

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Hodnotenie biologického účinku vanadocén dithiokarbamátových komplexov na
línií buniek akútnej lymfoblastickej leukémie

Kristína Spustová

Bakalárska práca

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristína Spustová**
Osobní číslo: **C15431**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Hodnocení biologického účinku vanadocen
dithiokarbamátových komplexů na linii buněk akutní
lymfoblastické leukémie**
Zadávací 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 komplexů přechodných kovů na nádorové buňky.
 - b) Zaměřit se především na vysvětlení jejich možného mechanismu účinku a možnosti stanovení buněčné smrti.
- 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 redukce tetrazoliové soli.
 - c) Naměřená data zpracovat za pomoci odpovídajících počítačových programů.
 - d) Na základě získaných hodnot IC₅₀ diskutovat vliv různého typu dithiokarbamátových ligandů na hodnotu nalezeného cytostatického účinku.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Seznam odborné literatury: dle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.**

Katedra obecné a anorganické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lucie Melounková**

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o užití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená od mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších prepisov, a smernicu Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezentačným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 4.7.2018

Kristína Spustová

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste chcem poďakovať za odborné vedenie, prínosné rady a pomoc prof. Ing. Jaromírovi Vinklárkovi, Dr.. Veľká vďaka patrí odbornej konzultantke Mgr. Lucií Melounkovej za priateľský prístup, ochotu vždy pomôcť a hlavne veľkú trpezlivosť počas trvania celého experimentu. Poďakovanie patrí aj Katedre obecnej a anorganickej chémie Univerzity Pardubice za poskytnuté zlúčeniny a Ústavu lekárske biochemie LF v Hradci Králové za pracovné prostredie po celú dobu experimentu.

V poslednom rade chcem veľmi poďakovať svojej rodine a priateľom za obrovskú podporu, trpezlivosť a pomoc počas celého štúdia

ANOTÁCIA

Bakalárska práca obsahuje teoretickú časť v ktorej je zahrnutá teória o vanáde, zlúčeninách vanádu, vanadocenových komplexoch a mechanizmoch antitumorovej aktivity vanádu. V experimentálnej časti je uvedené testovanie cytotoxickej aktivity 10 vanadocen dithiokarbamátových komplexov na nádorovej línii buniek MOLT-4, pomocou stanovenia polovičnej inhibičnej koncentrácie (IC_{50}). Najaktívnejšími testovanými komplexmi boli zlúčeniny s chelátovo viazaným piperidindithiokarbamátom (**4, 9**) u ktorých bola hodnota IC_{50} v rozmedzí 0,9 - 1,0 $\mu\text{mol/l}$.

KLÍČOVÉ SLOVÁ: rakovina, cytotoxicita, vanád, vanadocénové komplexy, WST-1

NÁZEV

Hodnocení biologického účinku vanadocen dithiokarbamátových komplexů na linii buněk akutní lymfoblastické leukémie

ANOTACE

Bakalářská práce obsahuje teoretickou část, ve které je zahrnuta teorie o vanadu, sloučeninách vanadu, vanadocenových komplexech a mechanismu antitumorové aktivity vanadu. V experimentální části je uvedené testování cytotoxické aktivity 10 vanadocen dithiokarbamátových komplexů na nádorové línii buněk MOLT-4, za pomoci stanovení poloviční inhibiční koncentrace (IC_{50}). Nejaktivnějšími testovanými komplexy byli sloučeniny s chelátově vázaným piperidindithiokarbamátem (**4, 9**) u kterých byla hodnota IC_{50} v rozmezí 0,9 - 1,0 $\mu\text{mol/l}$.

KLÍČOVÉ SLOVA: rakovina, cytotoxicita, vanad, vanadocénové komplexy, WST-1

TITLE

Evaluation of biological effect of vanadocene dithiocarbamate complexes on the cell line acute lymphoblastic leukemia

ANNOTATION

The bachelor thesis contains a theoretical part in which is included the theory of vanadium, vanadium compounds, vanadocene complexes and mechanisms of vanadium antitumor activity. The theoretical part is followed by an experimental part, which describe the testing of the cytotoxic activity of vanadocene dithiocarbamate complexes on tumor cell line the MOLT-4 by determining the half inhibitory concentration (IC_{50}) in selected 10 complexes. The most potent test complexes were chelate-bound piperidinedithiocarbamate (**4**, **9**) whose IC_{50} was in the range of 0.9 - 1.0 $\mu\text{mol /l}$.

KEY WORDS: cancer, cytotoxicity, vanadium, vanadocene complexes, WST-1

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČASŤ	16
1.1 VANÁD	16
1.2 PEROXOKOMPLEXY VANÁDU	17
1.3 VANADYLOVÉ KOMPLEXY	18
1.4 VANADOCENOVÉ KOMPLEXY	21
1.5 MECHANIZMUS ANTITUMOROVEJ AKTIVITY ZLÚČENIN VANÁDU.....	24
1.5.1 Ovplyvnenie metabolizmu pomocou vanádu	24
1.5.2 Ovplyvnenie bunkového cyklu	26
1.5.3 Regulácia apoptózy	27
1.5.4 Zameranie na fenotyp kmeňových buniek	27
1.5.5 Regulácia autofágie.....	28
1.5.6 Regulácia mikroRNA	29
1.5.7 Molekulárny mechanizmus inhibície EMT	30
2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
2.1 POMÔCKY A PRÍSTROJE	31
2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	31
2.3 BUNKOVÁ LÍNIA MOLT-4 A KULTIVÁCIA	34
2.4 STANOVENIE POČTU BUNIEK	34
2.5 PRÍPRAVA ROZTOKOV	35
2.5.1 Príprava roztoku A.....	36
2.5.2 Príprava roztoku B	36
2.6 PRÍPRAVA MIKROTITRAČNEJ DOŠTIČKY	36
2.7 INKUBÁCIA	36
2.8 DETEKCIA	37
2.9 VYHODNOTENIE.....	37
2.10 STANOVENIE CYTOTOXICITY DIMETHYLSULFOXIDU	39
3 VÝSLEDKY A DISKUSIA	41
4 ZÁVER	51
5 POUŽITÁ LITERATURA	52

6	ZDROJE OBRÁZKOV	60
----------	------------------------------	-----------

Zoznam obrázkov, grafov a tabuliek

Obrázky

Obrázok č. 1: Shématická štruktúra VOchrys.	20
Obrázok č. 2: Štruktúrne vzorce cis-DDP a vanadocén dichloridu.	21
Obrázok č. 3: Derivátová zlúčeniny bis-[γ^5 - (p-metoxybenzyl) cyklopentadienyl] titánu (Titanocen Y).	23
Obrázok č. 4: Warburg efekt. Porovnanie glykolýzy v zdravej bunke a v rakovinnej bunke a využitie vanádu v inhibícii tvorby laktátu v rakovinnej bunke.	25
Obrázok č. 5: Bunkový cyklus eukaryotnej bunky zložený z po sebe idúcej interfázi a M-fázi, ktorý prebieha 24 hodín.	27
Obrázok č. 6: Zobrazenie mriežky v Bürkerovej komôrky (Časť 1). Rozmery jedného štvorca v ktorom sú počítané bunky MOLT-4 (Časť 2). Červene vyznačené pravidlo dvoch strán pre počítanie buniek v jednom štvorci (Časť 3).	35
Obrázok č. 7: Štruktúrny vzorec vanadocén dithiokarbamátu s príslušnými ligandmi, ktoré prináležia komplexom skupiny č. 1.	41
Obrázok č. 8: Štruktúrny vzorec dimethylvanadocén dithiokarbamátu s príslušnými ligandmi, prináležiacimi komplexom skupiny č. 2.	43

Grafy

Graf č. 1: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 1.	45
Graf č. 2: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 2.	45
Graf č. 3: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 3.	46
Graf č. 4: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 4.	46
Graf č. 5: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 5.	47
Graf č. 6: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 6.	47
Graf č. 7: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 7.	48
Graf č. 8: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 8.	48
Graf č. 9: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 9.	49

Graf č. 10: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 10.49

Graf 11: Graf závislosti životaschopnosti (%) buniek MOLT-4 na koncentrácií DMSO (%). 50

Tabuľky

Tabuľka 1: Prehľad usporiadania 10 testovaných vanadocén dithiokarbamátových komplexov.
.....32

Tabuľka 2: Mikrotitračná doštička s 96 jamkami rozdelená číselne do stĺpcov a abecedne do riadkov.38

Tabuľka 3: Tabuľka jednotlivých pipetovaných objemov roztokov A a B a kultivačného média (KM) príslušiacich koncentráciám od 0,1 - 50 $\mu\text{mol/l}$38

Tabuľka 4: Tabuľka rozloženia koncentračnej rady (hmot. %) pre testovanie účinku dimethylsulfoxidu na bunečnú líniu MOLT-4.....40

Tabuľka 5: Tabuľka pipetovaných objemov roztokov A a B a kultivačného média (KM) príslušiacich koncentráciám od 0,01 - 4 hmot. %.....40

Tabuľka 6: Výsledky cytostatickej aktivity testovaných komplexov skupiny č. 1 (komplexy 1-5) pomocou hodnoty IC_{50} u bunečnej línie MOLT-4.42

Tabuľka 7: Výsledky cytostatickej aktivity testovaných komplexov skupiny č. 2 (komplexy 6-10) pomocou hodnoty IC_{50} u bunečnej línie MOLT-4.43

Zoznam použitých skratiek

ATP	adenosintrifosfatáza
Bipy	bipyridin
<i>Cis</i> -DDP	cis-diamin dichlorplatnatý komplex
CLU	klastrín
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EMT	epiteliálny mesenchymálny prechod
EPR	elektrónová paramagnetická rezonancia
ERK	extracelulárne regulovaná kináza
FBS	fetálne tel'acie sérum
GK	glukokináza
IC ₅₀	polovičná inhibičná koncentrácia
HCC	ľudský hepatocelulárny karcinóm
HO-1	oxygenáza hemu 1
IMDM	Iskova modifikácia Dulbeccovho média
iPSC	indukovaná pluripotentná kmeňová bunka
MMP-2	metaloproteinázy-2
mRNA	messengerová RNA
NF-κB	z ang. Nuclear faktor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	negatívna kontrola
NMR	nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia
Oda	oxodiacetát
PBS	sterilný fosfátový pufr

Phen	fenantrolin
PK	pozitívna kontrola
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktívne formy kyslíka
SHZ	sulfonylhydrazón
VOchrys	chrysin
WST-1	[2-(4-jodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disuldophenyl)-2H]-tetrazoliová sodná soľ

ÚVOD

Rakovina bola a stále je považovaná za jednu z najviac fatálnych chorôb na celom svete. Liečba rakoviny vyžaduje hlbokú znalosť procesov iniciúcich a rozvíjajúcich chemické a biologické fenotypy choroby. Znaký rakoviny obsahujú sedem biologických rysov: udržanie proliferatívnej aktivity, vyhýbanie sa rastovým supresorom, odolávanie bunečnej smrti, umožňujúca repliková nesmrteľnosť, vyvolávajúce angiogézu, preprogramovanie energetického metabolizmu a vyhýbanie sa poškodeniu imunity.¹

Použitie liečiv na bázi kovu k liečbe rakoviny je spojené predovšetkým s protirakovinnými účinkami platinových zlúčenín.

Už koncom 70. rokov bol do klinickej praxi zavedený *cis*-diamindichloroplatnatý komplex, označený ako *cis*-platina (*cis*-DDP). Liečba pomocou *cis*-DDP je vysoko účinná u rôznych typov tumoru, je avšak spojená s mnohými nepriaznivými vedľajšími účinkami (myelotoxicita, nefrotoxicita, teratogenita a atď.) a postupne získanou rezistenciou. To viedlo k hľadaniu nových cytostaticky aktívnych zlúčenín.¹

Na jednej strane boli do klinickej praxe zavedené platinové komplexy druhej a tretej generácie s nižšou orgánovou toxicitou. Na druhej strane boli hľadané nové neplatinové cytostatika.¹

Zlúčeniny vanádu vďaka svojim rôznym oxidačným stavom a veľkej všestrannosti koordinačnej sféry okolo centrálného atómu kovu, sú v súčasnosti študované aj z hľadiska farmakologického využitia.

Bolo preukázané, že zlúčeniny vanádu pri svojej nízkej toxicite vykazujú antidiabetické, kardiovaskulárne, antikarcinogénne, proapoptické a ďalšie účinky.¹

Bakalárska práca má za cieľ stanoviť cytostatické účinky novo syntetizovaných vanadocén dithiokarbamátových komplexov na bunečnej línii T-lymfoblastickej leukémie MOLT-4.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 VANÁD

Vanád je kovový prvok s veľkým fyziologickým, farmakologickým, environmentálnym a priemyselným významom. Jeho prítomnosť v abiotickom ako aj biologickom systéme, v morskom a suchozemskom prostredí bola študovaná v priebehu rokov.² Pomerne náročné je vymedziť presnú úlohu vanádu v mechanických schémach jeho interakciách a ešte náročnejšie je vysvetliť komplexnú vodnú chémiu vanádu s jeho biologickými cieľmi a jeho špecifickými biologickými úlohami.²

Z tohto dôvodu rozmanitosť chémie vanádu vo vodných roztokoch zahŕňa:

- a) rôzne oxidačné stavy pre kovový ión,
- b) chemickú podobnosť vanádov V^V s fosfátom,
- c) schopnosť vanádu vytvoriť polyoxovanadičnany,
- d) schopnosť vanádu tvoriť komplexy s mnohými molekulami biologického významu, ako napríklad s ATP, ribózou, glutatiónom a aminokyselinami,
- e) dispozícia vanádu dosiahnuť rôznej koordinačnej geometrie pri väzbe ku substrátu.¹

Ako taký chemicky všestranný kovový ión, vanád podporuje širokú škálu chemických látok v závislosti od ich oxidačného stavu, elektrickej a sterickéj povahy koordinujúcich ligandov.¹

Z pohľadu koordinačnej chémie je vanád pozoruhodne flexibilný. Vanád môže tvoriť koordinačné komplexy v geometriách od tetraedrálnej a oktaedrálnej, po trigonálnu a pentagonálnu bipyramidu.³

Kovové ióny regulujú obrovské množstvo základných bunčných procesov s vysokou špecifickosťou a selektivitou. Schopnosť niektorých kovových iónov predísť a liečiť rakovinu u ľudí je známe už s včasnými dokumentovanými prípadmi z 16. storočia.⁴

Rôzne mocenstvá vanádu vykazujú odlišné vlastnosti ako aj odlišné účinky. Z biologického hľadiska sú najzaujímavejšie a zároveň najstabilnejšie vyššie oxidačné stavy vanádu, mocenstvá V^{IV} a V^V s kationovými a aniónovými komplexmi, ktoré vznikajú vo fyziologickom rozsahu pH 2-8.⁵

Vzhľadom na skutočnosť, že návrhy protinádorovej aktivity vanádu boli založené predovšetkým na anorganických formách tohto prvku, bola veľká snaha navrhnúť a syntetizovať nové formy charakterizované rozpustnosťou, biologickou dostupnosťou a protinádorovou aktivitou. V tomto ohľade, syntetická bioanorganická chémia bola v popredí pozornosti keď vanád vhodne konfigurovala tak, aby spĺňal požiadavky selektívneho, špecifického a účinného metallofarmaka na potlačenie nádoru.¹

Už pred 50 rokmi bol prvý pokus vo využívaní farmakologického potenciálu vanádu v protinádorovej liečbe. Hlavné výhody využitia zlúčenín vanádu boli v zabránení pravidelného opotrebovania podstatných kritických faktorov biomolekúl buniek, ako sú DNA, proteíny súvisiace s RNA atď.¹

1.2 PEROXOKOMPLEXY VANÁDU

Ako sľubný plán vývoja metallofarmák na báze vanádu proti rakovine, sa javilo použitie V^V peroxidových zlúčenín v binárnych a ternárnych kombináciách s vhodnými substrátmi. Na tento účel bolo niekoľko V^V peroxidových zlúčenín navrhnutých a následne syntetizovaných ako potenciálne protirakovinové liečivo.¹

Zlúčeniny peroxidových komplexov V^V sú zaujímavé hlavne kvôli ich interakciám s katalytickými centrami v haloperoxidázových enzýmoch, ktoré sa nachádzajú v hubách a morských riasach a takisto kvôli ich účasti na stechiometrických a katalytických oxidáciách organických substrátov. Bolo zistené, že komplexy $K[VO(O_2)_2(\text{bipy})]\cdot 5H_2O$, $K_2[VO(O_2)_2(\text{pic})]\cdot 2H_2O$ a $K_2[VO(O_2)_2(3\text{-OHpic})]\cdot 3H_2O$ inhibujú fosfotyrozín fosfatázy, a preto môžu pôsobiť ako cytotoxické látky s osobitnou účinnosťou.⁶

Experimenty *in vitro* odhalili, že peroxidové komplexy V^V sa zdajú byť 100 až 1000 krát účinnejšie inhibítory fosfotyrozínov ako napr. vanadičnan sodný. Biologická aktivita týchto komplexov však nie je doteraz úplne jasná a ďalej je potrebné dané zlúčeniny skúmať. Nádej môže priniesť vysokoúčinná nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia, ktorá poskytuje prostriedky na získanie detailného pochopenia V^V oxidačného stavu, najmä vo vodnej fáze.¹

Okrem iného rôzne mocenstvá vanádu vykazujú odlišné, významné účinky, ktoré ako aj inhibujú funkciu širokého spektra enzýmov ako napríklad glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu, lipoproteínovú lipázu, tyrozínfosfatázu, glukózo-6-fosfát dehydrogenázu, glykogénsyntázu, adenylátcyklázu, cytochróm oxidáza, tak aj stimulujú funkciu ostatných

enzýmov ako Na⁺-K⁺-ATPázu, H⁺/K⁺-ATPázu, myozín ATPázu, dyneín, adenylát kinázu, fosfofruktokinázu, cholínesterázu.⁷

Farmakologický potenciál zlúčenín vanádu, ako metallofarmák sa pôvodne využíval pri liečbe diabetes mellitus. Kde väčšina vanádiových solí, ako je vanadičnan sodný alebo vanadylsulfát, sú podávané orálne pacientom s inzulínovou terapiou a poskytujú pomerne pozitívne výsledky.⁷

Treba spomenúť aj iné farmakologické aktivity vanádu pri liečbe patologických stavov, ako je antihyperlipidémia, antihypertenzia a zvýšenie afinity kyslíka.¹

1.3 VANADYLOVÉ KOMPLEXY

Zlúčeniny vanádu, nesúce organické ligandy, v ktorých sa oxidácia vanádu môže meniť od V^{III} do V^V. Vanadyl prejavuje cytostatickú aktivitu a potláča rast nádorových buniek *in vitro* a *in vivo*. Niektoré z vanadylových komplexov sú dobrým modelom pre štúdium metabolizmu, detoxikácie vanádu, lepšiu charakterizáciu a pochopenie štrukturálnych a elektronických charakteristík koordinačných sfér [V^{IV}O]²⁺ a [V^VO₂]⁺ *in vitro* a *in vivo*.⁸

Vo všetkých vanadyloch sa nachádzajú charakteristické štrukturálne znaky:

- vanadylové centrum,
- chelátor obsahujúci O, O alebo O, O, N, ktorý sa rozprestiera buď v ekvatoriálnej polohe alebo oboch ekvatoriálnych a axiálnych polohách v koordinačnej sfére vanádu,
- oktaendrálna koordinačná geometria vanádu,
- prítomnosť N, N-aromatického chelatoru, obsadzujúceho dve polohy v koordinačnej sfére vanádu,
- aromatický chelator podporujúci interkaláciu a tým zvyšujúci protinádorovú aktivitu vanádu.⁹

Medzi prvými štúdiami komplexu oxovanádu "vanadyl" bolo skúmanie anti-apoptotickej aktivity pomocou [VO(oda)(H₂O)₂] (oda = [O(CH₂COO)₂]²⁻) obsahujúcim sadu donorov ligandov (O, O, O).¹⁰ Súčasne vanadyl preukazuje inhibíciu apoptózy v malígnych gliómových bunkách.¹¹

Ďalšia štúdia skúmajúca protinádorovú aktivitu ternárnych vanadylových komplexoch, ako nap. [VO(oda)(H₂O)₂], [VO(oda)(bipy)]·H₂O, [VO(oda)(phen)]·1,5 H₂O

(oda = oxodiacetát), na MG-63 ľudskej bunecnej ľinii osteosarkómu vykazovala na koncentracií závislú inhibíciu životaschopnosti buniek.¹² Z daných troch vanadylových komplexov sa pomocou elektroforézy v agarózovom géle zistovala funkcia štiepenia DNA tzv. nukleázová aktivita. Komplex $[\text{VO}(\text{oda})(\text{phen})]\cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ vykazoval najvyššiu nukleázovú aktivitu zatiaľ čo $[\text{VO}(\text{oda})(\text{H}_2\text{O})_2]$ a $[\text{VO}(\text{oda})(\text{bipy})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ vykazovali obdobnú nukleázovú aktivitu. Dobrý vzťah medzi bioaktivitou zlúčenin a ich štruktúrami dokazoval komplex $[\text{VO}(\text{oda})(\text{phen})]\cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$, ktorý vykazoval najsilnejšiu protinádorovú aktivitu v bunkách osteosarkómu spomedzi 3 testovaných komplexov. Druhý najsilnejší komplex v súlade s charakterom prítomných heterocyklických skupín bol $[\text{VO}(\text{oda})(\text{bipy})]\cdot \text{H}_2\text{O}$ a následne $[\text{VO}(\text{oda})(\text{H}_2\text{O})_2]$.¹

V skutočnosti môže interkalácia taktiež prispieť k rastu reaktivity a to deformáciou dvojitého helixu DNA, čím sa DNA stane náchylnejšia na útok. Phen je dobrý interkalátor DNA a zvyšuje reaktivitu $[\text{VO}(\text{oda})(\text{H}_2\text{O})_2]$ smerom k DNA. Vlastnosti interkalátoru fenantrolinu konfigurujú svoje komplexy vanádu smerom k účinnejšiemu štiepeniu DNA na rozdiel od ekvivalentných komplexov s bipyridinom. Očakávalo by sa, že bipyridin umožní určitú úroveň interkalácie, ktorá by následne zvýšila nukleázovú aktivitu avšak výsledky danú skutočnosť nedokazujú.¹

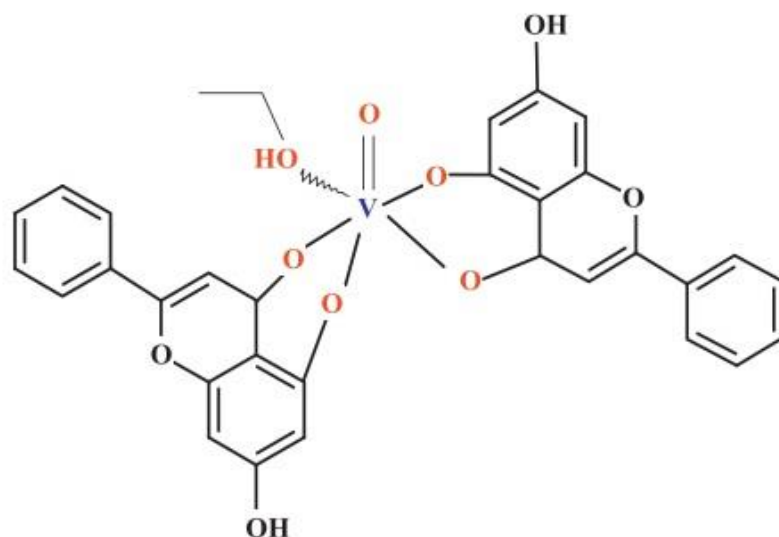
V prípade 15 vanadylových komplexov sa pri hodnotení cytostatickej aktivity ukázali bis-chelátované zlúčeniny aktívnejšie ako mono-chelátované. Ďalej bolo zistené, že prítomný substituent chelátujúceho ligandu je dôležitý pre biologický účinok vanadylových zlúčenin.¹

Mechanizmus aktivity vanádu je teda ovplyvnený bis-, mono- chelátáciou, prítomnosťou aromatických interkalátorov v koordinácii sfér vanádu a takisto rigiditou a pružnosťou v štruktúre interkalátoru.¹

Veľká rodina vanadylových druhov tiež zahŕňa organické zlúčeniny ako napríklad flavonoidy.¹³

Flavonoidy sú prirodzene sa vyskytujúce polyfenolické zlúčeniny široko rozšírené v rastlinnej ríši. Flavonoidy majú veľký antialergický, antivírusový, protizápalový a protinádorový potenciál ako na zvieratá tak aj na ľudí. Ich liečivé aplikácie sú spojené s ich antioxidantnými a cytoprotektívnymi vlastnosťami, ako je to vidieť v prípade vanádovej zlúčeniny $[\text{VO}(\text{chryzín})_2 (\text{EtOH})_2]$ (VOchrys).

Chrysin (obrázok č. 1) je prirodzene sa vyskytujúci flavonoid extrahovaný z mučenky modrej a z včelieho plástu.¹⁴ Štúdie cytotoxicity a genotoxicity preukázali účinok závislý od koncentrácie. Reaktívne formy kyslíka (ROS) podčiarkujú hlavný mechanizmus činnosti VOchrys. Fyziologické vlastnosti flavonoidov sú zosilnené pri komplexácii s kovovým centrom.¹⁴



Obrázok č. 1: Šématická štruktúra VOchrys.¹

Štruktúrne charakteristiky v tejto skupine zlúčenín zahŕňajú:

- oktaedrickú koordinačnú sféru vanadu V^{IV} ,
- celkovú kyslíkovú koordinačnú sféru vanádu,
- tuhú štruktúru bis chelatačného ligandu viazaného na vanadylové centrum.

Medzi najlepšie vanadylové flavonoidy s protinádorovým a antioxidačným účinkom patria komplexy obsahujúce silibinin a quercetin. Silibinin alebo silybín (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(S)-(4-hydroxy-3metoxyfenyl)-2-(S)benzodioxín-6-yl]chromán-4-ón) je hlavnou zložkou silymarínu, ktorý je extrahovaný z pestrecu marianskeho.¹⁵

1.4 VANADOCENOVÉ KOMPLEXY

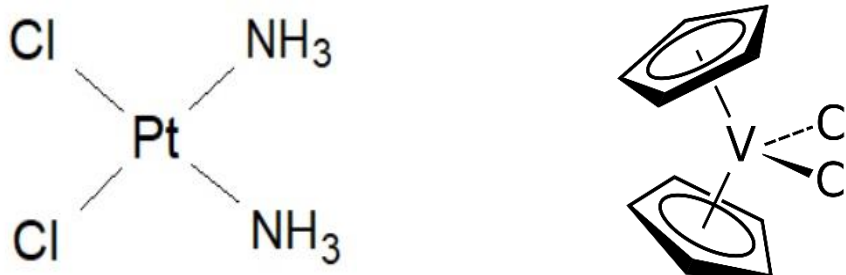
Vanadocén je organokovová (metalloceňová) zlúčenina s kovovým iónom, vloženým medzi dva cyklopentadienylové kruhy. V tuhom stave má molekula D_{5d} symetriu s V^{II} stredom umiestneným v rovnakej vzdialenosti medzi stredmi obidvoch cyklopentadienylových kruhov.

Štúdie *in vitro* a *in vivo* ukázali, že V^{IV} organokovové zlúčeniny vykazujú významné protinádorové vlastnosti, pričom najľubnejším z metallocenov je najjednoduchší derivát vanadocénu a to vanadocén dichlorid.¹⁶ Už v roku 1979 vanadocén dichlorid [VCp_2Cl_2] bol zoširoka študovaný v predklinických testoch proti zvieracím a ľudským rakovinovým bunecným líniám.

Vanadocén dichlorid by mohol fungovať podobným spôsobom, ktorý je porovnateľný s dobre zavedeným protirakovinovým cytostatikom *cis*-DDP (obrázok č. 2). Avšak v testoch bola zistená výrazná odlišnosť vanadocénových komplexov od alkylačného cytostatika *cis*-DDP.¹⁷ Aktivácia apoptózy vanadocénovými zlúčeninami je veľmi podobná s proapoptotickým mechanizmom používaným *cis*-DDP a to v spustení primárneho poškodenia DNA a indukcie expsie proteínu p53.¹⁷

Proteín p53 je tumor supresorový proteín, ktorého úloha je v indukcii apoptózy, v kontrole bunecného cyklu, v udržiavaní genomickej stability a je považovaný za "strážcu genómu".¹

Dôležitá cytotoxická aktivita bola pozorovaná v metoxy-substituovaných vanadocén dichloridoch voči bunkám T-lymfoblastickej leukémie MOLT-4.¹⁷ Vzhľadom na to, že vanadocén dichlorid podlieha podobným hydrolytickým reakciám, ako *cis*-DDP, je možné predpokladať porovnateľný spôsob účinku, pričom vanadocén dichlorid (obrázok č. 2) je štvorhranný na rozdiel od štvorcovej rovinnej geometrií komplexu *cis*-DDP.¹⁷



Obrázok č. 2: Štruktúrne vzorce *cis*-DDP a vanadocén dichloridu.

V porovnaní so štyrmi ďalšími metallocénovými dichloridmi (titán, zirkón, molybdén, a hafnium), V^{IV} metallocény boli najsilnejšie cytotoxické zlúčeniny pri testovaní proti ľudskej rakovine semenníkov. S výnimkou titanocénu, molybdenocénu a vanadocénu, všetky iné deriváty metallocénov neboli buď testované, alebo nepreukázali významnú použiteľnosť v boji proti rakovine.¹

Vo väčšine prípadov sú deriváty vanadocénu aktívnejšie než ich zodpovedajúce analógy titanocénu. Zlúčeniny inhibujú rast rôznych rakovinových bunčných línií a rast solídnych nádorov *in vivo*.¹

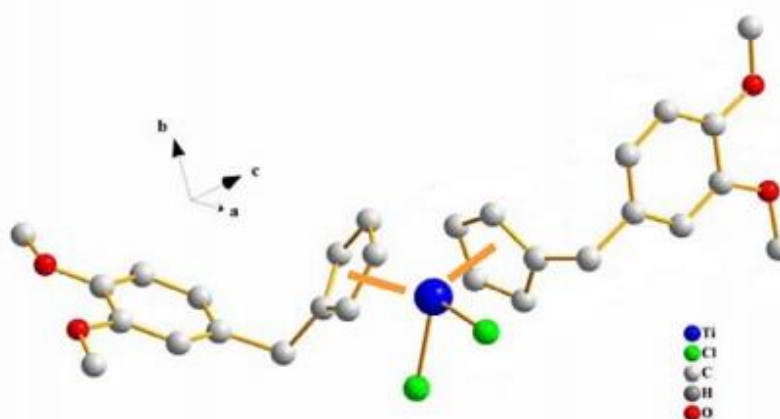
Vanadocén dichlorid, aktívny fragment, ktorý prežíva v biologických médiach, vykazuje protinádorové a antiproliferatívne vlastnosti *in vitro* a *in vivo*, predovšetkým prostredníctvom schopnosti oxidačného poškodenia DNA.¹⁸ Súčasne dochádza k inhibícii tyrozín fosfatázy a tým k zvýšeniu fosforylácie tyrozínových zvyškov v proteínoch, čo aktivuje signál transdukčnej cesty vedúcej k apoptóze alebo aktivácii nádor supresorových génov.¹⁸

Poškodenie DNA, indukované rakovinovými bunkami, bolo implicitne jedným z prvých účinkov vanadocénu na rakovinu bez poškodenia susedných zdravých buniek. Komplexy vanadocénu obsahujúce fenantrolínové ligandy sú sľubné cytotoxické komplexy, najmä kvôli ich vysokej cytotoxicite, vysokej rozpustnosti vo vode a stabilite v kultivačnom médiu.²² Ich cytotoxické vlastnosti sa ľahko modifikujú nahradením chelátového ligandu. Substitúcia cyklopentadienylového kruhu má len malý účinok na cytotoxicitu.¹

Napriek tomu je pravdepodobné, že zavedenie substituentov na funkčné skupiny môže mať ďalšie výhody, ako v prípade s rôznymi metallocénmi. Vysoká aktivita fenantrolínových zlúčenín dokazuje, že stabilizácia vanadocénov prostredníctvom substitúcie chloridov môžu viesť k významnému zlepšeniu ich cytotoxických účinkov.¹

Farmakologické účinky zlúčenín vanádu tiež zahŕňajú inhibíciu rastu nádoru a profylaxiu proti karcinogézií. Na tento účel je dôležitý nielen redoxný stav vanádu, ale aj špecifická povaha organického ligandu, napríklad substitúcia kruhu, a väzbová afinita vanádu, ktorá tiež ovplyvňuje anti-neoplastický potenciál jednotlivých zlúčenín V^{IV}.¹⁹

V tomto ohľade bola študovaná protinádorová aktivita po zavedení modelov benzyl substituovaných vanadocénov vrátane komplexu dichloridu bis[γ^5 -(2-methoxybenzyl)cyclopentadienyl]-vanadičitého, bis[γ^5 -(3,4-dimethoxybenzyl)cyclopentadienyl]-vanadičitého, dichloridu bis[γ^5 -(3,4,5-trimethoxybenzyl)cyclopentadienyl]-vanadičitého a dichloridu bis- [γ^5 - (p-metoxibenzyl) cyklopentadienyl] titáničitého (Titanocen Y) a jeho derivátovej zlúčeniny.¹⁹ (obrázok č. 3)



Obrázok č. 3: Derivátová zlúčeniny bis- [γ^5 - (p-metoxibenzyl) cyklopentadienyl] titánu (Titanocen Y). Prevzaté a upravené.^{II}

Tri druhy vanadocénu, ktoré boli charakterizované röntgenovou kryštalografiou a EPR spektroskopiou, vykazovali mierne lepšiu aktivitu než *cis*-DDP v rakovinových bunčných líniách.¹⁹

V ďalšej štúdií cytotoxicity a aktivity voči rakovine semenníkov, 5 metallocenových dichloridov (vanadocén, titanocén, zirkonocén, molybdocén, hafnocéndichlorid) a ďalších 19 komplexov vanadocénu vrátane iných [VCp₂(OCN)Cl] ukázali, že dithiokyanát [VCp₂(SCN)₂] \cdot 0,5 H₂O a [VCp₂(NCSe)₂] deriváty diselenokyanátov nesúce pomocné ligandy boli najsilnejšie cytotoxické látky.

1.5 MECHANIZMUS ANTITUMOROVEJ AKTIVITY ZLÚČENIN VANÁDU

Počas posledných desaťročí boli široko študované protinádorové účinky vanádu. Bolo preukázané, že vanád potláča rast a šírenie nádorov tým, že inhibuje proliferáciu nádorových buniek, vyvoláva apoptózu a obmedzuje metastázový potenciál neoplastických buniek. Úloha vanádu zahŕňajúca bunkové procesy v molekulárnych procesoch vo fyziológii rakoviny je rozhodujúca pre rozvoj efektívnych liečiv obsahujúcich vanád. Z tohto dôvodu si zaslúži byť skúmaná presná úloha a mechanizmus účinku vanádu v existujúcich súčasných rakovinových terapeutikách.¹

1.5.1 Oplyvnenie metabolizmu pomocou vanádu

Schopnosť vanádu zmeniť metabolizmus rakovinových buniek bola preukázaná v nedávnej štúdií na diabetických potkanoch. Liečba chlorodipicolinátovými komplexmi vanádu preukázala významné zlepšenie bunkového metabolizmu, glukózovej intolerancie ako aj zvýšenie syntézy hepatického glykogénu u diabetických potkanov na ktorých bola komplexná liečba testovaná.²⁰ Hladina mRNA v kľúčových metabolických glykolytických enzýmoch v pečeni, akými boli fosfoenolpyruvát karboxykináza, glukokináza a L-pyruvát kináza, bola zmenená v diabetických zvieratách.²⁰ Hladiny mRNA sa výrazne obnovili smerom k fyziologickým hodnotám pomocou liečby zlúčeninami vanádu.²⁰

Liečba diabetických potkanov so zlúčeninami $[V^{IV}O(\text{chlorpicolinato})(\text{H}_2\text{O})_2]$ a $[V^VO_2(\text{chlorodipicolinato})]$ významne redukovala produkciu malondialdehydu a zvýšila aktivitu glutatiónperoxidázy a katalázy.²⁰ Zlúčeniny vanádu podporujú syntézu metabolického glykogénu a obnovujú potlačenú glykolýzu v pečeni diabetických potkanov, vďaka ich schopnosti znížiť oxidačný stres stimuláciou antioxidačných enzýmov.²¹

1.5.1.1 Warburgov efekt

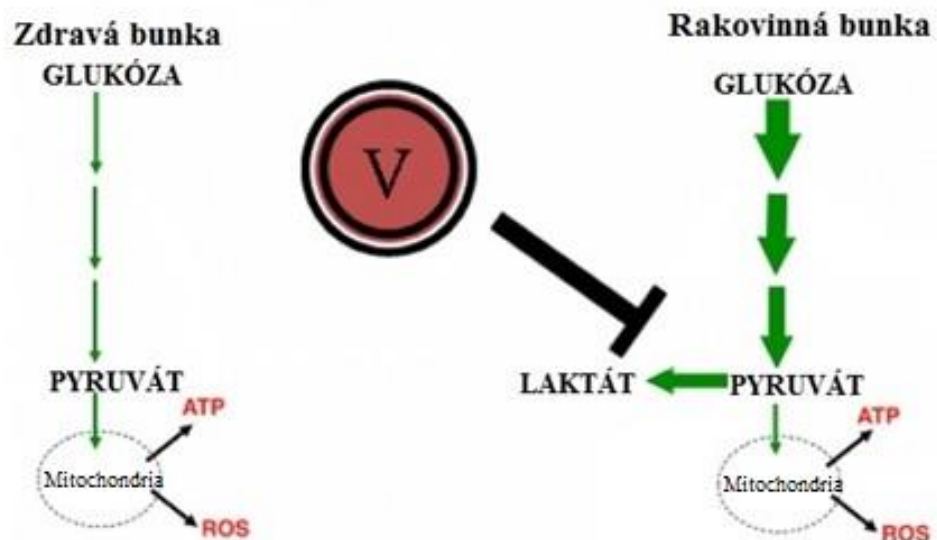
Ako Warburgov efekt je označovaný špecifický metabolický mechanizmus, popísaný prvýkrát Ottom Warburgom v roku 1931, ktorý je založený na princípe, že nádorové bunky na rozdiel od zdravých buniek, preferujú anaeróbnú glykolýzu.¹

V zdravých bunkách, preferujúcich aerobnú glykolýzu, sa glukóza metabolizuje na pyruvát pomocou glykolýzy. Glukóza-6-fosfát je vstupnou látkou pre aerobnú glykolýzu, ktorá sa odohráva v mitochondriách. Pyruvát je v mitochondriách za spotreby kyslíka premenený na energiu, uloženú v ATP.

Rakovinné bunky na rozdiel od zdravého bunkového metabolizmu silne regulujú glykolýzu, príjem glukózy a prispievajú k zvýšeniu produkcie medziproduktov glykolytických metabolitov a pyruvátu (obrázok č. 4).¹ Rakovinné bunky metabolicky preferujú anaeróbnu glykolýzu čo znamená, že produktom metabolizmu glukózy je laktát (kyselina mliečna).

Rakovinné bunky dramaticky zvyšujú príjem glukózy a tým zvyšujú glykolýzu. Následný produkt glykolýzy je pyruvát, ktorý je prednostne premenený na laktát, čo prispieva k jeho zvýšenej produkcii. Laktát dokáže odštiepiť vodíkový kation a tým znížiť pH, čo zvyšuje kyslosť tkanív a hlavne zvyšuje kyslosť nádorov. Nádorové bunky vyžadujú pre svoje prežitie a ďalší rast kyslé prostredie.¹

Anaeróbná glykolýza rakovinných buniek sa prejavuje metabolickými zmenami na úrovni celého organizmu, čo značí výrazný nárast spotreby glukózy, zníženie produkcie energie, zníženie pH, prekyslenie organizmu a atď. Vďaka týmto skutočnostiam je Warburg efekt rozšíreným a charakteristickým znakom nádorových ochorení. Využitie vanádu (V) vo Warburgovom efekte sa uplatnilo predovšetkým v inhibícii tvorby laktátu z pyruvátu v rakovinej bunke, čo má za následok zníženú kyslosť nádoru, čo znižuje jeho životaschopnosť.¹



Obrázok č. 4: Warburg efekt. Porovnanie glykolýzy v zdravej bunke a v rakovinej bunke a využitie vanádu v inhibícii tvorby laktátu v rakovinej bunke. Prevzaté a upravené.^{III}

1.5.2 Oplyvnenie bunkového cyklu

Bunkový cyklus (obrázok č. 5) sa skladá z metabolicky aktívnej, dlhej interfázy a mitotickej fázy (M-fáza). Interfáza trvá 95 % času bunkového cyklu a delí sa na G1 fázu tzv. postmitotickú, v ktorej bunka zdvojuje dvojnásobok objemu, syntetizuje RNA a proteíny, vytvára zásobu nukleotidov, čím zväčšuje svoj objem.²²

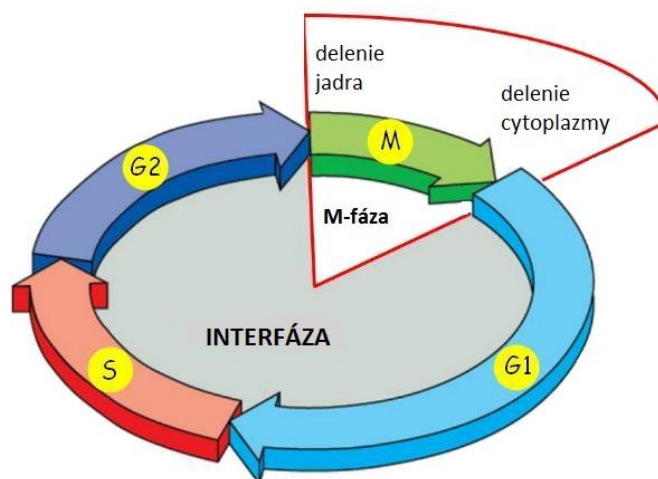
Na začiatku G1 fázy sa nachádza kontrolný bod v ktorom prebehne kontrola extracelulárneho prostredia, kontrola veľkosti bunky a taktiež oprava poškodenej DNA.²³

Bunka po kontrole prechádza do S fázy, v ktorej dochádza k replikácii DNA. Posledná fáza interfázy je G2 fáza, v ktorej nastáva syntéza a aktivácia proteínov, potrebných k mitóze a dokončenie duplikácie centriol. V tejto fáze sa objavuje ďalší kontrolný bod, ktorý kontroluje správnu replikáciu DNA a bunkový objem. Postupná kondenzácia chromozómov, ktoré boli zreplikované v S-fáze, určuje koniec G2-fázy a začiatok M-fázy.²³

Po interfáze nasleduje mitotická fáza, ktorá zaberá približne 5 % času bunkového cyklu a obsahuje profázu, premetafázu, metafázu, anafázu, telofázu a cytokinézu. Nenádorová bunka následne vstupuje do kludovej G0 fázy, kde zotrva rôzne dlhú dobu. U buniek nádorových je G0 fáza obmedzená na veľmi krátku dobu, alebo je úplne preskočená.²²

Štúdie zistili schopnosť vanadylových komplexov zastaviť bunkový cyklus bunkových línií ľudského hepatómu BEL-7402, HUH-7 a HepG2 práve vo fáze G0/G1 a taktiež významne znížiť mitochondriálny membránový potenciál, čo vo výsledku spôsobuje depolarizáciu mitochondriálnej membrány na bunkových líniách ľudského hepatómu.¹

Takisto sa prvýkrát ukázala účinnosť vanadičnanu sodného v potlačení proliferácie, ktorá indukuje zastavenie G2/M fázy bunkového cyklu, indukuje apoptózu, a znižuje potenciál mitochondriálnej membrány HCC buniek *in vitro*. Okrem toho výsledky *in vitro* ukázali, že vanadičnan sodný vykazuje na koncentrácií závislú inhibíciu rastu ľudských HCC buniek v ortotopickom modeli, čo dokazuje zníženie veľkosti nádoru, indexu proliferácie a zvýšenie bunkovej apoptózy.²⁴



Obrázok č. 5: Bunkový cyklus eukaryotnej bunky zložený z po sebe idúcej interfázy a M-fázy, ktorý prebieha 24 hodín. Prevzaté a upravené.^{IV}

1.5.3 Regulácia apoptózy

Apoptóza je forma fyziologickej bunkovej smrti, tzv. programovaná smrť bunky, ktorá sa vyznačuje kondenzáciou a následnou fragmentáciou bunkového jadra bez toho aby došlo k porušeniu plazmatickej membrány a aktivácií imunitného systému.

Jednou z hlavných charakteristík vanádu je jeho schopnosť aktivovať apoptické mechanizmy v malígnych bunkách prostredníctvom up-regulácie proapoptických proteínov.²⁵

Nedávne štúdie odhalili schopnosť vanadylových komplexov zvyšovať hladiny ROS a podieľať sa na nepriaznivých účinkoch na bunkách osteosarkómu a to pomocou znižovania pomeru redukovaného glutatiónu k oxidovanému glutatiónu. Okrem iného komplexy spôsobujú zastavenie bunkového cyklu a aktivovanie kaspázy-3, čo spôsobuje apoptózu u bunkovej línie odvodenej od osteosarkómu MG-63.²⁵

Pri podpore apoptózy rakovinových buniek, zlúčeniny vanádu preukázateľne indukujú apoptózu neurónov pomocou expresie kaspázy-3, Bax, Bcl-2, ktoré významne regulujú indukciu apoptózy, a tým zohrávajú dôležitú úlohu pri apoptóze neurónov indukovanej V^V.²⁶

1.5.4 Zameranie na fenotyp kmeňových buniek

Ďalšou novou charakteristikou zlúčenín vanádu je jeho schopnosť modulovať diferenciáciu kmeňových buniek.²⁷

V nedávnej štúdií bolo dokázané, že diferenciáciu osteoblastov reguluje práve oxid *N,N* bis(salicylidén)-*o*-phenylenediamine vanádičitý komplex.

Zdá sa, že V^{IV} podporuje diferenciáciu a mineralizáciu mezenchymálnych kmeňových buniek prostredníctvom aktivácie signalizačnej dráhy extracelulárne regulovanej kinázy (ERK) a následné rozšírenie NF-κB (z ang. Nuclear faktor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Okrem toho sa preukázalo, že ERK sa podieľa na zvyšovaní transkripčnej aktivity NF-κB. Dá sa predpokladať, že V^{IV} ovplyvňuje ERK ako aj NF-κB cesty s cieľom stimulovať osteoblasty.²⁷

Podobne aj peroxovanadičnan, ktorý je inhibítor fosfotyrozín fosfatázy, indukuje myogénne bunky kvôli získaniu profilu génovej expresie a diferenciačného potenciálu. Diferenciačný potenciál je zhodný s fenotypom cirkulujúcich prekurzorov pri zachovaní ich myogénneho potenciálu.²⁸ Tieto účinky sú sprostredkované aspoň z časti aktiváciou NF-κB cez fosforyláciu Tyr42-IpB-alfa.²⁸

Nakoniec aj vanadičnan sodný je účinným zmiernujúcim prostriedkom, ktorý potláča akútny hematopoetický syndróm a minimalizuje škodlivé účinky (anematopoéza a oneskorené genotoxické účinky) a poškodenie hematopoetického systému u myší vyvolaného žiarením.²⁸

1.5.5 Regulácia autofágie

Autofágia je jedným z mechanizmov udržania bunkovej homeostázy, obecné povedané ide o lysozomálny rozklad proteínov.

Štúdie poukazujú na nové schopnosti vanádu modulovať proces autofágie. Anorganický vanadičnan sodný by mohol vyvolať apoptózu buniek a inhibíciu autofágie v ľudských bunkách HCC, súčasne *in vitro* a *in vivo*. Inhibícia autofágie výrazne podporuje apoptózu.²⁹ Na druhej strane rapamycín by mohol zvrátiť inhibíciu autofágie a zredukovať účinok vanadičnanu, ktorý indukuje apoptózu v bunkách HCC, *in vitro* aj *in vivo*.²⁹

Nanočastice oxidov vanádu (P-VO₂) vyvolávali up-reguláciu oxygenázy-1 hemu (HO-1), bunkového proteínu, ktorý zohrával dôležitú úlohu pri ochrane buniek proti smrti pri stresových situáciách. Inhibítor autofágie, 3-methyladenín, významne inhiboval HO-1 up-reguláciu a zvýšil rýchlosť bunkovej smrti v bunkách liečených P-VO₂.

Avšak inhibítor HO-1 protoporfyrín IX Zn^{II} (ZnPP) zvýšil výskyt bunkovej smrti v bunkách ošetrovaných P-VO₂, zatiaľ čo neprejavil žiaden vplyv na autofagickú odpoveď spôsobenú P-VO₂.³⁰

Na druhej strane Y₂O₃ nanokryštál, kontrolný nanomateriál, vyvoláva autofágiu podporujúcu smrť bez ovplyvnenia úrovne expzie HO-1.³⁰

Tieto výsledky predstavujú prvú správu o cytoprotektívnej autofágii vyvolanej novým nanomateriálom, pravdepodobne prostredníctvom up-regulácie HO-1. Táto skutočnosť môže poukázať na nové možnosti využitia nanomateriálu, ktorý indukuje autofágiu pre terapeutické aplikácie proti rakovine.³⁰

1.5.6 Regulácia mikroRNA

Nová oblasť liečby rakoviny zahŕňa záujem o mikroRNA (miRNA). MiRNA sú malé nekódujúce RNA, ktoré môžu regulovať a meniť expresiu génu post-transkripčne.

Väčšina miRNA sa zameriava na približne 80% kódovania proteínov mRNA a preto môžu byť považované za hlavné regulačné orgány viacerých bunkových dráh, čo prispieva k fine-tuning najdôležitejších bunkových procesov, ako je bunkový rast, proliferácia a diferenciácia.¹

Porucha regulácie miRNA hrá zásadnú úlohu v začiatku, progresii a šírení mnohých druhov rakoviny. Z tohto dôvodu je fatálne poškodenie biosyntézy miRNA v nádorovej kaskáde.¹

Staršie štúdie ukázali, že prítomnosť peroxido-vanádu so sulfonylhydrazónom-1 (SHZ) v rôznych koncentráciách pozitívne regulovali kardiomyogénnu expresiu mikroRNA a diferenciáciu kardiomyocytov v myších iPSC. SHZ, čo zlepšilo špecifickú markrovú expresiu a produkciu kardiomyocytov bez straty životaschopnosti buniek.³¹

Naproti tomu samotný peroxovanadičnan vykazoval zanedbateľný vplyv na rýchlosť diferenciácie kardiomyocytov a zdalo sa, že vyvoláva apoptózu závislú od kaspázy-3 pri diferenciácii iPSC. Okrem toho boli iPSC, ošetrované SHZ, schopné regulovať skorú a neskorú kardiomyogénnu expresiu miRNA (miR-1, miR-133a a miR-208a).³¹

Výsledky ukazujú, že malé molekuly, vrátane súboru rôznych foriem vanádu, by mohli predstavovať nové a klinicky uskutočniteľné stratégie na zlepšenie iPSC, ktoré sú odvodené zo srdečnej diferenciácie.³¹

Podrobné štúdie zamerané na vplyv dobre definovaných foriem vanádu a na mechanické vlastnosti interakcií spojených s vanádom v expresii miRNA v tumorogénnych procesoch zostávajú načrtnuté do budúcnosti.³¹

1.5.7 Molekulárny mechanizmus inhibície EMT

V poslednom desaťročí sa terapeutické stratégie vo farmakoterapii rakoviny zamerali na fenotyp nádorových buniek epiteliálneho mezenchymálneho prechodu (EMT).

Ako termín, EMT sa označuje proces, počas ktorého epiteliálne bunky strácajú svoju polarizovanú organizáciu a bunkovú adhéziu, podstupujú zmeny tvaru buniek a organizácie cytoskeletu a získavajú mezenchymálne vlastnosti, ako je zvýšená migrácia a invázia buniek.

Bolo preukázané, že vanád inhibuje adhéziu, migráciu a tvorbu kolónií UMR106 buniek osteosarkómu a výrazne inhibuje kľúčové udalosti šírenia nádorových buniek, bunkovej adhézie, migrácie a klonogenicity. Taktiež bola skúmaná úloha proteínkinázy A pri antikarcinogénnych vlastnostiach zlúčenín vanádu.³²

Ďalej liečba pediatrických gliómov nízkeho stupňa s bis[peroxido(pikolinato)] oxovanadičnanom (Bpv(pic)) odhaľuje významné zníženie životaschopnosti buniek v závislosti od dávky. Ako dôsledok zníženej proliferácie a dlhodobej indukcie zastavenia rastu a apoptózy. Bpv(pic) významne znižuje migráciu /inváziu buniek a je nezávislý od ukotvenia na mäkkej agaróze.³³

V bunkách funguje Bpv(pic) tým, že znižuje aktivitu CDC25A, znižuje expresiu proteínových tyrozín fosfatáz, opravu DNA génov, génov asociovaných s mikrotubulmi, ako sú PLK1, AURKA a HDAC6. Na druhej strane rozširuje expresiu proapoptotických mediátorov, ako sú BAK, AIFM a CTSL1.³³

2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

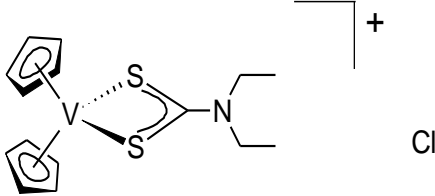
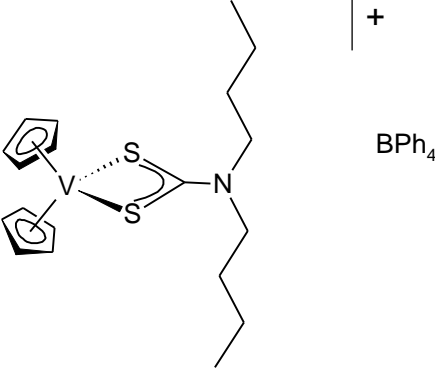
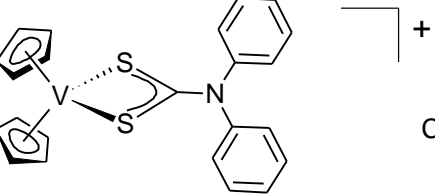
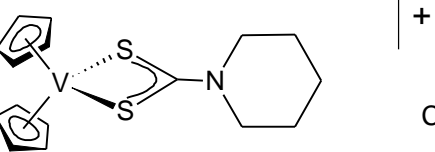
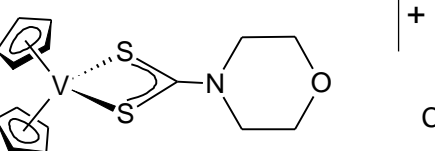
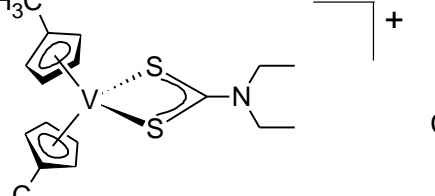
2.1 POMÔCKY A PRÍSTROJE

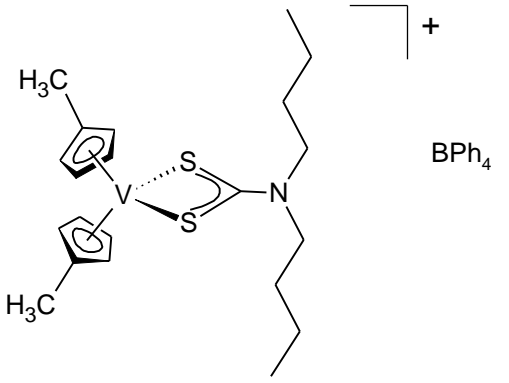
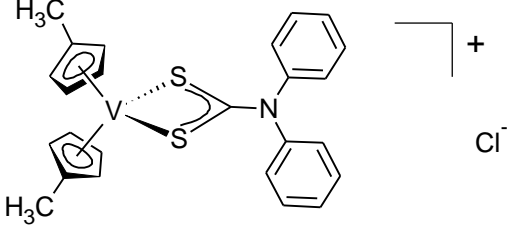
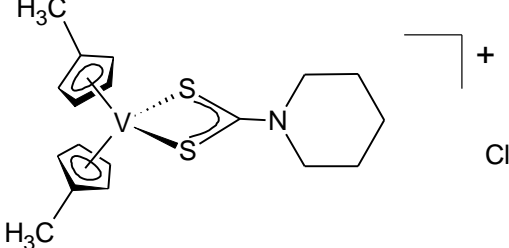
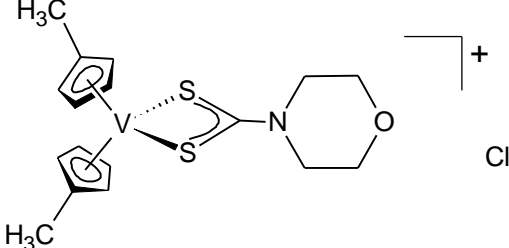
- Laminárny box Heraeus typu HS 12 (Geprüfte Sicherheit, Nemecko).
- Inkubátor HEPA (Snijders, Holandsko)- Koncentrácia CO₂ : 0,1-20 %, teplotný rozsah: 5-50 °C, relatívna vlhkosť: až 95% pri 37 °C.
- Spektrofotometer Infinite 200 (Tecan, Švajčiarsko)- režimy merania: intenzita fluorescencie, luminiscencie, fluorescenčný rezonančný prenos energie, absorbancia.
- Svetelný mikroskop TMS- CFWE 10xA/18(NIKON, Japonsko)- max. zväčšenie 160x.
- Chladnička a mraznička (Liebherr, Nemecko) – výkon 0,747 kWh/ 24 h.
- Plynový kahan Fuego SCS basic (Trigon-Plus, ČR) – teplota plameňa 1300 °C.
- Sada plastových skúmaviek (PTT, Holandsko) – objem 15 ml, 50 ml.
- Sada jednonábových pipiet (Eppendorf AG, Nemecko) – pipetovací objem 2 - 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl.
- Mikrotitračná doštička Corning 96 Flat Transparent (PTT, Holandsko) – rovné dno.
- Bürkerova komôrka (Meopta, USA) – hĺbka 0,1 mm, plocha siete 9 mm².
- Analytické váhy ABJ 220- 4M (Kern, Nemecko) – váživosť 220 g.
- Sada plastových špičiek (Eppendorf AG, Nemecko)– rozsah objemu 0,1 – 10 µl, 2 – 200 µl, 50 – 100 µl.
- Davkovací pipetor HandyStep (BrandTech, Francúzsko) – jednonábový, rozsah objemu: 1 µl – 10 ml.

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- Kultivačné médium pre bunky MOLT-4 Iskova modifikácia Dulbeccovho média- IMDM (Biosera, Francúzsko).
 - 20% fetálne teľacie sérum- FBS (Sigma-Aldrich, USA).
 - L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA).
 - Penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, USA).
 - Trypánová modrá- 0,5% vodný roztok (Sigma-Aldrich, USA).
 - WST činidlo (Roche Applied Science, Švajčiarsko).
 - Sterilný fosfátový pufr (PBS, PAA laboratories GmbH, Rakúsko).

Tabuľka 1: Prehľad usporiadania 10 testovaných vanadocén dithiokarbamátových komplexov.

Komplex	Štruktúrny vzorec	Skrátený vzorec Molekulová hmotnosť (g/mol)
1		$[VCp_2(DeDtc)]Cl$ 364,84
2		$[VCp_2(DBuDtc)]BPh_4$ 728, 714
3		$[VCp_2(DPhDtc)]Cl$ 460,91
4		$[VCp_2(PipDtc)]Cl$ 376,84
5		$[VCp_2(MorDtc)]Cl$ 378,814
6		$[V(MeCp)_2(DeDtc)]Cl$ 392,893

7		<p>[V(MeCp)₂(DBuDtc)]BPh₄ 756,768</p>
8		<p>[V(MeCp)₂(DPhDtc)]Cl 488,964</p>
9		<p>[V(MeCp)₂(PipDtc)]Cl 406,93</p>
10		<p>[V(MeCp)₂(MorDtc)]Cl 406,894</p>

2.3 BUNKOVÁ LÍNIA MOLT-4 A KULTIVÁCIA

K testovaniu vanadocen dithiokarbamátových komplexov bola použitá bunková línia MOLT-4 (ECACC, Veľká Británia) získaná z akútnej T-lymfoblastickej leukémie.

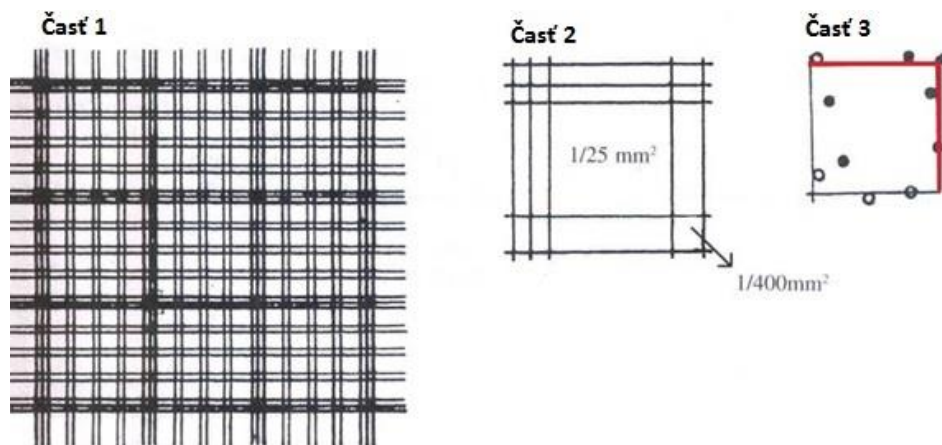
Bunky MOLT-4 boli kultivované v kultivačnom médiu, ktoré bolo pripravené pomocou 39 ml IMDM, 10 ml fetálneho teľacieho séra (FBS), 0,5 ml penicilínu/streptomycínu a 0,5 ml L-glutaminu. Kultivácia buniek MOLT-4 prebiehala za aseptických podmienok pri 37°C v kontrolovanej atmosfére s 5 % CO₂ v optimálnej hustote buniek a to 5 x 10⁵ buniek MOLT-4 v 5 ml kultivačného média. Každý štvrtý deň bolo množstvo buniek znovu upravené na 5 x 10⁵ buniek MOLT-4 v 5 ml kultivačného média. Tento proces sa nazýva pasážovanie buniek. Pre zachovanie optimálnych vlastností buniek MOLT-4 bolo pokusmi vykonaných maximálne do dvadsiatej pasáže.

2.4 STANOVENIE POČTU BUNIEK

K stanoveniu počtu živých buniek bolo potrebné špecializované farbivo trypanovej modrej. Špecializované farbivo trypanovej modrej je zo živej bunky z intracelulárneho priestoru aktívne transportované von, alebo neprechádza intaktnou bunecnou membránou a preto živé bunky ostávajú po zafarbení bezfarebné.

U mŕtvych buniek dochádza k strate integrity bunecnej membrány, poruche aktívneho efluxu, čo umožňuje prestupu farbiva do intracelulárneho priestoru bunky, ktorá je následne ofarbená na modro.

Homogenizovaná bunková suspenzia bola zmiešaná s trypanovou modrou v pomere 1:1, tj. 50 µl bunecnej línie MOLT-4 s 50 µl trypanovej modrej. Po premiešaní suspenzie sa s pomocou automatickej pipety naplnili obe polovice Bürkerovej komôrky. V Bürkerovej komôrke boli počítané bunky živé (bezfarebné) aj mŕtve (modré) v 50 stredných štvorcoch, avšak je potreba dodržiavať pravidlo dvoch strán, kedy sú počítané bunky vo vnútri štvorca a bunky, ktoré sa akokoľvek dotýkajú dvoch zvolených strán (obrázok č.6).



Obrázok č. 6: Zobrazenie mriežky v Bürkerovej komôrky (Časť 1). Rozmery jedného štvorca v ktorom sú počítané bunky MOLT-4 (Časť 2). Červene vyznačené pravidlo dvoch strán pre počítanie buniek v jednom štvorci (Časť 3). Prevzaté a upravené.^V

2.5 PRÍPRAVA ROZTOKOV

Pre zmeranie účinku testovaných komplexov na bunkovej línii MOLT-4 boli použité 2 roztoky o koncentrácií 100 $\mu\text{mol/l}$ – roztok A a 5 $\mu\text{mol/l}$ – roztok B.

K navážke testovaného komplexu o hmotnosti 2 mg bolo pridaných 50 μl dimethylsulfoxidu (DMSO), pomocou ktorého sa navážka rozpustila. Po úplnom rozpustení navážky v dimethylsulfoxide bolo pridaných 50 μl kultivačného média, čím bol pripravený zásobný roztok.

Najprv bola vypočítaná koncentrácia testovanej cytostatickej látky v zásobnom roztoku podľa vzorca č. 1.

Vzorec č. 1
$$c = \frac{m}{V \times M}$$

Pozn.: c – koncentrácia (mmol/l), m – hmotnosť testovanej cytostatickej látky (mg), M – molárna hmotnosť (g/mol), V – zvolený objem (l)

2.5.1 Príprava roztoku A

Pre prípravu roztoku A o koncentrácií 100 $\mu\text{mol/l}$ a objeme 1200 μl bol použitý zásobný roztok testovaného komplexu. Potrebný objemu zásobného roztoku, bol vypočítaný vzorcom č. 2.

$$\text{Vzorec č. 2:} \quad c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

Pozn.: c_1 – koncentrácia roztoku A (100 $\mu\text{mol/l}$), V_1 – objem roztoku A (1200 μl), c_2 – vypočítaná koncentrácia zásobného roztoku ($\mu\text{mol/l}$), V_2 – objem potrebného zásobného roztoku (μl)

Roztok A bol pripravený zmiešaním vypočítaného objemu zásobného roztoku s vypočítaným objemom kultivačného média tak, aby celkový objem bol 1200 μl .

2.5.2 Príprava roztoku B

Roztok B o koncentrácií 5 $\mu\text{mol/l}$ bol pripravený zmiešaním vypočítaného objemu roztoku A s vypočítaným objemom kultivačného média podľa vzorca č. 2 tak, aby celkový objem roztoku bol 1200 μl .

2.6 PRÍPRAVA MIKROTITRAČNEJ DOŠTIČKY

Na jednej mikrotitračnej doštičke, ktorá obsahuje 96 jamiek, boli vždy testované 2 vzorky testovaných komplexov v koncentráciách od 0,1 - 50 $\mu\text{mol/l}$. Rozloženie koncentrácií v mikrotitračnej doštičke je uvedené v tabuľke 2.

Do každej jamky bol podľa požadovanej koncentrácie testovanej látky presne napipetovaný určený objem zásobného roztoku A, B a kultivačného média tak, aby sa vytvorila koncentračná rada (tabuľka 3).

Do mikrotitračnej doštičky bola pipetovaná do prvého stĺpca negatívna kontrola, ďalej označená ako NK, ktorá obsahovala len 200 μl kultivačného média. Do posledného stĺpca bola napipetovaná pozitívna kontrola (PK), ktorá obsahovala 100 μl kultivačného média a 100 μl bunečnej suspenzie MOLT-4 bez ovplyvnenia testovanou cytostatickou látkou.

Po napipetovaní roztokov A, B a kultivačného média bolo napipetovaných do každej jamky 100 μl bunečnej suspenzie MOLT-4 v množstve 3×10^4 buniek MOLT-4 na jamku.

2.7 INKUBÁCIA

Takto pripravená mikrotitračná doštička bola vložená do inkubátoru na presne 24 hodín s nastavenou teplotou 37°C a atmosférou s 5 % CO₂.

2.8 DETEKCIA

Po 24h inkubácií bolo do každej jamky, vrátane negatívnej a pozitívnej kontroly, napipetovaných 50 µl WST-1 roztoku. WST-1 roztok bol pripravený nariadením WST-1 a PBS v pomere 1:4. Následne bola zmeraná absorbanca pomocou spektrofotometru TECAN INFINITY 200 pri vlnovej dĺžke 440 nm. Mikrotitračná doštička bola opäť inkubovaná a to 3 hodiny za rovnakej teploty a s atmosférou s 5 % CO₂.

Po 3h inkubácií bola pre každú jamku opäť zmeraná hodnota absorbancie pomocou spektrofotometru TECAN INFINITY 200 pri vlnovej dĺžke 440 nm.

2.9 VYHODNOTENIE

Každá koncentrácia bola spravená v tetraplikáte z ktorého bola vypočítaná priemerná hodnota absorbancie a smerodajná odchýlka. Hodnota absorbancie po aplikácii roztoku WST-1 bola odčítaná od hodnoty absorbancie po 3h inkubácií pre každú koncentráciu, negatívnu kontrolu a pozitívnu kontrolu.

Priemerné hodnoty absorbancie boli následne zanesené do grafu závislosti viability buniek MOLT-4 na koncentráciách testovanej cytostatickej látky s využitím softwaru Origin Pro (verzia 8, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) v bloku „Analyses“ pomocou štatistickej metódy „ANOVA“. Požadované bolo zistenie a odčítanie hodnoty IC₅₀, ktorá značí polovičnú inhibičnú aktivitu biochemických procesov v bunke bunečnej línie MOLT-4.

Tabuľka 2: Mikrotitračná doštička s 96 jamkami rozdelená číselne do stĺpcov a abecedne do riadkov. Tabuľka s rozložením koncentračnej rady ($\mu\text{mol/l}$) 2 testovaných vzoriek (VZ) spolu s negatívnou kontrolou (NK) a pozitívnou kontrolou (PK)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	1 VZ
B	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	
C	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	
D	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	
E	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	2 VZ
F	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	
G	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	
H	NK	0,1	0,4	0,7	1,5	2,5	4	9	15	27	50	PK	

Tabuľka 3: Tabuľka jednotlivých pipetovaných objemov roztokov A a B a kultivačného média (KM) prináležiacich koncentráciám od 0,1 - 50 $\mu\text{mol/l}$. Tabuľka zobrazuje polovicu mikrotitračnej doštičky pre jednu vzorku (napr. rad A-D alebo E-H).

Roztok	Stĺpec	Koncentrácia	Objem roztoku	Objem KM
B	1	NK	-	200 μl
	2	0,1	4 μl	96 μl
	3	0,4	16 μl	84 μl
	4	0,7	28 μl	72 μl
	5	1,5	60 μl	40 μl
	6	2,5	100 μl	-
A	7	4	8 μl	92 μl
	8	9	18 μl	82 μl
	9	15	30 μl	70 μl
	10	27	54 μl	46 μl
	11	50	100 μl	-
	12	PK	-	100 μl

2.10 STANOVENIE CYTOTOXICITY DIMETHYLSULFOXIDU

K navážke testovaného komplexu bolo vždy pridané polárne rozpúšťadlo dimethylsulfoxid (DMSO), pomocou ktorého bola navážka testovanej látky rozpustená. Experimentom bola zisťovaná maximálna možná koncentrácia DMSO, ktorá neporušila bunečnú integritu buniek MOLT-4.

Pre DMSO bola vytvorená nová koncentračná rada v rozmedzí koncentrácií od 0,01 – 4 hmotnostných %. Rozloženie koncentrácií v 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke uvádza tabuľka č. 4.

Pre testovanie DMSO boli použité dva roztoky, roztok A o koncentrácií 8 hmotnostných % a roztok B o koncentrácií 0,4 hmotnostných %. Do každej jamky bol podľa požadovanej koncentrácie testovanej látky presne napipetovaný určený objem zásobného roztoku A, B a kultivačného média tak podľa tabuľky č. 5.

Po napipetovaní roztokov A, B a kultivačného média bolo napipetované do každej jamky, okrem negatívnej kontroly, 100 μ l bunečnej suspenzie MOLT-4 v množstve 3×10^4 buniek MOLT-4 na jamku.

Príprava roztoku A

Pre prípravu roztoku A o koncentrácií 8 hmotnostných % a objeme 1200 μ l bolo použité 100% DMSO. Potrebný objem 100% DMSO, bol vypočítaný *vzorcom* č. 2, kde: c_1 – koncentrácia roztoku A (8 hmot. %), V_1 – objem roztoku A (1200 μ l), c_2 – koncentrácia DMSO (100 %), V_2 – objem potrebného DMSO (μ l).

Roztok A bol pripravený zmiešaním vypočítaného objemu DMSO s vypočítaným objemom kultivačného média tak, aby celkový objem bol 1200 μ l.

Príprava roztoku B

Roztok B o koncentrácií 0,4 hmotnostných % DMSO bol pripravený zmiešaním vypočítaného objemu roztoku A s vypočítaným objemom KM takisto podľa *vzorcu* č. 2 tak, aby celkový objem roztoku bol 1200 μ l.

Tabuľka 4: Tabuľka rozloženia koncentračnej rady (hmot. %) pre testovanie účinku dimethylsulfoxidu na bunečnú líniu MOLT-4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1	2	4	PK
B	NK	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1	2	4	PK
C	NK	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1	2	4	PK
D	NK	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1	2	4	PK

Tabuľka 5: Tabuľka pipetovaných objemov roztokov A a B a kultivačného média (KM) prináležiacich koncentráciám od 0,01 - 4 hmot. %.

Roztok	Stĺpec	Koncentrácia	Objem roztoku	Objem KM
B	1	NK	-	200 µl
	2	0,01	5 µl	95 µl
	3	0,02	10 µl	90 µl
	4	0,04	20 µl	80 µl
	5	0,1	50 µl	20 µl
	6	0,2	100 µl	-
A	7	0,3	8 µl	92 µl
	8	0,6	15 µl	85 µl
	9	1	25 µl	75 µl
	10	2	50 µl	50 µl
	11	4	100 µl	-
	12	PK	-	100 µl

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bolo vykonané stanovenie cytotoxickej aktivity pomocou WST-1 testu u 10 novo syntetizovaných vanadocendithiokarbamátov (Tabuľka č. 1), ktoré boli poskytnuté Katedrou obcej a anorganickej chémie Univerzity Pardubice. Tieto komplexy boli rozdelené do dvoch skupín a to nasledovne:

Skupina č. 1 obsahuje komplexy $[\text{VCp}_2(\text{DeDtc})]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{VCp}_2(\text{DBuDtc})]\text{BPh}_4$ (**2**), $[\text{VCp}_2(\text{DPhDtc})]\text{Cl}$ (**3**), $[\text{VCp}_2(\text{PipDtc})]\text{Cl}$ (**4**), $[\text{VCp}_2(\text{MorDtc})]\text{Cl}$ (**5**),

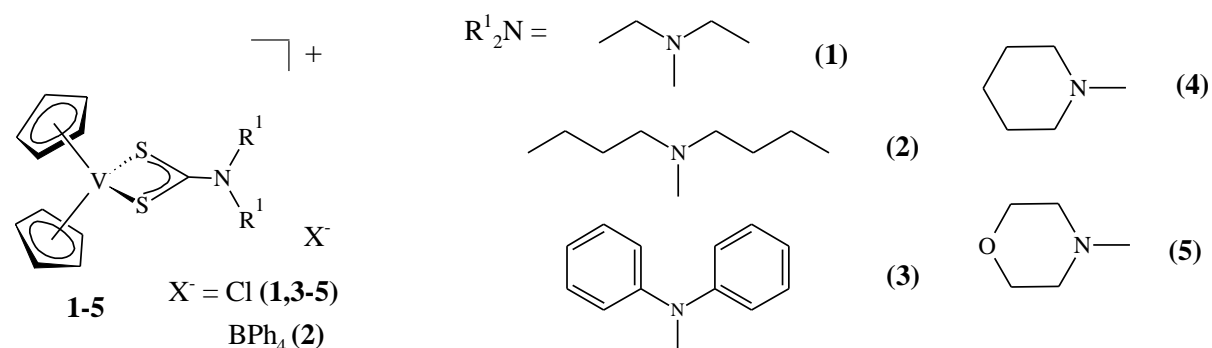
Skupina č. 2 obsahuje komplexy $[\text{V}(\text{MeCp})_2(\text{DeDtc})]\text{Cl}$ (**6**), $[\text{V}(\text{MeCp})_2(\text{DBuDtc})]\text{BPh}_4$ (**7**), $[\text{V}(\text{MeCp})_2(\text{DPhDtc})]\text{Cl}$ (**8**), $[\text{V}(\text{MeCp})_2(\text{PipDtc})]\text{Cl}$ (**9**), $[\text{V}(\text{MeCp})_2(\text{MorDtc})]\text{Cl}$ (**10**).

Ich cytostatická aktivita bola stanovená pomocou WST-1 testu na bunecnej línii MOLT-4, ktorá je odvodená od bunecnej línie T-lymfoblastickej leukémie.

Získané výsledky, ktoré boli spracované v programe Origin Pro, sú uvedené v grafoch (Graf č. 1-10). Grafy vyjadrujú závislosť viability buniek MOLT-4 na koncentrácií testovaného komplexu.

Skupina číslo 1

U skupiny č. 1 (**1-5**) sú na centrálnom atóme vanádu η^5 - naviazané dva cyklopentadienylové kruhy (Cp) a chelátovo viazané rôzne typy S, S-ligandov (obrázok č. 7): diethyldithiokarbamát (**1**), dibutyldithiokarbamát (**2**), diphenyldithiokarbamát (**3**), piperidindithiokarbamát (**4**) a morfolindithiokarbamát (**5**).



Obrázok č. 7: Štruktúrny vzorec vanadocén dithiokarbamátu s príslušnými ligandmi, ktoré prináležia komplexom skupiny č. 1.

Bolo stanovené, že komplex **1** obsahujúci diethyldithiokarbamát a komplex **3** obsahujúci diphenyldithiokarbamát sú cytostaticky menej účinné než komerčne využívané antitumorové liečivo *cis*-DDP s hodnotou $IC_{50} = 15,8 \mu\text{mol/l}$.³⁴ Ich IC_{50} je väčšie než $50 \mu\text{mol/l}$.

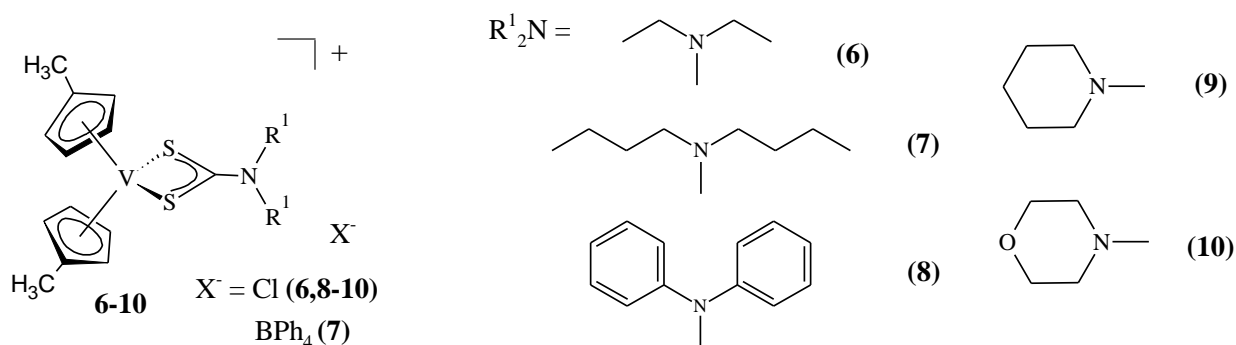
Ostatné tri komplexy majú vysokú cytostatickú aktivitu pohybujúcu sa v rozmedzí hodnôt $1,0 - 10,4 \mu\text{mol/l}$ (Tabuľka č. 6). Poradie aktivít je od najnižšej aktivity pre komplex **2** $IC_{50} = 10,4 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ nasledované komplexom **5** s hodnotou $IC_{50} = 5,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ a s najvyššou aktivitou komplex **4** s $IC_{50} = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$. Všetky hodnoty IC_{50} pre zlúčeniny **2**, **4** a **5** sú nižšie než v prípade platinového cytostatika *cis*-DDP.

Tabuľka 6: Výsledky cytostatickej aktivity testovaných komplexov skupiny č. 1 (komplexy 1-5) pomocou hodnoty IC_{50} u bunecnej línie MOLT-4.

	Komplex	MOLT-4 hodnota IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
1	1	> 50
	2	$10,4 \pm 0,5$
	3	> 50
	4	$1,0 \pm 0,1$
	5	$5,1 \pm 0,4$

Skupina číslo 2

Skupina č. 2 (**6-10**) má na Cp kruhoch substitovanú metylovú skupinu avšak na centrálnom atóme vanádu sú chelátovo viazané rovnaké typy S, S ligandov ako pri skupine č. 1 (obrázok č. 8): diethyldithiokarbamát (**6**), dibutyldithiokarbamát (**7**), diphenyldithiokarbamát (**8**), piperidindithiokarbamát (**9**) a morfolindithiokarbamát (**10**).



Obrázok č. 8: Štruktúrny vzorec dimethylvanadocén dithiokarbamátu s príslušnými ligandmi, prináležiacimi komplexom skupiny č. 2.

Testované komplexy **7**, **9**, **10** vykazovali cytostatickú aktivitu vyššiu než liečivo *cis*-DDP v rozmedzí hodnôt 0,9 - 8,9 $\mu\text{mol/l}$. Naopak komplex **6**, obsahujúci diethylthiokarbamát a komplex **8**, obsahujúci diphenylthiokarbamát boli menej účinné ako liečivo *cis*-DDP (Tabuľka č. 7). Medzi najúčinnější testovaný komplex skupiny č. 2 patrí komplex **9**, obsahujúci ligand piperidindithiokarbamát, s hodnotou $\text{IC}_{50} = 0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$.

Tabuľka 7: Výsledky cytostatickej aktivity testovaných komplexov skupiny č. 2 (komplexy 6-10) pomocou hodnoty IC_{50} u bunecnej línie MOLT-4.

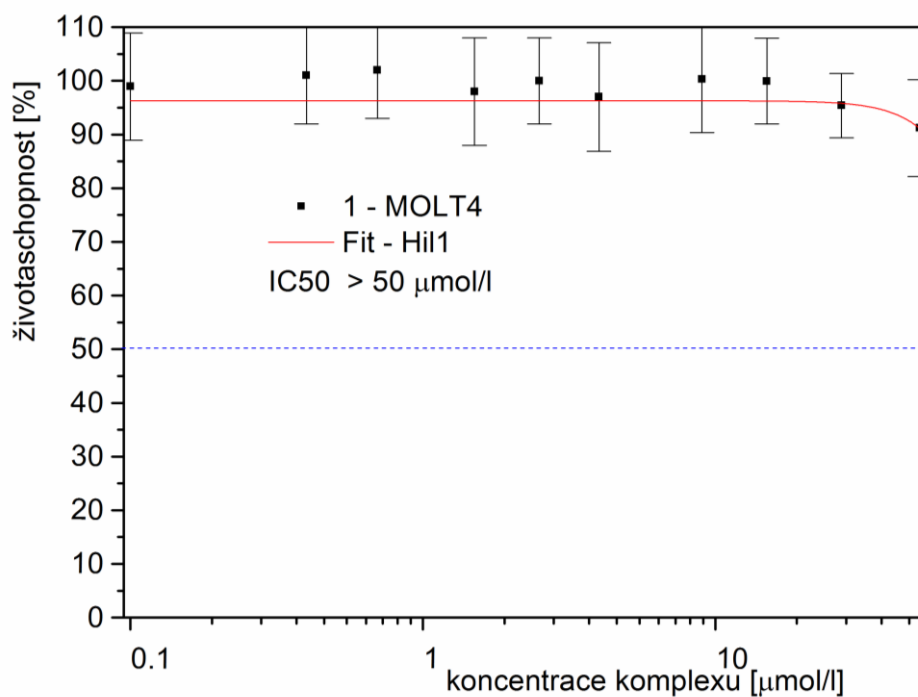
	Komplex	MOLT-4 hodnota IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
2	6	> 50
	7	$8,9 \pm 0,7$
	8	> 50
	9	$0,9 \pm 0,1$
	10	$3,2 \pm 0,3$

V porovnaní testovaných komplexov skupiny č. 1, s nesubstituovanou metylovou skupinou na Cp kruhoch, s komplexami skupiny č. 2 s substituovanou metylovou skupinou na Cp kruhoch, boli zistené podobné trendy cytostatickej účinnosti u rovnakých chelátovo viazaných ligandov.

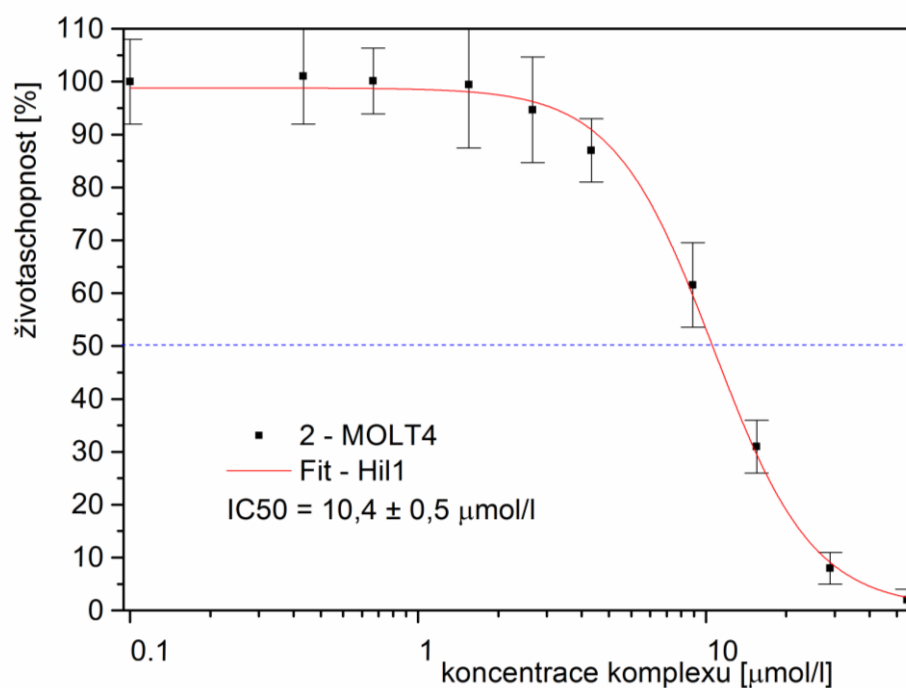
Účinnosť chelátovo viazaného ligandu diethyldithiokarbamát (komplexy **1, 6**) a ligandu diphenyldithiokarbamát (komplexy **3, 8**) vykazovali rovnakú zníženú účinnosť s hodnotou aktivity $IC_{50} \geq 50 \mu\text{mol/l}$.

Pre ostatné ligandy bolo zistené rovnaké poradie aktivity pri totožných ligandoch nehladiac na prítomnosť či neprítomnosť metylovej skupiny na Cp kruhoch. Ligand s najnižšou účinnosťou v rozmedzí 8,9 - 10,4 $\mu\text{mol/l}$ bol dibuthyldithiokarbamát (komplexy **2, 7**), ktorý bol nasledovaný ligandom morfolindithiokarbamátom (komplexy **5, 10**) účinným v intervale 3,2 - 5,1 $\mu\text{mol/l}$. Avšak ligand s najlepšou účinnosťou v rozmedzí 0,9 - 1,0 $\mu\text{mol/l}$ bol piperidindithiokarbamát (komplexy **4, 9**).

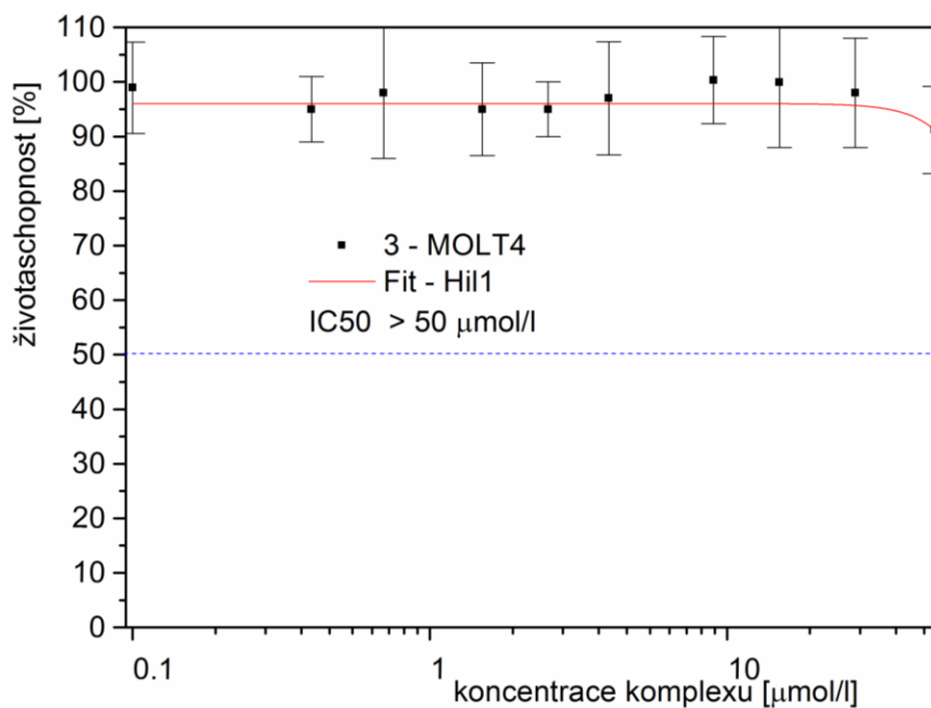
Porovnanie aktivity štruktúrne odpovedajúcich komplexov vo všetkých prípadoch ukázalo na fakt, že vyššej účinnosti dosahujú komplexy so substituovanou metylovou skupinou na Cp kruhoch.



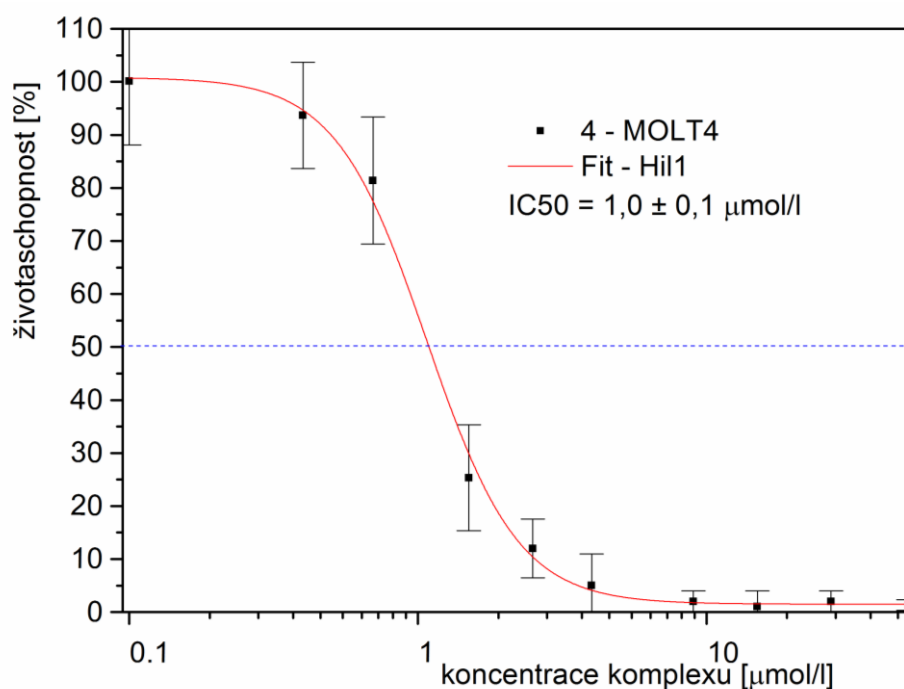
Graf č. 1: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 1. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



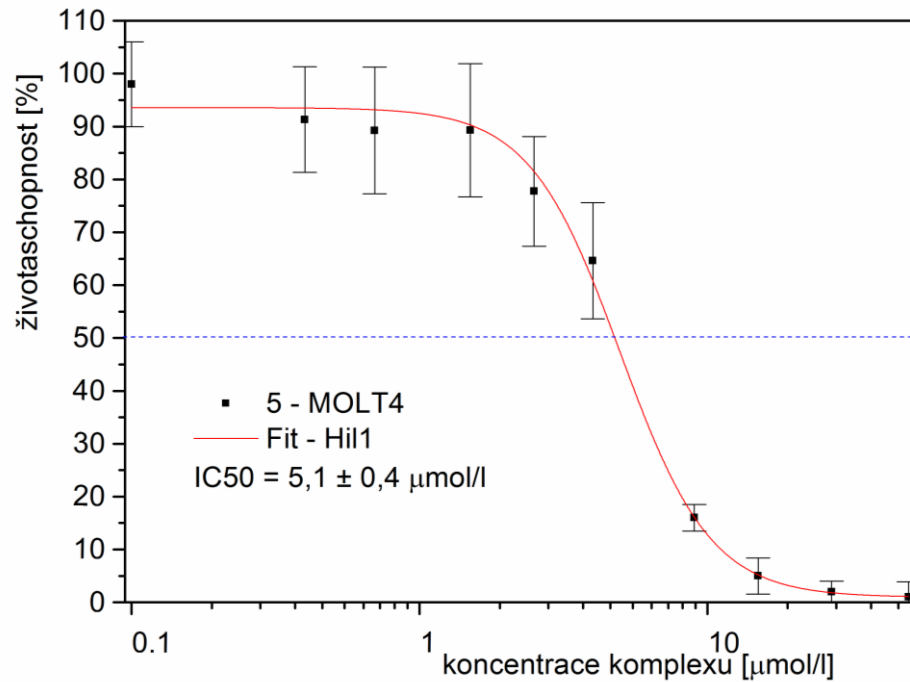
Graf č. 2: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 2. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



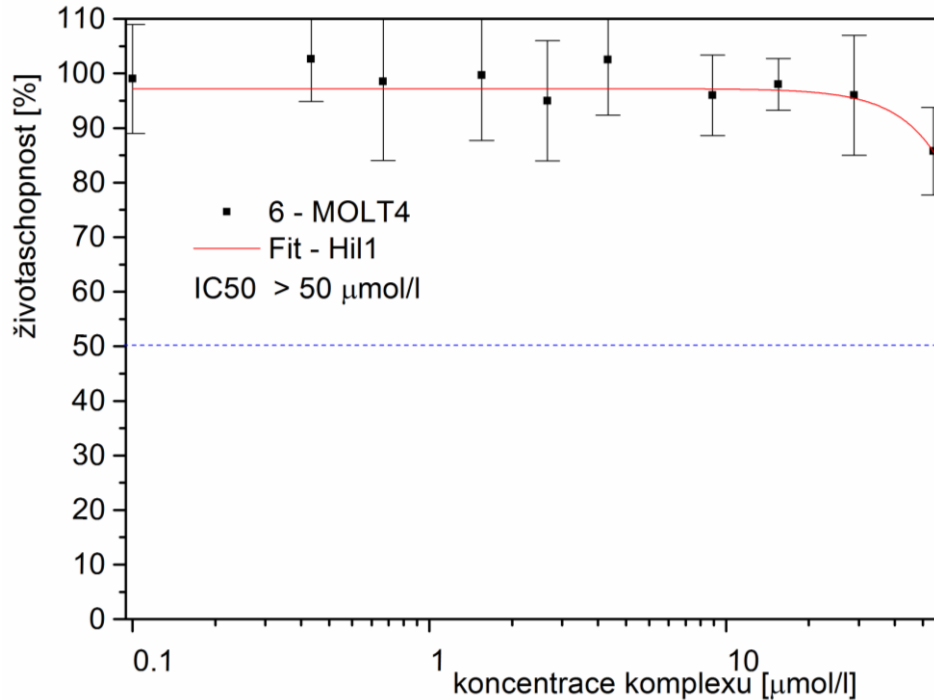
Graf č. 3: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 3. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



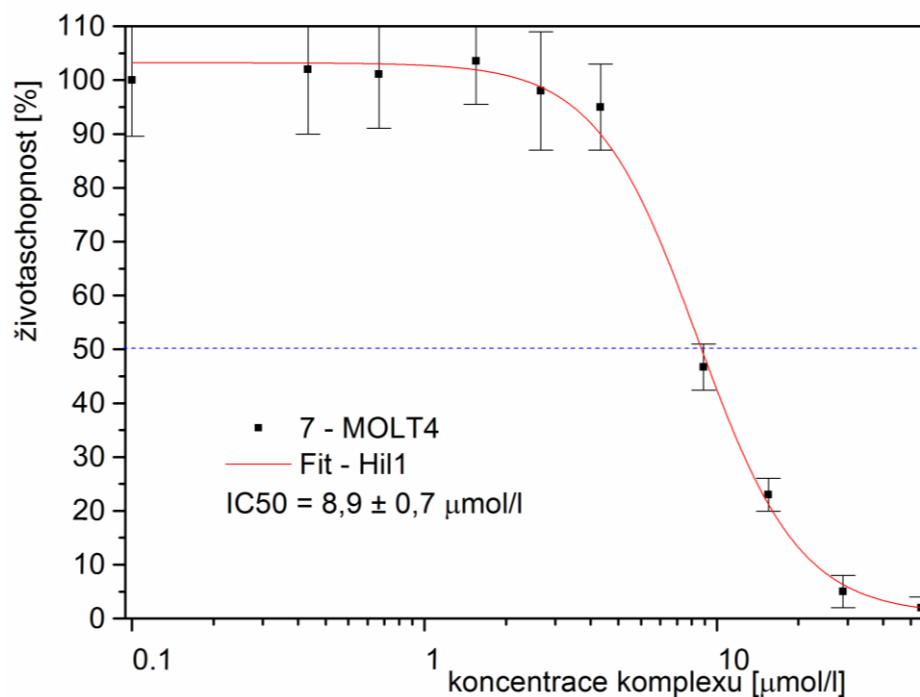
Graf č. 4: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 4. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



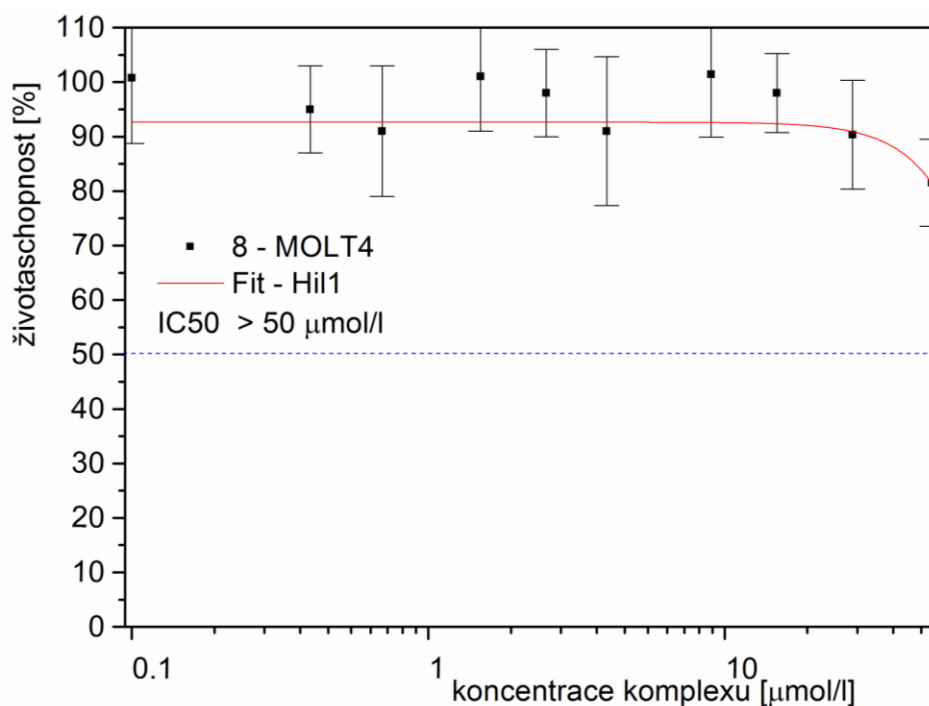
Graf č. 5: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 5. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



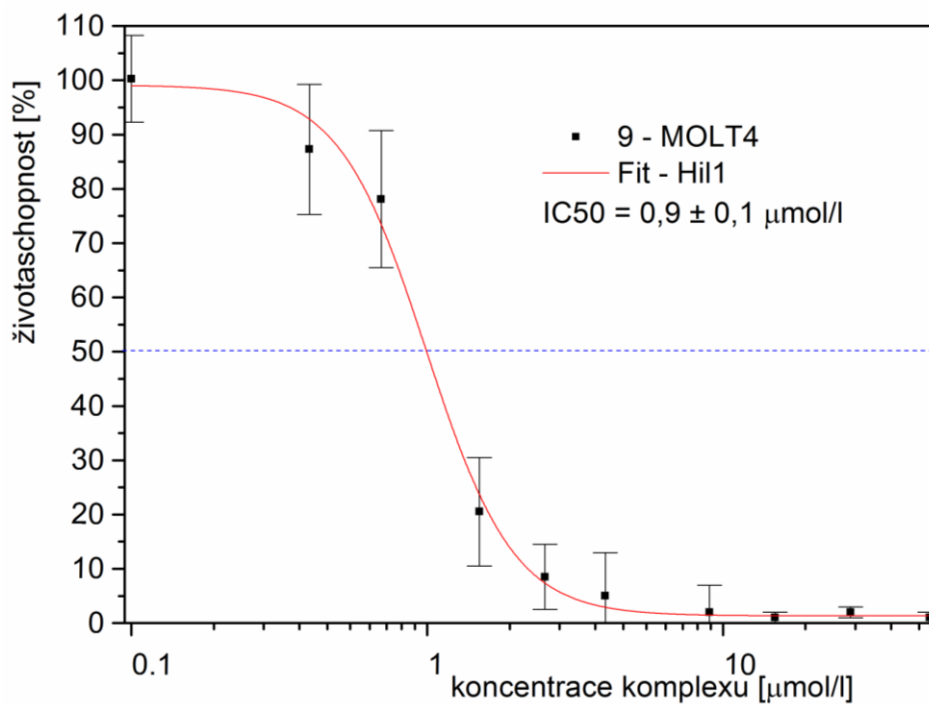
Graf č. 6: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 6. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



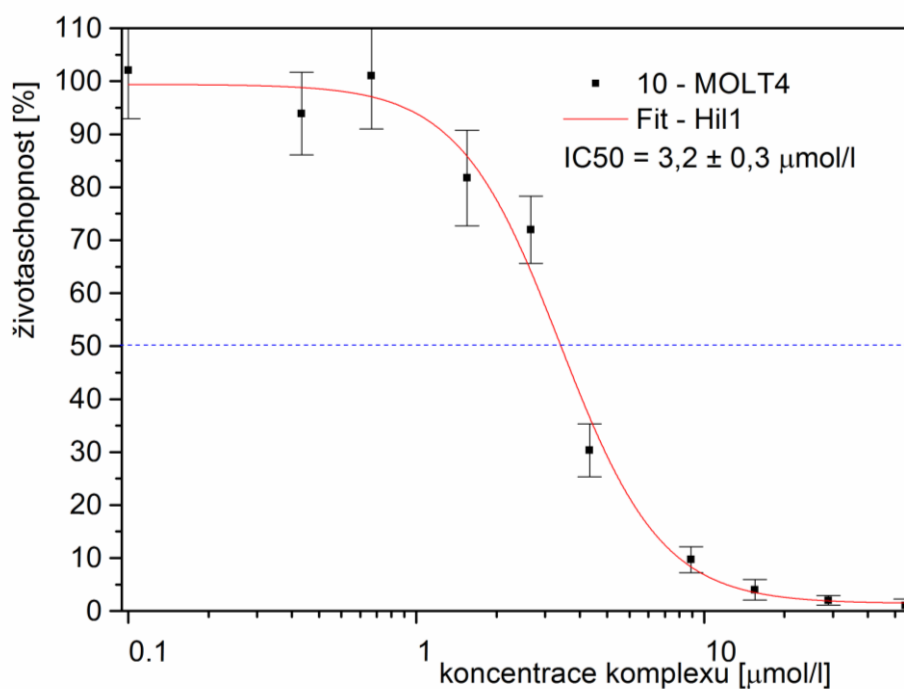
Graf č. 7: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 7. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



Graf č. 8: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu 8. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



Graf č. 9: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu **9**. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.



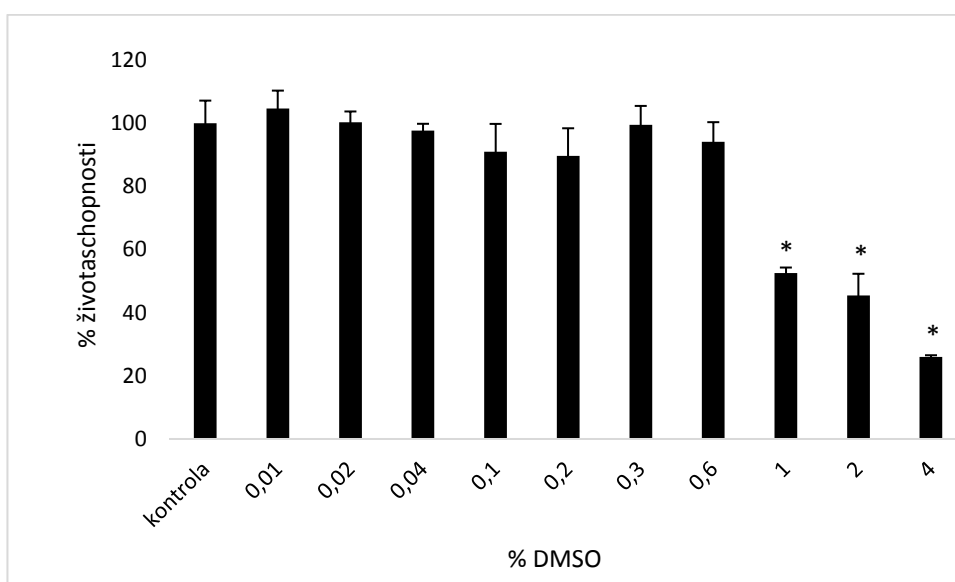
Graf č. 10: Závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií komplexu **10**. Spracované ako aritmetický priemer z troch na sebe nezávislých meraniach v programe Origin Pro.

Výsledky testovania dimethylsulfoxidu

Pri testovaní DMSO bola zisťovaná maximálna koncentrácia DMSO, ktorá nepoškodzuje bunkovú integritu bunkovej línie MOLT-4.

Výsledky testovania DMSO sú zahrnuté v grafe č. 11, ktorý ukazuje závislosť životaschopnosti buniek MOLT-4 na koncentrácií DMSO. Podľa grafu 11 možno tvrdiť, že maximálna koncentrácia DMSO, ktorá nepoškodzuje bunkovú integritu a takže nemá vplyv na bunečnú líniu MOLT-4 je 0,6 hmotnostných % DMSO.

Použitie vyššej koncentrácie ako 0,6 hmot. % spôsobuje poškodenie bunečnej integrity a výrazne zníženie viability buniek MOLT-4.



Graf 11: Graf závislosti životaschopnosti (%) buniek MOLT-4 na koncentrácií DMSO (%).

* označené štatisticky významné hodnoty koncentrácie DMSO.

4 ZÁVER

Pri testovaní cytotoxickej aktivity komplexov 1-10 bola zistená znížená účinnosť 4 komplexov s hodnotou aktivity $IC_{50} \geq 50 \mu\text{mol/l}$. Komplexy so zníženou aktivitou sú s chelátovo viazaným diethyldithiokarbamátom (komplexy **1, 6**) a diphenyldithiokarbamátom (komplexy **3, 8**).

Ostatné testované komplexy (**2, 4, 5, 7, 9, 10**) sa ukázali ako účinné s vysokou cytotoxickou aktivitou v intervale 0,9 - 10,4 $\mu\text{mol/l}$. Poradie chelátovo viazaných ligandov v účinnosti je dibuthyldithiokarbamát (komplexy **2, 7**), morfolindithiokarbamátom (komplexy **5, 10**) a piperidindithiokarbamát (komplexy **4, 9**). Poradie účinnosti daných komplexov je nezávislé na substitúcii metylovej skupiny na Cp kruhoch.

V porovnaní komplexov so substituovanou metylovou skupinou a nesubstiovanou, preukazujú vyššiu účinnosť komplexy so substituovanou metylovou skupinou na Cp kruhoch.

Z výsledkov vyplýva, že najúčinnším komplexom spomedzi testovaných komplexov je s hodnotou aktivity $IC_{50} = 0,9 - 1,0 \mu\text{mol/l}$ komplex **9**, so substituovanou metylovou skupinou na Cp kruhoch a chelátovo viazaným piperidindithiokarbamátom.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. KIOSEOGLU, Efrosini, Savvas PETANIDIS, Catherine GABRIEL a Athanasios SALIFOGLOU. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2015, **301-302**, 87-105 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.03.010. ISSN 00108545.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854515000983>

2. BAHARUM, H., W.-C. CHU, S.-S. TEO, K.-Y. NG, R. Abdul RAHIM a C.-L. HO. Molecular cloning, homology modeling and site-directed mutagenesis of vanadium-dependent bromoperoxidase (GcVBPO1) from *Gracilaria changii* (Rhodophyta). *Phytochemistry* [online]. 2013, **92**, 49-59 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.04.014. ISSN 00319422.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942213001556>

3. HARRIS, Wesley R., Binsheng YANG, Sohrab ABDOLLAHI a Yahia HAMADA. Steric restrictions on the binding of large metal ions to serum transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 1999, **76**(3-4), 231-242 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/S0162-0134(99)00150-6. ISSN 01620134.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013499001506>

4. FREZZA, Michael, Sarmad HINDO, Di CHEN, Andrew DAVENPORT, Sara SCHMITT, Dajena TOMCO a Q. PING DOU. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2010, **16**(16), 1813-1825 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.2174/138161210791209009. ISSN 13816128.

Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=16&issue=16&page=1813>

5. REHDER, Dieter. The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 1999, **182**(1), 297-322 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/S0010-8545(98)00194-5. ISSN 00108545.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854598001945>

6. SHAVER, Alan, Jesse B. NG, David A. HALL, Bernadette Soo LUM a Barry I. POSNER. Insulin mimetic peroxovanadium complexes: preparation and structure of potassium oxodiperoxo(pyridine-2-carboxylato)vanadate(V), $K_2[VO(O_2)_2(C_5H_4NCOO)] \cdot 2H_2O$, and potassium oxodiperoxo (3-hydroxypyridine-2-carboxylato)vanadate(V), $K_2[VO(O_2)_2(OHC_5H_3NCOO)] \cdot 3H_2O$, and their reactions with cysteine. *Inorganic Chemistry* [online]. 1993, **32**(14), 3109-3113 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1021/ic00066a024. ISSN 0020-1669.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic00066a024>

7. CRANS, Debbie C., Jason J. SMEE, Ernestas GAIDAMAUSKAS a Luqin YANG. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chemical Reviews* [online]. 2004, **104**(2), 849-902 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1021/cr020607t. ISSN 0009-2665.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr020607t>

8. ABAKUMOVA, O. Yu., O. V. PODOBED, N. F. BELAYEVA a A. I. TOCHILKIN. Anticancer activity of oxovanadium compounds. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* [online]. 2012, **6**(2), 164-170 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1134/S1990750812020023. ISSN 1990-7508.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1990750812020023>

9. REHDER, Dieter. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Medicinal Chemistry*[online]. 2012, **4**(14), 1823-1837 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.4155/fmc.12.103. ISSN 1756-8919.

Dostupné z: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.12.103>

10. DEL RÍO, Diego, Agustín GALINDO, Juan TEJEDO, Francisco J BEDOYA, Andrea IENCO a Carlo MEALLI. Synthesis, antiapoptotic biological activity and structure of an oxo-vanadium(IV) complex with an OOO ligand donor set. *Inorganic Chemistry Communications* [online]. 2000, **3**(1), 32-34 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/S1387-7003(99)00180-X. ISSN 13877003.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138770039900180X>

11. CHIN, Lawrence S., Susan F. MURRAY, David H. HARTER, Patrick F. DOHERTY a Satyendra K. SINGH. Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: A role for Akt/PKB. *Journal of Biomedical Science* [online]. 1999, **6**(3), 213-218 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1007/BF02255905. ISSN 1021-7770.

Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02255905>

12. LEÓN, I.E., N. BUTENKO, A.L. DI VIRGILIO, C.I. MUGLIA, E.J. BARAN, I. CAVACO a S.B. ETCHEVERRY. Vanadium and cancer treatment: Antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2014, **134**, 106-117 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2013.10.009. ISSN 01620134.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013413002778>

13. ETCHEVERRY, Susana Beatriz, Evelina Gloria FERRER, Luciana NASO, Josefina RIVADENEIRA, Victoria SALINAS a Patricia Ana María WILLIAMS. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. 2008, **13**(3), 435-447 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1007/s00775-007-0332-9. ISSN 0949-8257.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00775-007-0332-9>

14. NASO, Luciana, Evelina Gloria FERRER, Luis LEZAMA, Teófilo ROJO, Susana Beatriz ETCHEVERRY a Patricia WILLIAMS. Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: relationship with the radical scavenger activity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. 2010, **15**(6), 889-902 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1007/s00775-010-0652-z. ISSN 0949-8257.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00775-010-0652-z>

15. NASO, Luciana G., Evelina G. FERRER, Nataliya BUTENKO, Isabel CAVACO, Luis LEZAMA, Teófilo ROJO, Susana B. ETCHEVERRY a Patricia A. M. WILLIAMS. Antioxidant, DNA cleavage, and cellular effects of silibinin and a new oxovanadium(IV)/silibinin complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*[online]. 2011, **16**(4), 653-668 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1007/s00775-011-0769-8. ISSN 0949-8257.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00775-011-0769-8>

16. HARDING, Margaret a George MOKDSI. Antitumour Metallocenes: Structure-Activity Studies and Interactions with Biomolecules. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2000, **7**(12), 1289-1303 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.2174/0929867003374066. ISSN 09298673.

Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=7&issue=12&spage=1289>

17. AUBRECHT, Jiri, Rama Krishna NARLA, Phalguni GHOSH, Jennifer STANEK a Fatih M. UCKUN. Molecular Genotoxicity Profiles of Apoptosis-Inducing Vanadocene Complexes. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 1999, **154**(3), 228-235 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1006/taap.1998.8592. ISSN 0041008X.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X98985921>

18. GHOSH, Phalguni, Ann T. KOTCHEVAR, Darin D. DUMEZ, Sutapa GHOSH, John PEITERSON a Fatih M. UCKUN. Synthesis and Structure of Bis(π -cyclopentadienyl)vanadium(IV) 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Compounds and Their Interactions with Artificial Membranes. *Inorganic Chemistry* [online]. 1999, **38**(16), 3730-3737 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1021/ic9902469. ISSN 0020-1669.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic9902469>

19. RAUDASCHL, Gabriele, Bernhard LIPPERT, James D HOESCHELE, Helen E. HOWARD-LOCK, Colin J.L. LOCK a Pierre PILON. Adduct formation of cis-(NH₃)₂PtX₂ (X = Cl⁻, I⁻) with formamides and the crystal structures of cis-(NH₃)₂PtCl₂·(CH₃)₂NCHO. Application for the purification of the antitumor agent cisplatin. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 1985, 106(3), 141-149 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)87550-7. ISSN 00201693.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169300875507>

20. XIE, Mingxia, Deliang CHEN, Fang ZHANG, Gail R. WILLSKY, Debbie C. CRANS a Wenjun DING. Effects of vanadium (III, IV, V)-chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 2014, **136**, 47-56 [cit. 2018-06-26]. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.03.011. ISSN 01620134.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013414000889>

21. KACEW, Sam, Mano R. PARULEKAR a Zulfiquar MERALI. Effects of parenteral vanadium administration on pulmonary metabolism of rats. *Toxicology Letters* [online]. 1982, **11**(1-2), 119-124 [cit. 2018-06-26]. DOI: 10.1016/0378-4274(82)90115-1. ISSN 03784274.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378427482901151>

22. PRITCHARD, D. J., Bruce R. KORF, Petr GOETZ. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Galén. 2007. 183s. ISBN 978-80-7262-449-2.

23. ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin C. RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, [2005]. 630s. ISBN 80-902906-0-4.

24. WU, Yaohua, Yong MA, Zhilin XU, et al. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Letters* [online]. 2014, **351**(1), 108-116 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.05.018. ISSN 03043835.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383514002754>

25. LEON, I. E., V. PORRO, A. L. DI VIRGILIO, L. G. NASO, P. A. M. WILLIAMS, M. BOLLATI-FOGOLÍN a S. B. ETCHEVERRY. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxidovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. 2014, **19**(1), 59-74 [cit. 2018-06-26]. DOI: 10.1007/s00775-013-1061-x. ISSN 0949-8257.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00775-013-1061-x>

26. GONÇALVES, António Pedro, Arnaldo VIDEIRA, Paula SOARES a Valdemar MÁXIMO. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sciences* [online]. 2011, **89**(11-12), 371-377 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.07.004. ISSN 00243205.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320511003377>

27. SRIVASTAVA, Swati, Narender KUMAR a Partha ROY. Role of ERK/NFκB in vanadium (IV) oxide mediated osteoblast differentiation in C₃H₁₀T1/2 cells. *Biochimie* [online]. 2014, **101**, 132-144 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.01.005. ISSN 03009084.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414000091>

28. CASTALDI, L., C. SERRA, F. MORETTI, et al. Bisperoxovanadium, a phosphotyrosine phosphatase inhibitor, reprograms myogenic cells to acquire a pluripotent, circulating phenotype. *The FASEB Journal*[online]. 2007, **21**(13), 3573-3583 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1096/fj.06-7454com. ISSN 0892-6638.

Dostupné z: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.06-7454com>

29. WANG, Bing, Kaoru TANAKA, Akinori MORITA, Yasuharu NINOMIYA, Kouichi MARUYAMA, Kazuko FUJITA, Yoshio HOSOI a Mitsuru NENOI. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *Journal of Radiation Research* [online]. 2013, **54**(4), 620-629 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1093/jrr/rrs140. ISSN 1349-9157.

Dostupné z: <https://academic.oup.com/jrr/article-lookup/doi/10.1093/jrr/rrs140>

- 30.** ZHOU, Wei, Yanyan MIAO, Yunjiao ZHANG, Liang LIU, Jun LIN, James Y YANG, Yi XIE a Longping WEN. Induction of cyto-protective autophagy by paramontroseite VO 2 nanocrystals. *Nanotechnology* [online]. 2013, **24**(16), 165102-165126 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1088/0957-4484/24/16/165102. ISSN 0957-4484. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/24/i=16/a=165102?key=crossref.2541b3be8921a9af66b994549e616f80>
- 31.** QUATTROCELLI, Mattia, Giacomo PALAZZOLO, Irene AGNOLIN, Sabata MARTINO, Marina BOUCHÉ, Luigi ANASTASIA a Maurilio SAMPAOLESI. Synthetic sulfonyl-hydrazone-1 positively regulates cardiomyogenic microRNA expression and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2011, **112**(8), 2006-2014 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1002/jcb.23118. ISSN 07302312.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.23118>
- 32.** MOLINUEVO, María S., Ana M. CORTIZO a Susana B. ETCHEVERRY. Vanadium(IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2008, **61**(5), 767-773 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1007/s00280-007-0532-6. ISSN 0344-5704.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-007-0532-6>
- 33.** AJEAWUNG, Norbert Fonya, Robert FAURE, Chris JONES a Deepak KAMNASARAN. Preclinical evaluation of dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate V for the treatment of pediatric low-grade gliomas. *Future Oncology* [online]. 2013, **9**(8), 1215-1229 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.2217/fon.13.73. ISSN 1479-6694.
Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon.13.73>
- 34.** VINKLÁREK, Jaromír - HURYCHOVÁ, Hana - HONZÍČEK, Jan - ŠEBESTOVÁ, Lucie - PADĚLKOVÁ, Zdeňka - ŘEZÁČOVÁ, Martina. Can Substitution of Chlorides Enhance the Cytotoxicity of Vanadocene Dichloride? *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2013, 2013(14), 2665-2672. ISSN 1434-1948.

6 ZDROJE OBRÁZKOV

- I.** LEON, I. E., A. L. DI VIRGILIO, V. PORRO, C. I. MUGLIA, L. G. NASO, P. A. M. WILLIAMS, M. BOLLATI-FOGOLIN a S. B. ETCHEVERRY. Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin $[\text{VO}(\text{chrysin})_2\text{EtOH}]_2$ in a human osteosarcoma model: the role of oxidative stress and apoptosis. *Dalton Transactions* [online]. 2013, 42(33), 11868-11932 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1039/c3dt50524c. ISSN 1477-9226.
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3dt50524c>
- II.** RAUDASCHL, Gabriele, Bernhard LIPPERT, James D HOESCHELE, Helen E. HOWARD-LOCK, Colin J.L. LOCK a Pierre PILON. Adduct formation of cis-(NH_3)₂PtX₂ (X = Cl⁻, I⁻) with formamides and the crystal structures of cis-(NH_3)₂PtCl₂·(CH_3)₂NCHO. Application for the purification of the antitumor agent cisplatin. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 1985, 106(3), 141-149 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)87550-7. ISSN 00201693.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169300875507>
- III.** KIOSEOGLOU, Efrosini, Savvas PETANIDIS, Catherine GABRIEL a Athanasios SALIFOGLU. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2015, **301-302**, 87-105 [cit. 2018-06-27]. DOI: 10.1016/j.ccr.2015.03.010. ISSN 00108545.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854515000983>
- IV.** BRAUNER, František, Milan HÁJEK a Hana VASILJEVOVÁ. *Buněčná biologie* [online]. [cit. 2018-06-29].
Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/13>
- V.** Protokoly k praktickým cvičením z fyziologie. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy [online]. © Physiology 2010 [cit. 2018-20-04].
Dostupné z: <http://docplayer.cz/39253293-1-uvod-do-cviceni-biologicka-data.html>

ÚDAJE PRE KNIŽNICOVÚ DATABÁZU

Názov práce	Hodnotenie biologického účinku vanadocen dithiokarbamátových komplexov na línii buniek akútnej lymfoblastickej leukémie
Autor práce	Kristína Spustová
Odbor	Zdravotný laborant
Rok obhajoby	2018
Vedúci práce	prof. Ing. Jaromír Vinklárěk, Dr.
Anotácia	Bakalárska práca obsahuje teoretickú časť v ktorej je zahrnutá teória o vanáde, zlúčeninách vanádu, vanadocenových komplexoch a mechanizmoch antitumorovej aktivity vanádu. V experimentálnej časti je uvedené testovanie cytotoxickej aktivity 10 vanadocen dithiokarbamátových komplexov na nádorovej línii buniek MOLT-4, pomocou stanovenia polovičnej inhibičnej koncentrácie (IC ₅₀). Najaktívnejšími testovanými komplexmi boli zlúčeniny s chelátovo viazaným piperidindithiokarbamátom (4, 9) u ktorých bola hodnota IC ₅₀ v rozmedzí 0,9 - 1,0 μmol/l.
Kľúčové slová	rakovina, cytotoxicita, vanád, vanadocénové komplexy, WST-1