Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells*. Mol Cancer Ther 3, 2004, 1543-1549.
- 24 Mauldin S. K., Gibbons G., Wyrick S. D., Chaney S. G.: *Intracellular biotransformation of platinum compounds with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in the L1210 cell line*, Cancer Res 48, 1988, 5136-5144.
- 25 Graham M. A., Lockwood G. F., Greenslade, D., Brienza S., Bayssas M., Gameli, E. *Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review*. Clin Cancer Res 6, 2000. 1205-1218.
- 26 Návrh změny výše a podmínek úhrady z moci úřední léčivé látky karboplatina.: SUKLS114419. 2009.: SUKLS114462. 2009.

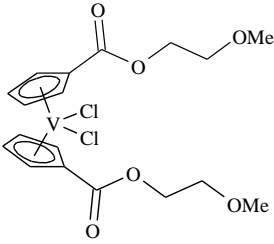
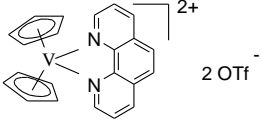
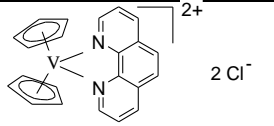
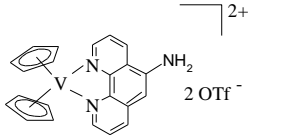
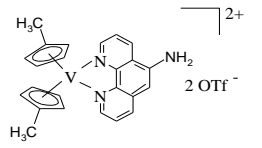
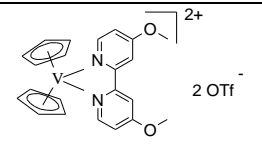
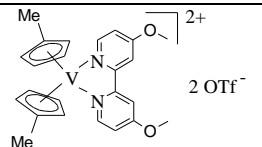
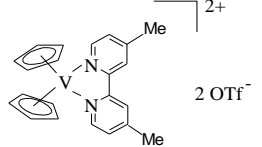
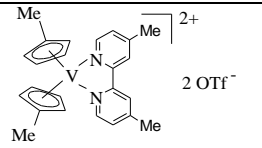
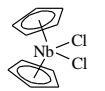
- 27 Foltinová V.: *Působení platinového derivátu LA-12 na buněčnou linii HT-29 ve srovnání s cisplatinou a oxaliplatinou*. 2010, Brno.
- 28 Köpf – Maier P., Köpf H.: *Non – platinum – group metal antitumor agents: History, current status and perspectives*; Chem. Rev. 1987, 87, 1137 – 1152.
- 29 Gleeson B., Claffey J., Hogan M., Müller-Bunz H., Wallis D., Tacke M., Patil S.: *Novel benzyl-substituted vanadocene anticancer drugs*. Journal of Organometallic Chemistry, 2009, 1369–1374, DOI: 10.1016.
- 30 Vinklárek J., Dědourková T., Honziček J., Růžička A.: *Vanadocene complexes of amino acids containing secondary amino Groups: The first evidence O, O – bonded carboxylic group to vanadocene (IV) moiety*, Journal of Inorganic Chemistry, 2010, 104, 936 – 943.
- 31 Ghosh P., D’Cruz O. J., Uckun F. M.: *Permicidal activity of chelated complexes of bis (cyclopentadienyl) vanadium (IV)*. Molecular Human Reproduction, 1998, 4 no. 7, 683 – 693.
- 32 Matoss MRPN, Romao CC, Lage Perlira CC, Rodrigues SS, Mora M, Silva MJP, Alves PM, Reis CA (2005): *Compositions comprising organometallic molybdenan compounds for treating cancer*. Patent WO 2005/087783.
- 33 Feliciano I., Matta J., Meléndez E.: *Water – soluble molybdenocene complexes with both proliferative and antiproliferative effects on cancer cell lines and their binding interactions with human serum albumin*, Journal of Inorganic Chemistry 2009, 14, 1109 – 1117.
- 34 Brewer G. J., Dick R. D., Grover D. K., LeClaire V., Tseng M., Wicha M., Pienta K., Redman B. G., Jahan T., Sondak V. K., Strawderman M., LeCarpentier G., Merajver S.D.: *Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent*. Clin.Cancer Res, 2000, 6, 1-10.
- 35 Köpf-Maier P., Leitner M. a Köpf H.: *Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene dichlorides*. J. inorg. nucl. Chem, 1980, 42, 1789-1791.9.
- 36 Rijt V., Sabine H., Sadler P.H.: *Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs*. Drug Discovery Today. 2009, 14, 23-24, 1089-1097.
- 37 Bruijninx P., Sadler P.: *New trends for metal complexes with anticancer activity*. Current Opinion in Chemical Biology 2008, 12, 197–206.
- 38 Vejražka M.: *Buněčné kultury*. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- 39 Dvořák Z.: *Metodologie v buněčné a molekulární toxikologii*. Katedra buněčné biologie a genetiky: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.
- 40 Pádr Z.: *Tetrazoliové soli, jejich příprava a použití v biologii a lékařství*. Státní zdravotnické nakladatelství, 1959.
- 41 Cell Proliferation Reagent WST – 1 – manuál firmy Roche, verze: 2007
- 42 ATCC: MTT Cell Proliferation Assay.
- 43 XTT test. In: GENERI BIOTECH: Compounds and services for molecular biology.
- 44 Test cytotoxicity s neutrální červení. In: GENERI BIOTECH: Compounds and services for molecular biology.
- 45 Christodoulou, C. V.; et al. *British Journal of Cancer* 77, **1998**, 2088 – 2097.
- 46 Ghosh, P.; D’Cruz, O. J.; Krishna Narla, R.; Uckun, F. M. *Clinical Cancer Research* 6, **2000**, 1536 – 1545.
- 47 Allen, O. R.; Croll, L.; Gott, A. L.; Knox, R. J.; McGowan P. C. *Organometallics* 23, **2004**, 288 – 292.
- 48 Penka M., Slavičková E.: *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s. ISBN 978-802-4734-590.
- 49 Mihál V.: *Akutní lymfoblastická leukémie dospívajících a mladých dospělých – identická biologická kategorie*. Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci *Onkologie*. 2008, roč. 2, č. 3, s. 167-172.
- 50 Buněčná biologie: CRL-1582. In: *LGC: Standards* .
- 51 Zhao X., Loo S. Ch. J., Lee P. P-F., Tan T. T. Y., Chu Ch. K *Journal of Inorganic Biochemistry* 104 (2010) 105–110)
- 52 Honziček J., Klepalová I., Vinklárek J., Padělková Z., Císařová I., Šiman P., Řezáčová M.: *Synthesis, characterization and cytotoxic effect of ring-substituted and ansa-bridged vanadocene complexes*. Inorganica Chimica Acta vol. 373, issue 1, July 15, 2011.
- 53 Kopf-Maier P.; Leitner M.; Kopf H.: *Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene dichlorides*. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry vol. 42 issue 12 1980. p. 1789-1791.


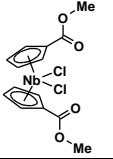
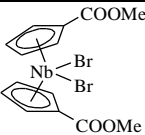
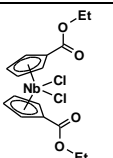
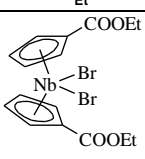
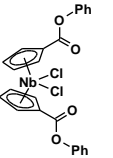
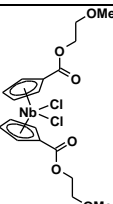
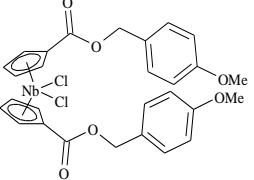
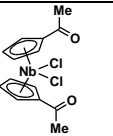
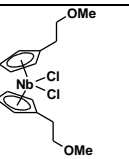
Příloha 1:

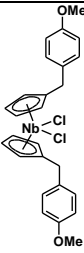
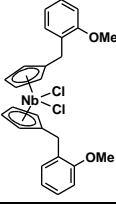
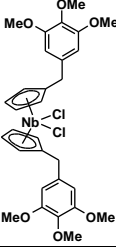
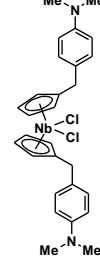
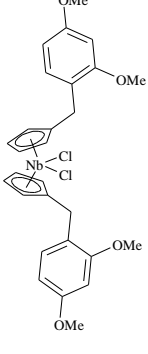
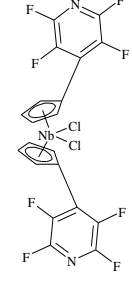
Tabulka 4

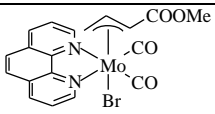
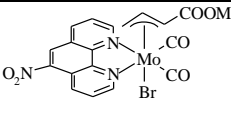
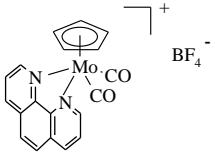
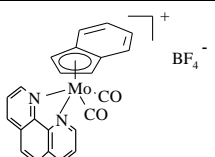
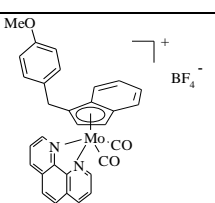
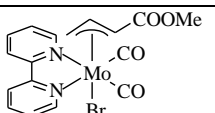
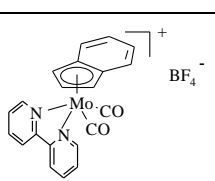
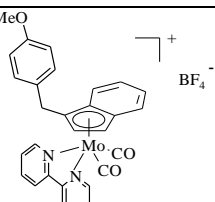
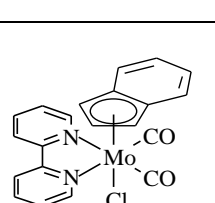
Tabulka testovaných sloučenin.

Označení	Struktura	Sumární vzorec	Molární hmotnost
Pt-01		$\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$	300,04
V-01		$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{V}$	280,08
V-02		$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{VBr}_2$	340,936
V-03		$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_4\text{V}$	368.11
V-04		$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{VBr}_2$	457,008
V-05		$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{O}_4\text{V}$	396.16
V-06		$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{VBr}_2$	485,061
V-07		$\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{VCl}_2$	492.24

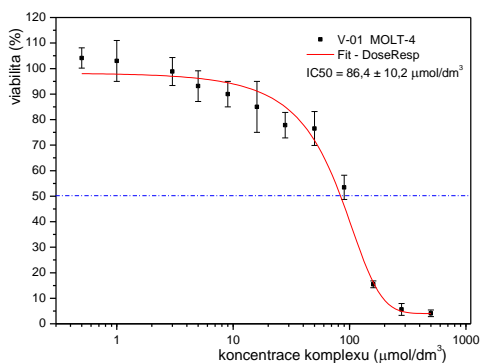
V-08		$C_{18}H_{22}O_6VCl_2$	456,21
V-09		$C_{24}H_{18}VS_2N_2F_6O_6$	659,14
V-10		$C_{22}H_{18}Cl_2N_2V$	431,84
V-11		$C_{24}H_{19}F_6N_3O_8S_2V$	674,96
V-12		$C_{26}H_{23}F_6N_3O_8S_2V$	702,96
V-13		$C_{24}H_{22}VS_2N_2F_6O_8$	695,496
V-14		$C_{26}H_{26}VS_2N_2F_6O_8$	723,548
V-15		$C_{24}H_{26}VS_2N_2F_6O_6$	663,496
V-16		$C_{26}H_{26}VS_2N_2F_6O_6$	691,548
Nb-01		$C_{10}H_{10}Cl_2Nb$	293,998

Nb-02		$C_{10}H_{10}Br_2Nb$	382,90
Nb-03		$C_{14}H_{14}Cl_2NbO_4$	410,07
Nb-04		$C_{14}H_{14}Br_2NbO_4$	498,87
Nb-05		$C_{16}H_{18}Cl_2NbO_4$	438,12
Nb-06		$C_{16}H_{18}Br_2NbO_4$	527,03
Nb-07		$C_{24}H_{18}Cl_2NbO_4$	534,21
Nb-08		$C_{18}H_{22}Cl_2NbO_6$	498,18
Nb-09		$C_{28}H_{26}Cl_2NbO_6$	622,31
Nb-10		$C_{14}H_{14}Cl_2NbO_2$	378,07
Nb-11		$C_{16}H_{22}Cl_2NbO_2$	410,16

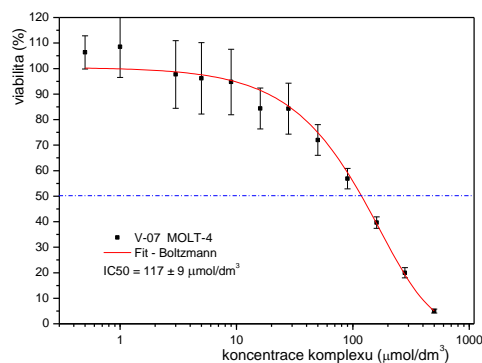
<p>Nb-12</p>		$C_{26}H_{26}Cl_2NbO_2$	<p>534,30</p>
<p>Nb-13</p>		$C_{26}H_{26}Cl_2NbO_2$	<p>534,30</p>
<p>Nb-14</p>		$C_{30}H_{34}Cl_2NbO_6$	<p>654,40</p>
<p>Nb-15</p>		$C_{28}H_{32}Cl_2N_2Nb$	<p>560,38</p>
<p>Nb-16</p>		$C_{28}H_{30}Cl_2NbO_4$	<p>594,35</p>
<p>Nb-17</p>		$C_{20}H_8Cl_2F_8N_2Nb$	<p>592,09</p>

Mo-01		$C_{19}H_{15}BrMoN_2O_4$	511.18
Mo-02		$C_{19}H_{14}BrMoN_3O_6$	556.18
Mo-03		$C_{19}H_{13}BF_4MoN_2O_2$	484.06
Mo-04		$C_{23}H_{15}BF_4MoN_2O_2$	534,12
Mo-05		$C_{31}H_{21}BF_4MoN_2O_3$	654,26
Mo-06		$C_{17}H_{15}BrMoN_2O_4$	487.16
Mo-07		$C_{21}H_{15}BF_4MoN_2O_2$	510,1
Mo-08		$C_{29}H_{23}BF_4MoN_2O_3$	630,24
Mo-09		$C_{21}H_{15}ClMoN_2O_2$	458.75

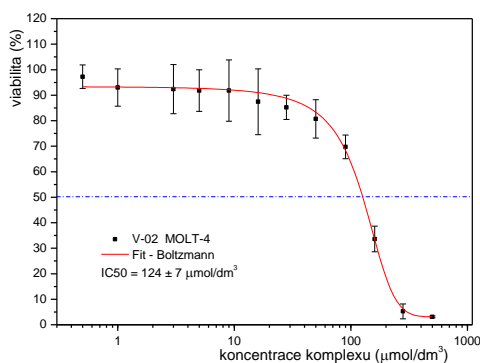
Příloha 2:



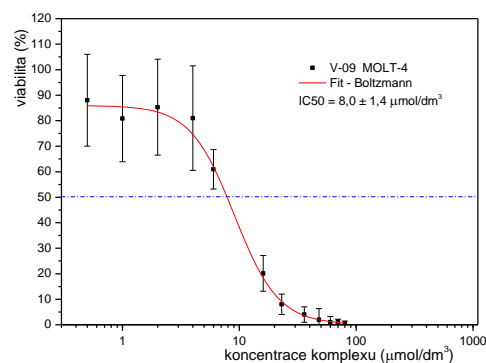
Graf č. 2: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-01.
 $IC_{50} = 86,4 \pm 10,2 \mu\text{mol/dm}^3$



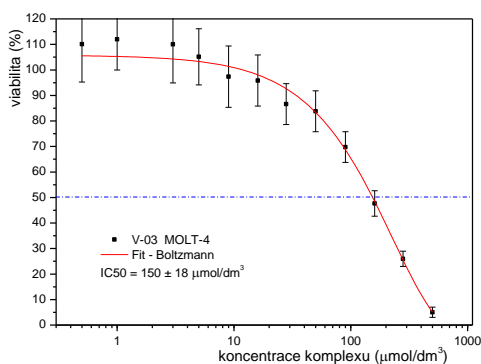
Graf č. 5: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-07.
 $IC_{50} = 117 \pm 9 \mu\text{mol/dm}^3$



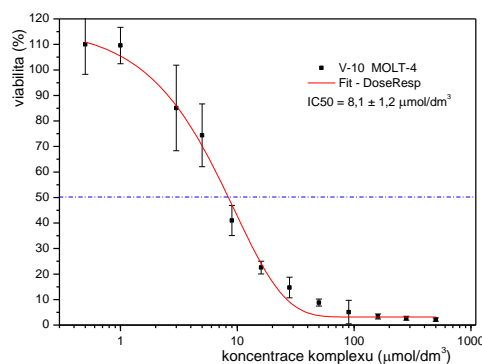
Graf č. 3: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-02.
 $IC_{50} = 124 \pm 7 \mu\text{mol/dm}^3$



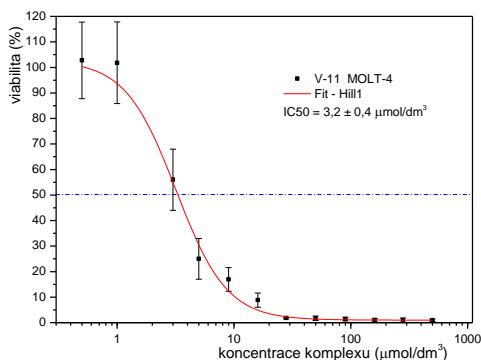
Graf č. 6: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-09.
 $IC_{50} = 8,0 \pm 1,4 \mu\text{mol/dm}^3$



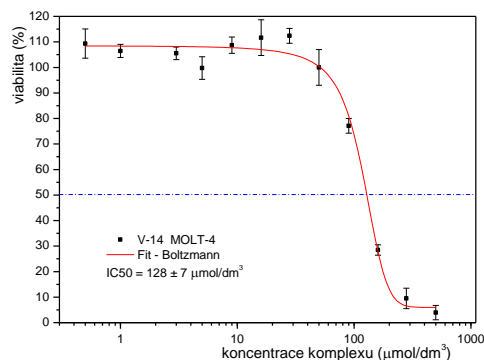
Graf č. 4: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-03.
 $IC_{50} = 150 \pm 18 \mu\text{mol/dm}^3$



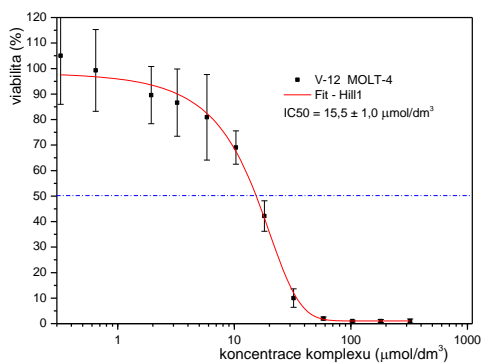
Graf č. 7: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-10.
 $IC_{50} = 8,1 \pm 1,2 \mu\text{mol/dm}^3$



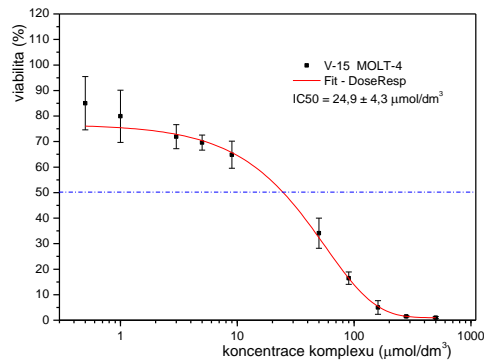
Graf č. 8: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-11.
 $IC_{50} = 3,2 \pm 0,4 \mu\text{mol/dm}^3$



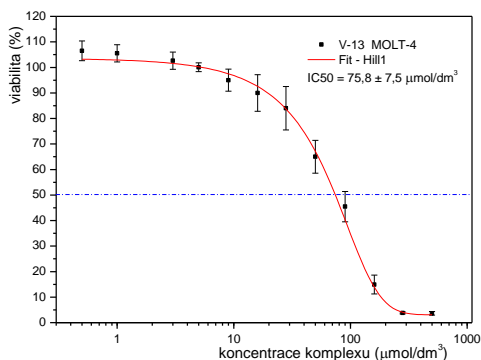
Graf č. 11: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-14.
 $IC_{50} = 128 \pm 7 \mu\text{mol/dm}^3$



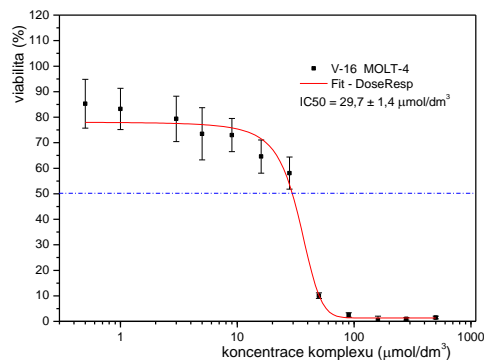
Graf č. 9: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-12.
 $IC_{50} = 15,5 \pm 1,0 \mu\text{mol/dm}^3$



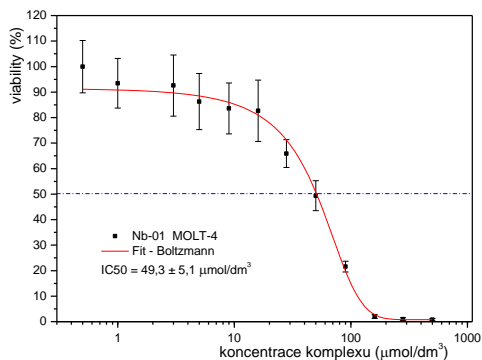
Graf č. 12: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-15.
 $IC_{50} = 24,9 \pm 4,3 \mu\text{mol/dm}^3$



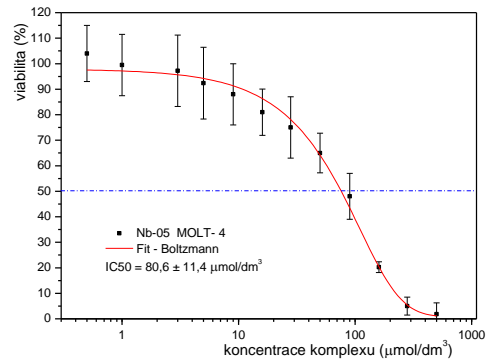
Graf č. 10: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-13.
 $IC_{50} = 75,8 \pm 7,5 \mu\text{mol/dm}^3$



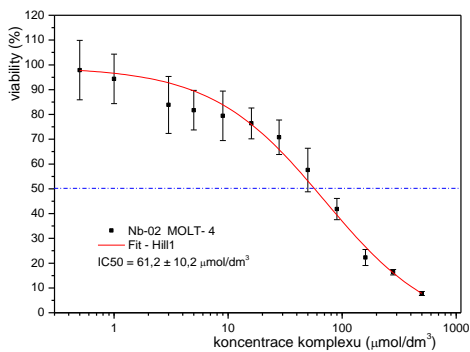
Graf č. 13: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu V-16.
 $IC_{50} = 29,7 \pm 1,4 \mu\text{mol/dm}^3$



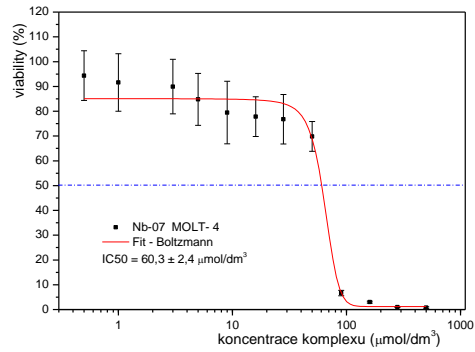
Graf č. 14: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-01.
 $IC_{50} = 49,3 \pm 5,1 \mu\text{mol/dm}^3$



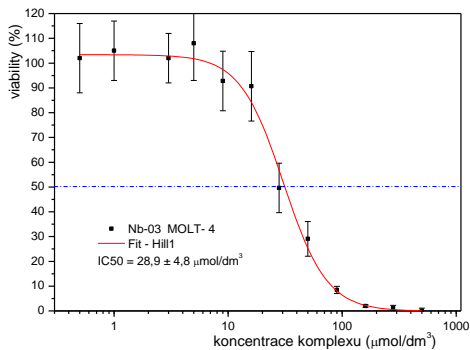
Graf č. 17: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-05.
 $IC_{50} = 80,6 \pm 11,4 \mu\text{mol/dm}^3$



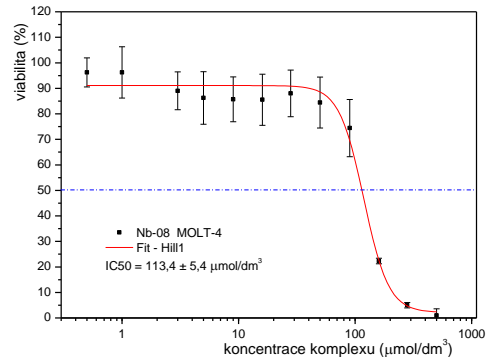
Graf č. 15: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-02.
 $IC_{50} = 61,2 \pm 10,2 \mu\text{mol/dm}^3$



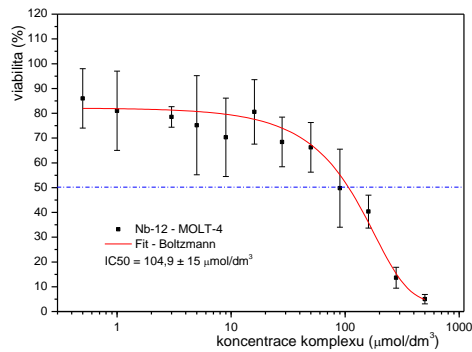
Graf č. 18: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-07.
 $IC_{50} = 60,3 \pm 2,4 \mu\text{mol/dm}^3$



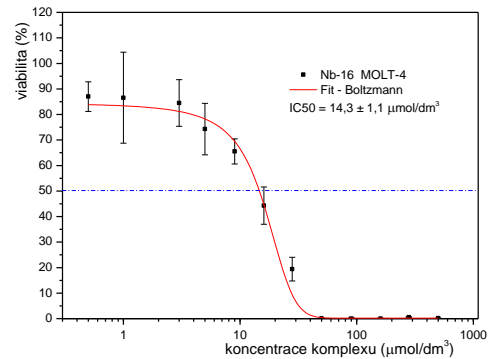
Graf č. 16: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-03.
 $IC_{50} = 28,9 \pm 4,8 \mu\text{mol/dm}^3$



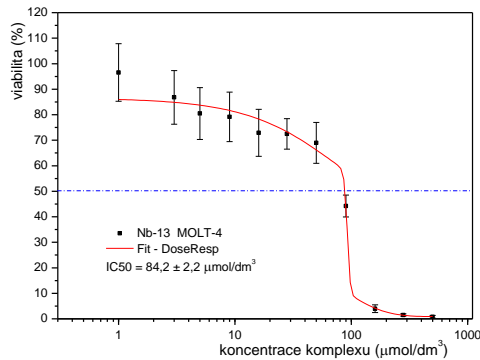
Graf č. 19: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-08.
 $IC_{50} = 113,4 \pm 5,4 \mu\text{mol/dm}^3$



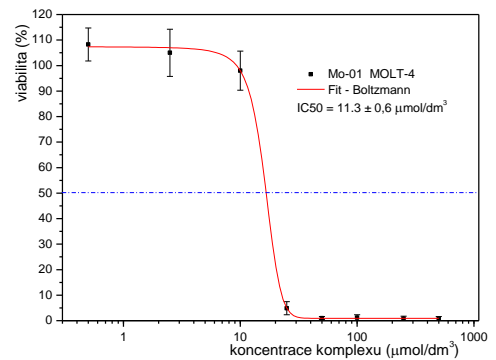
Graf č. 20: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-12.
 $IC_{50} = 104,9 \pm 15 \mu\text{mol/dm}^3$



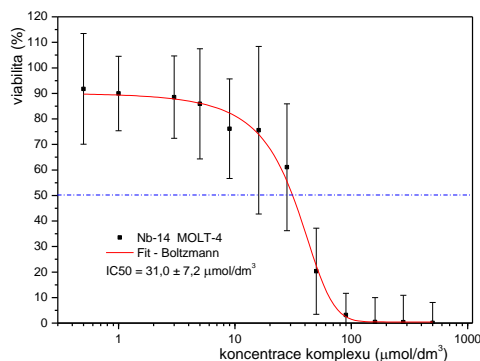
Graf č. 23: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-16.
 $IC_{50} = 14,3 \pm 1,1 \mu\text{mol/dm}^3$



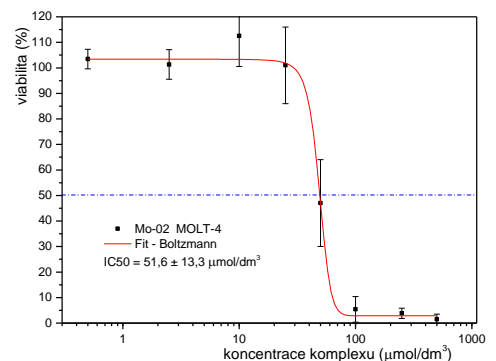
Graf č. 21: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-13.
 $IC_{50} = 84,2 \pm 2,2 \mu\text{mol/dm}^3$



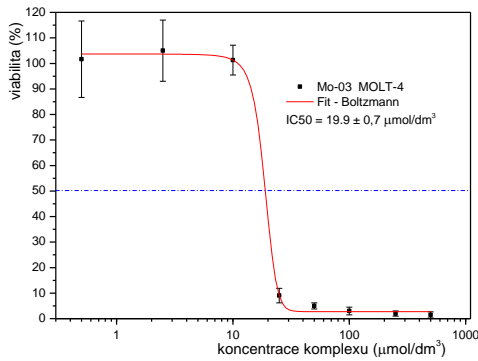
Graf č. 24: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-01.
 $IC_{50} = 11,3 \pm 0,6 \mu\text{mol/dm}^3$



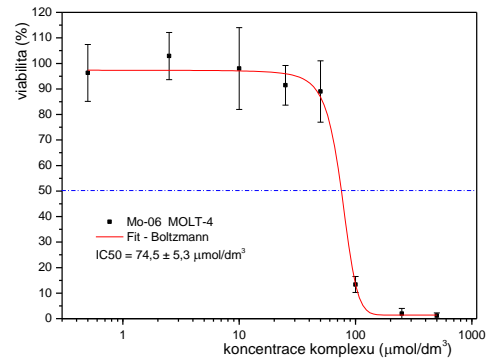
Graf č. 22: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Nb-14.
 $IC_{50} = 31,0 \pm 7,2 \mu\text{mol/dm}^3$



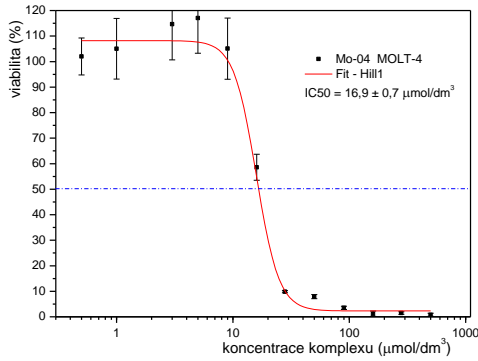
Graf č. 25: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-02.
 $IC_{50} = 51,6 \pm 13,3 \mu\text{mol/dm}^3$



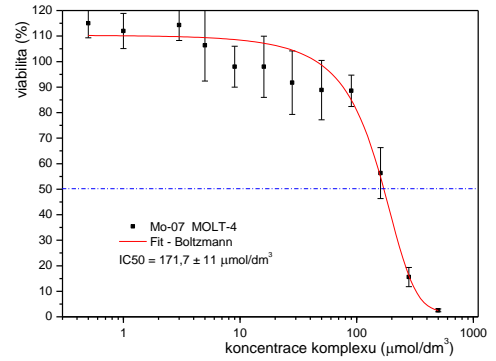
Graf č. 26: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-03.
 $IC_{50} = 19,9 \pm 0,7 \mu\text{mol/dm}^3$



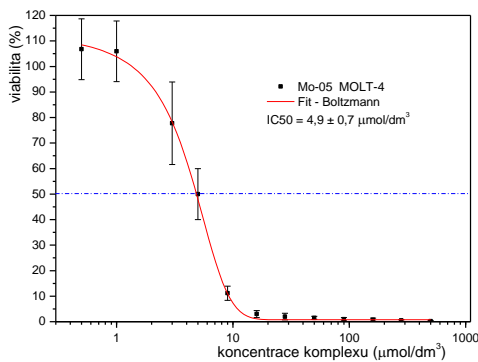
Graf č. 29: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-06.
 $IC_{50} = 74,5 \pm 5,3 \mu\text{mol/dm}^3$



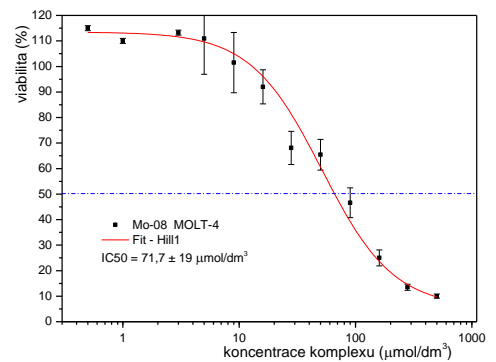
Graf č. 27: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-04.
 $IC_{50} = 16,9 \pm 0,7 \mu\text{mol/dm}^3$



Graf č. 30: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-07.
 $IC_{50} = 171,7 \pm 11 \mu\text{mol/dm}^3$



Graf č. 28: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-05.
 $IC_{50} = 4,9 \pm 0,7 \mu\text{mol/dm}^3$



Graf č. 31: Závislost viability buněk na koncentraci komplexu Mo-08.
 $IC_{50} = 71,7 \pm 19 \mu\text{mol/dm}^3$

Název práce	Stanovení cytotoxicity organokovových komplexů přechodných kovů
Autor práce	Lucie Šebestová
Obor	Klinická biologie a chemie
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.
Anotace	<p>Tato práce je zaměřená na studium cytotoxické aktivity organokovových sloučenin přechodných kovů. Testování bylo provedeno na buněčné linii MOLT-4 odvozené od lymfocytární T-buněčné leukémie pomocí WST-1 testu. Celkově bylo provedeno zkoumání a hodnocení inhibičního účinku (IC_{50}) u 42 organokovových komplexů obsahujících jako centrální atom přechodný kov vanad, niob a molybden. V každé skupině obsahující různý kov byla nalezena sloučenina s cytostatickou aktivitou odpovídající inhibiční aktivitě dosud nepoužívanějšího protirakovinného léčiva, cis-DDP. Tyto nejúčinnější sloučeniny dále obsahovaly chelátově vázaný fenantrolin a stericky náročné ligandy (methoxyfenyl, cyklopentadienyl nebo indenyl).</p>
Klíčová slova	rakovina, cytostatika, organokovové sloučeniny, stanovení cytotoxicity, apoptóza