

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení cytotoxické aktivity monocyklopentadienylových  
a monoindenylových komplexů molybdenu obsahující N, N chelátující ligandy

Daniela Hofmanová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Hofmanová**  
Osobní číslo: **C15406**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Stanovení cytotoxické aktivity monocyklopentadienylových a monoindenylových komplexů molybdenu obsahující N, N chelátující ligandy.**  
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 organokovových sloučenin 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 IC<sub>50</sub> diskutovat vliv různého typu 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

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, 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 dle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Daniela Hofmanová

Tímto bych ráda poděkovala prof. Ing. Jaromíru Vinklárkovi, Dr. za vedení mé bakalářské práce, odborný dohled a cenné rady. Poděkování patří také katedře obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice za poskytnuté sloučeniny. Ústavu lékařské biochemie LF v Hradci Králové za poskytnutí pracovního prostředí a v neposlední řadě mé konzultantce Mgr. Lucii Melounkové za trpělivost, všestrannou pomoc a přátelský přístup po celou dobu experimentu.

Velké díky patří bezpochyby i mé rodině a přátelům za jejich nepostradatelnou pomoc a podporu po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zaměřuje na stanovení inhibiční aktivity  $IC_{50}$  monocyklopentadienylových a indenylových sloučenin molybdenu. V teoretické části jsou zahrnuty základní informace týkající se nádorového onemocnění, rozdělení a popsání cytostatických látek až po sloučeniny molybdenu. V navazující praktické části práce je popsáno testování organokovových sloučenin s centrálním kovem molybdenu za pomoci WST-1 testu na buněčné linii MOLT-4 odvozené od T-lymfocytární leukémie. Inhibiční aktivita byla celkově stanovena u 13 molybdenových sloučenin. Nejaktivnějšími komplexy byly sloučeniny ( $MoS_2$ ,  $MoP_2$ ,  $Mo_2$ ) obsahující N, N'-chelátově vázaný 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin. Nejúčinnějším byl komplex  $MoS_2$  s  $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ .

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

nádory, cytostatika, rakovina, molybdenocendichlorid, WST-1,  $IC_{50}$

## **TITLE**

Determination of cytostatic activity of monocyclopentadienyl and monoindenyl complexes of molybdenum containing N, N'-chelating ligands

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis is focused on determination of inhibition activity of  $IC_{50}$  monocyclopentadienyl and indenyl compounds of molybdenum. The theoretical part includes basic information about tumor diseases, distribution and description of cytostatic substances. The following practical part describes the testing of organometallic compounds with molybdenum central metal using a WST-1 assay on the T-lymphoblastic leukemia cell line MOLT-4. Inhibitory activity was generally determined in 13 molybdenum compounds. Complexes with the high cytotoxic activity ( $MoS_2$ ,  $MoP_2$ ,  $Mo_2$ ) containig N, N'-chelate 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. The complex  $MoS_2$  was most effective with  $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ .

## **KEYWORDS**

tumors, cytostatics, cancer, molybdenocene dichloride, WST-1,  $IC_{50}$

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Chemoterapie nádorových onemocnění .....	13
<b>1.2 CYTOSTATIKA .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Klasifikace cytostatik .....	14
1.2.2 Alkylační činidla .....	15
1.2.3 Antimetabolity .....	16
1.2.4 Inhibitory mitózy .....	16
1.2.5 Inhibitory topoizomerázy .....	17
1.2.6 Interkalační látky .....	17
1.2.7 Hormonální cytostatika .....	17
1.2.8 Ostatní protinádorová léčiva.....	17
<b>2 CYTOSTATICKY AKTIVNÍ KOMPLEXY PŘECHODNÝCH KOVŮ .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Platínové komplexy .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Cisplatina .....	19
2.1.2 Karboplatina .....	20
2.1.3 Oxaliplatina .....	20
2.1.4 Satraplatina .....	21
2.1.5 Další analoga platiny .....	21
<b>2.2 NEPLATINOVÉ KOMPLEXY .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Lomené metalloceny .....	22
2.2.2 Sloučeniny molybdenu s cytotoxickým účinkem.....	24
2.2.3 Monocyklopentadienylové a indenylové komplexy molybdenu.....	25
2.2.4 Akutní lymfoblastická leukémie a buněčná linie MOLT- 4.....	26

<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité přístroje a pomůcky .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikálie a roztoky .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Metodická část .....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Kultivace buněčné linie MOLT-4 .....	31
3.3.2	Stanovení počtu buněk buněčné linie MOLT-4 .....	31
3.3.3	Příprava buněčné suspenze .....	32
3.3.4	Příprava roztoků testovaných komplexů .....	32
3.3.5	Příprava mikrotitrační destičky .....	33
3.3.6	Inkubace .....	34
3.3.7	Detekce .....	34
3.3.8	Vyhodnocení WST-1 testu .....	34
<b>3.4</b>	<b>Stanovení cytotoxicity dimethylsulfoxidu .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Příprava roztoků testovaného dimethylsulfoxidu .....	36
3.4.2	Inkubace .....	36
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Vyhodnocení cytotoxicity dimethylsulfoxidu.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>51</b>
	<b>ZDROJE OBRÁZKŮ.....</b>	<b>54</b>



# SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

## Obrázky

Obr. 1: Klasifikace fázově specifických cytostatik (Slíva a kol., 2011, s.272) .....	15
Obr. 2: Strukturní vzorec <i>cis</i> -DDP .....	20
Obr. 3: Strukturní vzorec karboplatiny .....	20
Obr. 4: Strukturní vzorec oxaliplatiny .....	21
Obr. 5: Strukturní vzorec satraplatiny.....	21
Obr. 6: Obecná struktura lomených metallocenů .....	23
Obr. 7: Molybdenocen dichlorid.....	24
Obr. 8: Struktura komplexu molybdenu .....	26
Obr. 9: Zobrazení Bürkerovy komůrky (Porcinas, 2018).....	31

## Tabulky

Tab. 1: Cytostaticky aktivní komplexy vykazující antitumorovou aktivitu .....	22
Tab. 2: Tabulka testovaných komplexů molybdenu .....	29
Tab. 3: Uspořádání mikrotitrační destičky testovaných sloučenin v rozmezí koncentrací od 0,1 – 50 $\mu\text{mol/l}$ .....	33
Tab. 4: Tabulka pipetovaných objemů roztoků A i B a kultivačního média (KM) pro koncentrace 0,1-50 $\mu\text{mol/l}$ .....	34
Tab. 5: Uspořádání mikrotitrační destičky testovaného dimethylsulfoxidu (DMSO) v rozmezí koncentrací od 0,01 – 4 % hm. ....	35
Tab. 6: Přehled pipetovaných objemů roztoků dimethylsulfoxidu (DMSO) a kultivačního média (KM) pro koncentrace 0,01-4 % hm .....	36
Tab. 7: Výsledné hodnoty $\text{IC}_{50}$ jednotlivých komplexů skupiny č. 1 .....	38
Tab. 8: Výsledné hodnoty $\text{IC}_{50}$ jednotlivých komplexů skupiny č. 2.....	41
Tab. 9: Výsledné hodnoty $\text{IC}_{50}$ jednotlivých komplexů skupiny č. 3.....	45

## **Grafy**

Graf 1: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS1 .....	38
Graf 2: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS2 .....	39
Graf 3: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS3 .....	39
Graf 4: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP1 .....	42
Graf 5: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP2 .....	42
Graf 6: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP3 .....	43
Graf 7: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP4 .....	43
Graf 8: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP5 .....	44
Graf 9: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo1.....	46
Graf 10: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo2.....	46
Graf 11: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo3.....	47
Graf 12: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo4.....	47
Graf 13: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo5.....	48
Graf 14: Závislost viability (%) buněk MOLT-4 na koncentraci DMSO (% hm.) .....	49

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AML	akutní myeloidní leukémie
ALL	akutní lymfatická leukémie
Ar	atomová relativní hmotnost
<i>cis</i> -DDP	diaminodichlorplatnatý komplex
CLL	chronická lymfatická leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
Cp	cyklopentadienyl
DACH	diaminocyklohexanový komplex
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
GSH	glutathion
IC <sub>50</sub>	inhibiční poloviční koncentrace
IMDM	Iskova modifikace Dulbecova média
KM	kultivační médium
L	acidoligand
M	centrální atom přechodného kovu
MDC	molybdenocen dichlorid
NK	negativní kontrola
PBS	sterilní fosfátový pufr
PK	pozitivní kontrola
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktivní forma kyslíku)
RNA	ribonukleová kyselina
TDC	titanocen dichlorid
WST-1	4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5]-tetrazoliová sodná sůl

## ÚVOD

Nádorová onemocnění patří k nejobávanějším onemocněním v rozvinutých státech světa, včetně ČR. Příčina nádorů tkví ve ztrátě kontroly organismu nad dělením buněk, které se začnou zcela rychle a nekontrolovatelně množit. Pomocí chemoterapie, lze některé nádory vyléčit použitím cytostatik, jejichž principem je toxicita pro buňku ve fázi dělení nebo rozmnožování. Bohužel cytostatika prozatím nedokážou rozlišovat mezi rakovinnými a zdravými rychle se množícími buňkami, proto zasahují i buňky zdravé. To způsobuje mnoho vedlejších účinků. Tato příčina vede k hledání nových vysokoúčinných cytostatik vykazující co nejmenší intoxikaci organismu.

Cílem mé bakalářské práce bylo zjištění inhibiční aktivity ( $IC_{50}$ ) nově syntetizovaných cyklopentadienylových a indenylových sloučenin molybdenu. Stanovení inhibičního účinku bylo provedeno na lidské T-lymfocytární linii buněk MOLT-4 pomocí WST-1 testu.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

V současnosti patří nádorová onemocnění mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých oblastech světa, včetně ČR (Stefajir, 2011). Nádorové onemocnění je způsobeno kombinací genetických faktorů a faktorů okolního prostředí. Mechanismus vzniku nádorů spočívá v nekontrolovatelném bujení tkáně, ztrátě schopnosti diferenciaci, prorůstáním do zdravé tkáně jedince a následně schopností vytvářet metastázy. Nádory se dělí na **nezhoubné (benigní)**, které bývají přesně ohraničené od normální tkáně, rostou pomalu a netvoří metastázy. Nádory **zhoubné (maligní)**, které se tvoří rychle a nekontrolovatelně, proliferují do buněk okolní tkáně a metastazují (Hampl a kol., 2011, s. 379). Za buněčnou proliferaci jsou zodpovědné mutageny a karcinogeny, které způsobují mutaci genu, inhibují tumor supresorové geny, aktivují onkogeny a vedou ke změně genotypu buňky, což má za následek nekontrolovatelné množení (Hampl a kol., 2011, s. 379).

Rakovina nejčastěji postihuje kůži, plíce, prsa, trávicí trakt a také mužské pohlavní orgány (Tichý, 2018).

### Typologie nádorů

- karcinomy (epitelová tkáň) - ektodermálního a entodermálního původu,
- sarkomy (pojivová tkáň) – kosti, chrupavka, svaly apod,
- leukémie (krvetočná tkáň) – zhoubný nádor se tvoří v kostní dřeni, kde způsobuje maligní postižení leukocytů (bílých krvinek),
- lymfomy (lymfatická) – nádory, které vycházejí z lymfocytů,
- blastomy (zárodečná tkáň) – které vznikají z nezralých krevních buněk (Hofmanová, 2013)

#### 1.1.1 Chemoterapie nádorových onemocnění

V závislosti na typu a stádiu onemocnění se při léčbě nádorů uplatňuje léčba chirurgická, radioterapie, chemoterapie a imunoterapie. Nejčastěji se však jedná o kombinaci více terapeutických postupů. Cílem je zajištění optimálního farmakoterapeutického účinku při minimální toxicitě a za současné prevence vývoje rezistence (Lincová a kol., 2005, s. 498).

Navzdory zvýšeným investicím do výzkumu a vývoje nových chemoterapeutických přípravků zůstává úspěšnost léčby u pacientů s akutní T-lymfocytární leukémií (dále jen T-ALL) nízká a terapeutické možnosti jsou omezené (Folber a kol., 2011). Hlavním principem účinného léčebného postupu je zajištění optimálního farmakoterapeutického účinku. Cílem je podávání jednotlivých látek pro určitý typ nádoru tak, aby docházelo k co nejmenšímu překrývání se škodlivých účinků jednotlivých cytostatik (HYNIE, 2001, s. 373). Závažným problémem je rezistence na cytostatickou léčbu, která může být primární, kdy nádor projevuje nedostatečnou odpověď na první chemoterapeutickou léčbu anebo sekundární, která nastupuje po předchozí léčbě a je vyvolána mnoha příčinami. Jedná se o mnohočetnou rezistenci, kdy dochází k nadměrné expresi transmembránového P-glykoproteinu, který aktivně eliminuje transport cytostatik ven z buňky, čímž dochází ke snížení protinádorového účinku (Perlík, 2011, s. 142).

## 1.2 CYTOSTATIKA

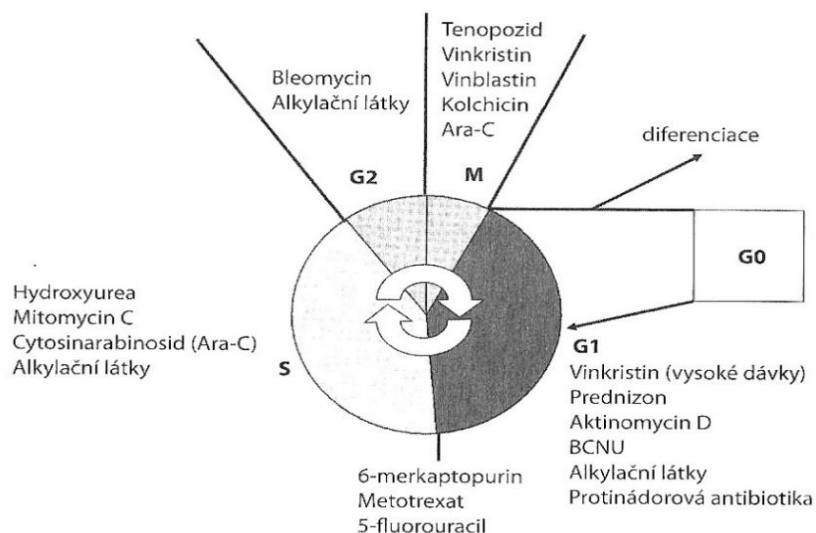
Cytostatika jsou látky označované jako protinádorová chemoterapeutika, která zpomalují či zastavují růst nádorových buněk nebo dokonce způsobují jejich destrukci. Nevýhodou použití těchto látek je poměrně nízká selektivita k nádorovým buňkám čímž dochází k poškození i zdravých buněk jedince (např. buňky kostní dřeně a buňky střevní sliznice) (Perlík, 2011, s. 139).

### 1.2.1 Klasifikace cytostatik

Cytostatika můžeme klasifikovat z hlediska vícero aspektů:

- cytostatika ovlivňující nádorovou buňku v konkrétní fázi buněčného cyklu, **fázově specifická**, která postihují určité fáze cyklu (Obr. 1) anebo **fázově nespecifická**, která postihují buněčný cyklus ve všech jeho fázích
- cytostatika dle mechanismu účinku

Častější je však dělení vycházející z jejich mechanismu účinku (Slíva a kol., 2011, s. 271).



Obr. 1: Klasifikace fázově specifických cytostatik (Slíva a kol., 2011, s.272)

### 1.2.2 Alkylační činidla

Tato skupina cytostatik je jedna z nejčastěji používaných léčiv. Jsou to vysoce reaktivní sloučeniny, ve své molekule zejména obsahují bis-(chlorethyl)amin, který způsobuje výraznou regresi tumorů lymfatického systému (Hampl a kol., 2011, s. 381).

Princip těchto látek spočívá v tom, že se kovalentně vážou na řetězce DNA, a to jak maligních, tak i normálních buněk a inhibují tak její funkci i dělení buněk. To způsobuje jejich smrt (Hynie, 2001, s. 367).

Dalšími známými analogy bis-(chlorethyl)aminu jsou například fosforové analogy jako jsou *cyklofosfamid*, *ifosfamid*, které jsou v organismu metabolicky přeměňovány na akrolein, který poškozuje močový systém (Hynie, 2001, s. 368).

Dále sem můžeme zařadit *chlorambucil*, *melfalan* *busulfan* anebo i *deriváty nitrosomočoviny*, jimiž jsou *karmustin*, *lomustin*, *fotemustin*, které se ve fyziologickém prostředí přeměňují na 2-chlorethyldiazonový kation a tím snadno pronikají do centrální nervové soustavy. Díky své dobré rozpustnosti v tucích jsou uplatňovány při mozkových nádorech (Lincová a kol., 2005, s. 503).

Další významnou a početnou skupinou cytostatik jsou deriváty platiny (*cis-platina*, *oxaliplatin* a *karboplatina*), které jsou blíže popsány v kapitole 2.1.

### 1.2.3 Antimetabolity

Antimetabolity jsou látky, které se podobají přirozeným metabolitům, což jim umožňuje vstup do buněčných reakcí, kde inhibují syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Dle chemické struktury se dělí na **analogy kyseliny listové**, **analogy purinů** a **analogy pyrimidinů** (HAMPL a kol., 2011, s. 388).

Hlavním analogem kyseliny listové je *methotrexát*, který inhibuje enzym dihydrofolátreduktázu a tím znemožňuje redukci kyseliny listové (folátu), čímž je následně zastavena tvorba DNA. Jeho uplatnění se najde v některých typech leukémií a lymfomů (Slíva a kol., 2011, s. 272).

Uměle připravené purinové analogy jsou pozmeněné molekuly purinových bází, které se zabudovávají do buněčné struktury DNA nebo RNA a tím se stávají toxickými. Nejznámější zástupce je *6-merkaptopurin*, kde jeho metabolity brání syntéze stavebních kamenů pro DNA a RNA. Využívá se při léčbě akutních leukémií. Obdobně působí i strukturální analogy pyrimidinů, mezi které patří *cytabarin*, který se využívá na léčbu akutní myeloidní leukémie a v kombinaci s *5-fluorouracil* s jinými cytostatiky se uplatňuje v léčbě nádorů prsu, vaječníků a gastrointestinálního traktu (Hynie, 2001, s. 367).

### 1.2.4 Inhibitory mitózy

Jsou to převážně látky rostlinného původu, které způsobují poškození struktury mikrotubulů a zabraňují buněčnému dělení, zejména inhibicí mitotického vřeténka. Často se také nazývají jako mitotické „vřeténkové“ jedy. Patří sem alkaloidy z *Vinca rosea*, které se pevně vážou na buněčné mikrotubuly a inhibují jejich polymeraci, např. *vin kristin*, který hraje svou roli především v kombinaci s jinými cytostatiky a *vinblastin*, který se zase používá u nádorů varlat. Dalšími polosyntetickými deriváty jsou *vindesin* a *vinorelbin*, které se uplatňují u karcinomu prsu a u karcinomu průduškového původu (Lincová a kol., 2002, s. 508-509). Další alkaloidy se nazývají **taxany**. Jsou to cytostatika přírodního původu, jedná se zejména o látky **paklitaxelu**, který je extrahován z tichomořského tisu a **docetaxelu**, který je izolován z tisu červeného. Taxany způsobují inhibici depolymerizace mikrotubulů a vedou k tvorbě atypických mikrotubulů. Následkem je inhibice mitózy. Nejpoužívanější z nich jsou *paklitaxel* a *docetaxel* (Slíva a kol., 2011, s. 273).



### 1.2.5 Inhibitory topoizomerázy

Inhibitory topoizomerázy blokují rozdělení DNA při mitóze. Hlavním zástupcem topoizomerázy II je *etoposid*, který způsobuje poruchy rozdělení dvou vláken DNA. Dalšími látky jsou *topotekan* a *irinotekan*, což jsou inhibitory topoizomerázy I, která brání rozdělení vláken DNA (Slíva a kol., 2011, s. 273).

### 1.2.6 Interkalační látky

Jde o interkalační cytostatika, která se vmezeřují (interkalují) nekovalentní vazbou mezi obě vlákna DNA, přičemž tak zabraňují její replikaci a transkripci a také způsobují inhibici topoizomerázy. Do těchto látek můžeme zahrnout antracykliny (cytotoxická antibiotika) jako jsou *doxorubicin*, *epirubicin*, *idarubicin* nebo aktinomyciny *daktinomycin*, *bleomycin* či *mitomycin* (Slíva a kol., 2011, s. 273).

### 1.2.7 Hormonální cytostatika

Jako další látky se v léčbě nádorových onemocnění využívají deriváty některých hormonů a jejich antagonistů (Hampl a kol., 2011, s. 391).

V léčbě rakoviny ženského ústrojí se uplatňují především antiestrogeny *tamoxifen*, *toremifen* a rakoviny prsu inhibitor periferní aromatázy ovlivňující přímou tvorbu estrogenu nazýván *exemestan*. Při karcinomu prostaty se využívá analog gonadoliberinu (analog hypothalamického hormonu) *leuprolerin*, *goserelin* (Slíva a kol., 2011, s. 277).

### 1.2.8 Ostatní protinádorová léčiva

*Asparagináza*, jedná se o enzym izolovaný např. z *Escherichia coli* katalyzující hydrolyzu L-asparaginu na kyselinu asparagovou a amoniak. Nedostatek této aminokyseliny způsobuje omezení buněčné proliferace. V kombinaci s jinými chemoterapeutiky se používá u akutní lymfoblastické leukemie (Slíva a kol., 2011, s. 277). *Mitotan*, je látka s cytotoxickým účinkem, která je derivátem nejznámějšího insekticida DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan) a inhibuje tvorbu glukokortikoidů v kůře nadledvin, využívá se při léčbě karcinomu nadledvin (Slíva a kol., 2011, s. 278).

*Tretinoin* (kys. *all-trans retinová*) a *isotretinoin* (kys. *cis-retinová*) jsou retinoidy vitamínu A. Působí na vyzrávání bílých krvinek a používají se u některých nádorů i na léčbu akné. *Estramustin* je hormonální cytostatikum, které je součástí bis(chlorethyl)aminu a je navázán na hormonální nosič 17-beta-estradiol. Estramustin se kumuluje v prostatě, kde má dvojí účinek, a to jak cytotoxický, tak antimitotický. Je využíván u karcinomu prostaty.

***Hydroxyurea***, je obdoba močoviny, která blokuje syntézu a opravu DNA, tím že blokuje ribonukleotidreduktázu. Je využívána u chronické myeloidní leukemie nebo karcinomu cervixu (Slíva a kol., 2011, s. 277).

## 2 CYTOSTATICKY AKTIVNÍ KOMPLEXY PŘECHODNÝCH KOVŮ

Koncentrace kovů v těle je úzce řízena a modulována buňkami a tkáněmi v důsledku reaktivity přechodných kovů v biologickém prostředí. Ve skutečnosti je koncentrace kovových iontů v buňkách vysoce regulována a jejich nevyváženost je spojena s několika onemocněními, mezi které patří rakovina. Mechanismus, kterým komplexní sloučenina uskutečňuje svůj účinek na buňku, není jednoznačně znám. Na základě empirických studií lze mechanismus účinku popsat některým ze 7 uvedených případů a to:

- přímá vazba kovového fragmentu na cíl (buňku),
- kov má strukturální úlohu a vazba k biologickému cíli nastává prostřednictvím nekovalentních interakcí,
- aktivita a asimilace je způsobena organickými ligandy, kov je nosič pro jejich podávání *in vivo*,
- kovové centrum způsobuje poškození buněk produkcí reaktivních druhů kyslíku (ROS),
- komplexní sloučenina je fotoaktivní a chová se jako fotosenzibilizátor,
- přechodný kov je radiační zesilovač nebo je radioaktivní (např. Ra, Rn, Po, U, Th apod.) (Martins a kol., 2014, s. 1199-1212).

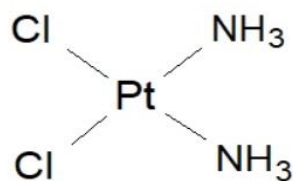
### 2.1 Platinové komplexy

Objev cytostatické aktivity platinových komplexů představuje výchozí bod pro další studium antitumorové aktivity komplexů přechodných kovů. Zařazení této skupiny cytostatik není jednoznačné, ale vykazují podobný mechanismus účinku jako alkylační léčiva (Kostova, 2005, 1, 1-22). Používají se v léčbě karcinomu děložního hrdla, vaječníků, varlat, hlavy a krku, prsu, močového měchýře, žaludku, prostaty, plic a další (Ndagi a kol., 2017, s. 600, 599-616).

#### 2.1.1 Cisplatina

Komplex *cis*-diaminodichlorplatnatý (*cis*-DDP) je tvořen jedním, dvojmocným atomem platiny, dvěma chloridovými ionty v poloze *cis* a dvěma molekulami amoniaku (Obr. 2). Vývoj *cis*-DDP jako úspěšného protinádorového léku je často považován za prototypový úspěch. Velký počet pacientů, kteří byli léčeni pomocí *cis*-DDP, je působivý. Antitumorový účinek je zprostředkován reakcí s DNA. Vytvořením stabilních křížových vazeb s DNA,

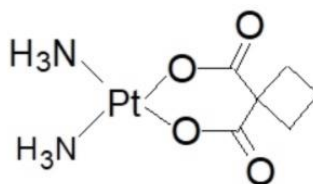
blokováním replikace DNA a indukováním buněčné smrti aktivací supresorového proteinu p53 a proteinu p73 (Markowska a kol., 2015, s. 272, 272-275).



Obr. 2: Strukturální vzorec *cis*-DDP

### 2.1.2 Karboplatina

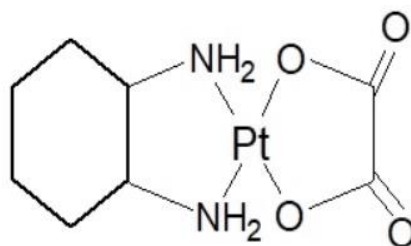
Karboplatina, (*cis*-diammin-(1,1-cyklobutandikarboxylato) platnatý komplex), obr. 3), je méně reaktivnější vůči DNA než *cis*-DDP. Prokazuje však menší nežádoucí účinky u onkologických pacientů, používá se zejména u nádorů gonád, plic, ORL, sarkomů (Knox a kol., 1986, s. 46, 1972-1979).



Obr. 3: Strukturální vzorec karboplatiny

### 2.1.3 Oxaliplatina

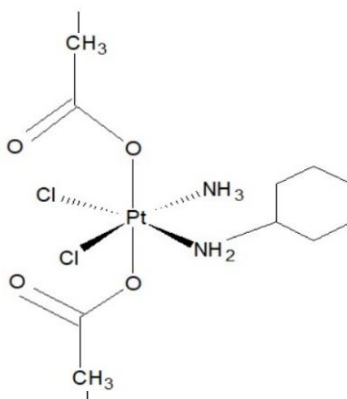
Jedná se o 1R,2R-diammin-cyklohexan-oxalátoplastatný komplex (DACH, obr. 4), který se v klinické praxi nazývá oxaliplatina. Oxaliplatina byla nejprve schválena pouze ve Francii v roce 1996 a poté byla formálně dostupná v zemích Evropy v roce 1999 a v USA v roce 2002. Oxaliplatina je registrována jako lék pro kombinovanou chemoterapii s jinými chemoterapeutickými přípravky při léčbě rakoviny tlustého střeva a nemalobuněčného karcinomu plic. Tento lék má lepší bezpečnostní profil než *cis*-DDP, proto se používá u pacientů, kteří nemohou být léčeni *cis*-DDP (Ndagi a kol., 2017, s. 603, 599–616).



Obr. 4: Strukturální vzorec oxaliplatin

### 2.1.4 Satraplatina

Satraplatina (tetraplatina) vzorcem *bis*-(acetát)-amin-dichlor-cyklohexylamin platičitan (Obr. 5) je sloučenina platiny s oxidačním číslem +IV a slouží jako prekurzor pro sloučeniny Pt (II). Její předností je vysoká kinetická stabilita léčiva vzhledem k jejím analogům Pt (II). Dva další ligandy na oktaedrickém kovovém centru nabízejí mnoho možností pro modifikaci farmakokinetických parametrů. Protože intracelulární redukce platiny (IV) na platinu (II) je pravděpodobně nezbytná pro aktivaci a následnou cytotoxicitu. Proto tyto prekurzory poskytují lepší způsoby transportu aktivního komplexu cílové nádorové buňce (Bruijninx a kol. 2008, s. 12). Satraplatina je také prvním perorálně dostupným platinovým léčivem (Ndagi a kol., 2017, s. 605, 599-616).



Obr. 5: Strukturální vzorec satraplatiny

### 2.1.5 Další analoga platiny

Od 80. let bylo vyvinuto mnoho dalších platinových derivátů, které se uplatňují přibližně v 50-70 % léčebných schématech užívaných k léčbě onkologických pacientů. Přestože léčba platinovými léky je doprovázena závažnými vedlejšími účinky, považují se tyto komplexy za „trháky“ ve farmaceutickém průmyslu. Vzhledem k současnému pokroku v léčbě rakoviny došlo v roce 2012 k 8,2 milionů úmrtí na rakovinu z celkového počtu 14,1 milionů u pacientů s rakovinou a většina současně užívaných chemoterapeutických látek, jako

je *cis*-DDP, je vysoce toxická, což otevírá nové možnosti syntézy a charakterizace nových léčiv se sníženou toxicitou a vysokým terapeutickým indexem (Martins a kol., 2014, s. 1199-1212).

Na tomto základě byla odvozena řada alternativních platinových derivátů, jako **ormaplatina**, **aroplatina**, **enloplatina**, **zeniplatina**, **sebriplatina**, **miboplatina**, **picoplatina**, **iproplatina**, avšak nejsou tolik známy. Dále nově syntetizované deriváty **nedaplatina**, která byla schválena pro klinické využití v praxi v Japonsku a **lobaplatina**, která byla schválena pro použití v Číně.

## 2.2 NEPLATINOVÉ KOMPLEXY

Bylo prokázáno, že biologická aktivita a mechanismus působení sloučenin přechodných kovů mohou být ovlivňovány přítomným kovem, jeho oxidačním stavem a ligandy. Je uvedeno, že pro velkou většinu komplexních sloučenin je antitumorová aktivita spojena s vazbou kovového centra kovu na cílové proteiny anebo DNA.

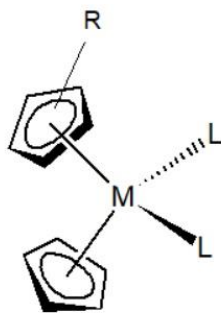
V tab. 1 jsou uvedeny a zvýrazněny komplexy vykazující vysokou antitumorovou aktivitu.

**Tab. 1: Cytostaticky aktivní komplexy vykazující antitumorovou aktivitu**

IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<b>Ti</b>	<b>V</b>	Cr	Mn	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	Ni	Cu
Zr	<b>Nb</b>	<b>Mo</b>	<b>Tc</b>	<b>Ru</b>	<b>Rh</b>	Pd	<b>Ag</b>
Hf	Ta	<b>W</b>	<b>Re</b>	<b>Os</b>	<b>Ir</b>	<b>Pt</b>	<b>Au</b>

### 2.2.1 Lomené metalloceny

Lomené metalloceny kovů 4. skupiny (Ti, Zr, Hf) a skupiny 5.-7. (Nb, Ta, Mo, W, Re, Tc) mají lomenou molekulu. Jejich molekula je tvořena centrálním atomem M, na který jsou vázány dva bis(cyklopentadienové) kruhy (Cp) a dva acidoligandy (L). Ligandy mohou být (Cl, Br, I, CN, SCN...), obecný vzorec lomených metallocenů je Cp<sub>2</sub>ML<sub>2</sub> (Obr. 6).



**Obr. 6: Obecná struktura lomených metalocenů**

**Kde:** M = centrální atom kovu, L = acidoligand, R = substituent

Lomené metalloceny díky své variabilní substituci Cp kruhu a acidoligandů poskytují mnoho kombinací pro vylepšení jejich biologických vlastností. Vliv modifikace cyklopentadienylových kruhů různými organickými substituenty je na cytotoxicitu velmi výrazná. Další možností, avšak s nízkým vlivem na cytotoxicitu může být výměna chloridového ligandu za jiný halogenid či pseudohalogenid. Lomené metalloceny mají obdobné strukturní parametry jako *cis*-DDP, proto se staly první studovanou alternativou léčiv na bázi platiny (Houser, 2010, s. 117).

Počátkem 80. let Köpf-Maier a Köpf zkoumali biologickou aktivitu obsáhlé řady lomených metallocenů  $Cp_2MX_2$  (M = Ti, V, Nb, Mo; X = dihalogenidy). Metallocendihalogenidy jsou schopny modifikovat molekuly na různých místech (Obr. 6). Bylo zjištěno, že metallocendihalogenidy působí na širokou škálu myších a lidských nádorů, a to s nižším toxickým účinkem než cisplatina (Meléndez, 2012, s. 36-52).

Největší cytostatickou aktivitu vykazovaly metallocenové sloučeniny s centrálním atomem Ti (Ar = 47,87), V (Ar = 50,94), Fe (Ar = 55,85), Nb (Ar = 92,91), Mo (Ar = 95,95) jejichž antitumorová aktivita klesá s rostoucí atomovou hmotností. Nejnižší aktivitu prokázaly sloučeniny s atomem Ta (Ar = 180,95) a W (Ar = 183,84) a Zr (Ar = 91,22) s Hf (Ar = 178,49) byly zcela neúčinné (Köpf-Maier a Krahl, 1983, s. 44, 317-28).

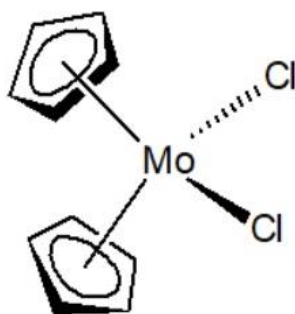
Köpf-Maier a Köpf ze svých předcházejících pokusů zjistili, že titanocen dichlorid ( $Cp_2TiCl_2$ , TDC) byl neaktivnější metallocen *in vitro*, ale jeho nízká hydrolytická stabilita bránila tomu, aby byl důkladně studován (Köpf-Maier a Krahl, 1983, s. 44, 317-28).

## 2.2.2 Sloučeniny molybdenu s cytotoxickým účinkem

Molybden je nezbytným stopovým kovem pro organismy, hraje klíčovou úlohu jako kofaktor pro důležité enzymy (v proteinech obsahující síru) a enzymatických reakcí, které jsou zodpovědné za metabolismus Fe a detoxikaci sulfidů (Bandarra a kol., 2010, s. 1171-1177). Množství sloučenin Mo vykazuje karcinostatickou aktivitu vůči nádorovým buňkám jako je např. karcinom prsu nebo jícnu. Účinnost proti nádorovým buňkám byla popsána u sloučenin  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , heteropolykyseliny molybdenových solí, polyoxomolybdenáty a Mo komplexy vázané na malé karboranové ligandy. V roce 2000, Halletal a kol. poukázali na to, že molybdenové komplexy, které jsou navázány na malé karboranové ligandy,  $\text{C}_2\text{B}_4$  nebo  $\text{C}_2\text{B}_3$  vykazují na myších a lidských kultivovaných buňkách silné cytotoxické účinky proti leukémii a lymfomům a překvapivě také proti vybraným solidním nádorům (Matos a kol., 2008, s. 1-6).

Mechanismus působení většiny komplexů molybdenu není zcela znám. Je, ale zřejmé, že inhibiční aktivita souvisí s poškozením DNA, což je způsobeno přímým působením na molekulu DNA, například interkalací dvoušroubovice nebo oxidačním účinkem vzniklých volných radikálů kyslíku (Bandarra a kol., 2010, s. 1171-1177).

Zvláště důležitá je řada derivátů molybdenocen dichloridu (Obr. 7). Zdá se, že tyto sloučeniny působí koordinací na řadu biomolekul, z nichž většina jsou proteiny. Ve skutečnosti bylo identifikováno několik možných cílů, které podporují pozorovanou antiproliferační aktivitu, jako je koordinace s tubulinem, interakce s lidským sérovým albuminem, inhibice proteinkinázy C a štěpení DNA (Martins a kol., 2014, s. 1199-1212).



Obr. 7: Molybdenocen dichlorid



Molybdenocen dichlorid ( $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$ , MDC) je za fyziologických podmínek hydrolyticky stabilnější než TDC (Meléndez, 2012, s. 4-12).

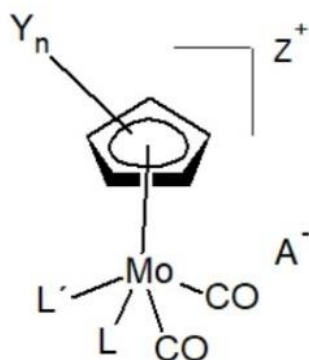
Mechanismus účinku  $\text{Cp}_2\text{MoCl}_2$  podobně jako u ostatních metallocenů není zcela znám. Marks a kol. se domnívají, že inhibice proteinkinázy C (enzym, který reguluje buněčnou proliferaci) by mohl být jeden z účinků MDC, který by mohl vyvolat protinádorovou aktivitu (Meléndez, 2012, s. 4-12).

Nedávno byla vyvinuta analytická metoda ICP-AES. Tato metoda umožňuje stanovit vazebné interakce kovu a pomocných ligandů molybdenocenové sloučeniny s DNA. Slouží k určení množství molybdenu připojeného k DNA za pomoci buněk telecího brzlíku a dialýzy, která upravuje vzorek pro co nejpodobnější prostředí buňky. Bylo zjištěno, že z aplikované molybdenocenové sloučeniny se na DNA váže okolo 5-10 %, zatímco TDC se váže okolo 90-95 % (Meléndez, 2011, s. 4-12). Ačkoliv je tato vzniklá interakce slabá a nestabilní, je přesto možné, že pomocné ligandy hrají důležitou roli ve vazbě molybdenocenu na DNA. Rodríguez a kol. poukazují na to, že glutathion (GSH) z mechanistického hlediska je možným nosičem Mo (IV) v krvi a vyloučili tak DNA jako cílovou složku účinku molybdenocenových sloučenin (Rodríguez a kol., 2004, s. 576).

Harding a kol. prokázali, že GSH (intracelulární tripeptid zodpovědný za reakci s elektrofilními cytotoxickými léky) s  $[\text{Cp}_2\text{Mo}^+]$  tvoří stabilní adukt  $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{GS})_2$  a domnívají se, že hraje důležitou roli v mechanismu účinku MDC. Další experimenty naznačují, že MDC na rozdíl třeba od vanadocen dichloridu (VDC) je schopný koordinace k nukleobázím, nukleosidům a nukleotidům (Meléndez, 2011, s. 4-12).

### **2.2.3 Monocyklopentadienylové a indenylové komplexy molybdenu**

Dále byla zkoumána biologická aktivita u cyklopentadienylových komplexů molybdenu. Charakteristický vzorec těchto sloučenin (Obr. 8), kde ring (Cp) představuje buď cyklopentadienylovou nebo indenylovou skupinu,  $\text{Y}_n$  představuje substituent, kterým může být alkyl, alken, aryl, halogen,  $\text{C}(\text{O})\text{R}$ ,  $\text{CHR}\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $\text{CHROH}$ , kyano anebo nitro skupina. L a L' představují buď dva nezávislé ligandy koordinované prostřednictvím halogenidů nebo donorových atomů C, N, O, P, S.  $\text{Z}^+$  představuje celkový náboj  $\text{Mo}^{\text{II}}$  komplexu.  $\text{A}^-$  je vhodný kompenzující aniont (Matos a kol., 2008, s. 1-6).



**Obr. 8: Struktura komplexu molybdenu**

**Kde:** Y = cyklopentadienyl nebo indenyl,  $Z^+$  = celkový náboj komplexu,  $A^-$  = aniont

Romaea a kol. zavedli cyklopentadienyl a indenyl v molybdenových sloučeninách s N, N' chelatujícím ligandem jako novou skupinu vysoce cytotoxických druhů proti několika nádorovým buněčným liniím. Následující studie rozšířily řadu cytotoxických účinných látek a přinesly včasný přehled o mechanismu jejich působení. Zdá se, že cytotoxicita sloučenin molybdenu souvisí hlavně s povahou koordinovaného chelatačního ligandu. Byla pozorována vysoká aktivita u komplexů obsahujících 1,10-fentantrolin a jeho 4,7-difenylový derivát (Mrózek a kol., 2016, s. 519-529).

#### **2.2.4 Akutní lymfoblastická leukémie a buněčná linie MOLT- 4**

Leukemická onemocnění se dělí dle typu zmnožení bílých krvinek na myeloidní, kde je postižena vývojová řada monocytů či granulocytů, a lymfoidní, která postihuje tvorbu lymfocytů. Do dělení také zasahuje, které vývojové stádium hematopoézy je postiženo. U akutního onemocnění jsou postiženy buňky v raném vývojovém stádiu ve formě blastů, který je charakterizováno rychlým nástupem onemocnění, kdežto u druhé formy, chronické, jsou postiženy zralé buňky a onemocnění probíhá po dlouhou dobu bezpříznakově. Na základě tohoto dělení rozlišujeme 4 typy leukemií, a to akutní myeloidní leukémie (AML), akutní lymfatická leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML) a chronická lymfocytární leukémie (CLL).

Jednou z nejčastěji diagnostikovanou leukémií převážně v dětském věku okolo 1-5 let je **akutní lymfoblastická leukémie T-lymfocytů**. U dospělých T-ALL představuje jen 1 % nádorových onemocnění a tvoří asi 20 % všech akutních leukemií. T-ALL je neustále se vyvíjející a agresivní hematologický nádor.

Jednotlivé druhy leukemií od sebe odlišujeme pomocí imunofenotypizační diagnostiky za využití CD znaků (z ang. Cluster of Differentiation) společným znakem leukemií je CD pozitivita těchto povrchových buněčných antigenů: CD1, CD2, CD3, CD4 a CD8 (Folber a kol., 2011).

Jako modelový systém v této bakalářské práci byla použita buněčná linie MOLT-4, odvozená právě od lidské akutní T-lymfocytární leukémie. Buněčná linie na svém povrchu exprimuje tyto CD znaky: CD1 (49 %), CD2 (35 %), CD3 A (26 %) B (33 %) C (34 %), CD4 (55 %), CD5 (72 %), CD6 (22 %), CD7 (77 %) (Foltánová, 2010, s. 33).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

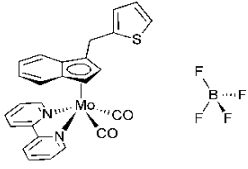
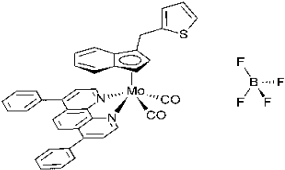
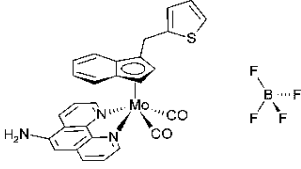
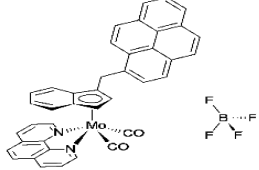
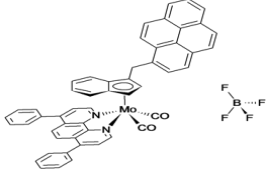
### 3.1 Použité přístroje a pomůcky

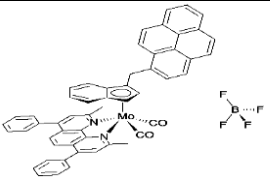
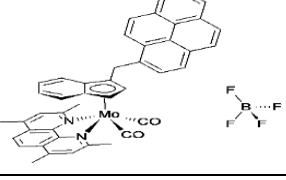
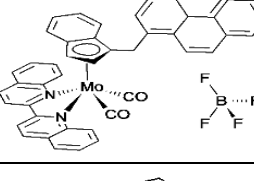
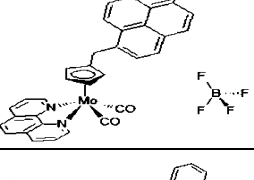
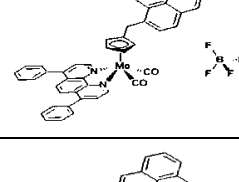
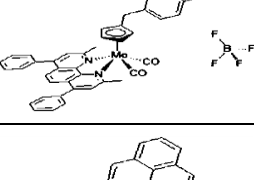
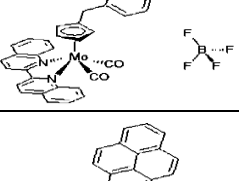
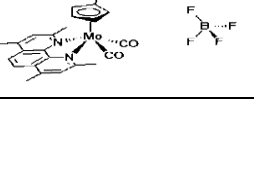
- Světelný mikroskop TMS CFWE 10xA/18 (NIKON, Japonsko) – max. zvětšení 160x
- Laminární box Heraeus typ HS 12, (Geprüfte Sicherheit, Německo)
- Spektrofotometr Tecan, PRO INFINITY 200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko) - režimy měření: intenzita fluorescence, luminiscence, fluorescenční rezonanční přenos energie, absorbance
- Inkubátor CO190TC, CO<sub>2</sub> incubator (Hepa, Nizozemsko) - teplotní rozsah: 5-50 °C, koncentrace CO<sub>2</sub>: 0,1- 20 %, relativní vlhkost: až 95 % při 37 °C
- Centrifuga Universal 32R, (Hettich zentrifugen, Německo) – max. rychlost 15 000 ot/min
- Lednička a mraznička (Liebherr Premium, Německo) – výkon 0,747 kWh/24 h
- Plynový kahan (TRIGON PLUS, ČR) – teplota plamene 1300 °C
- Analytické váhy ABJ 220- 4M (KERN, Německo) – váživost 220 g
- Sada plastových zkumavek (PPT, Nizozemsko) – rozsah objemu: 15 ml, 50 ml
- Polypropylenová zkumavka typu Eppendorf (Sarstedt, Německo) – 1,5 ml
- Sada plastových špiček (PPT, Nizozemsko) – rozsah objemu: 0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-100 µl
- Mikrotitrační destička Corning 96 Flat Transparent Polystyrol (PPT, Nizozemsko) – rovné dno
- Počítací komůrka dle Bürkera (Meopta, USA) – hloubka 0,1 mm, plocha sítě 9 mm<sup>2</sup>
- Sada jednokanálových pipet (Eppendorf AG, Německo) – pipetovací objem: 0,2-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 100-1000 µl
- Dávkovací pipetor, Multipette M4 (Eppendorf, Německo) – jednokanálový, rozsah objemu: 1 µl – 10 ml
- Inkubační lahve (PPT, Nizozemsko) – objem 25 cm<sup>3</sup>, 75 cm<sup>3</sup>

## 3.2 Chemikálie a roztoky

- Iskova modifikace Dulbecova média (dále jen IMDM) dodáváno od firmy Biosera (Francie). Kompletní kultivační médium (dále jen KM) pro buňky MOLT-4 bylo připraveno smícháním 39 ml IMDM, 10 ml fetálního telecího séra), 0,5 ml L-glutaminu a 0,5 ml penicilinu/streptomycinu, (vše od Sigma-Aldrich, USA).
- Trypanová modř od firmy Sigma Aldrich (USA) připravená jako 0,5 % vodný roztok Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide.
- Sterilní fosfátový pufr PBS od firmy PAA laboratories GmbH (Rakousko), pH 7,4.
- WST-1 činidlo od firmy Roche Applied Science (Švýcarsko).
- DMSO od firmy Sigma Aldrich (USA).
- Sloučeniny molybdenu, které poskytla Katedra obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice jsou uvedeny v *tab. 2*.

**Tab. 2: Tabulka testovaných komplexů molybdenu**

1	MoS1		Mr = 606,3
	MoS2		Mr = 769,5
	MoS3		Mr = 645,9
2	MoP1		Mr = 748,4
	MoP2		Mr = 900,6

	MoP3		Mr = 928,6
	MoP4		Mr = 804,5
	MoP5		Mr = 824,5
3	Mo1		Mr = 697,3
	Mo2		Mr = 849,5
	Mo3		Mr = 877,6
	Mo4		Mr = 773,4
	Mo5		Mr = 753,4

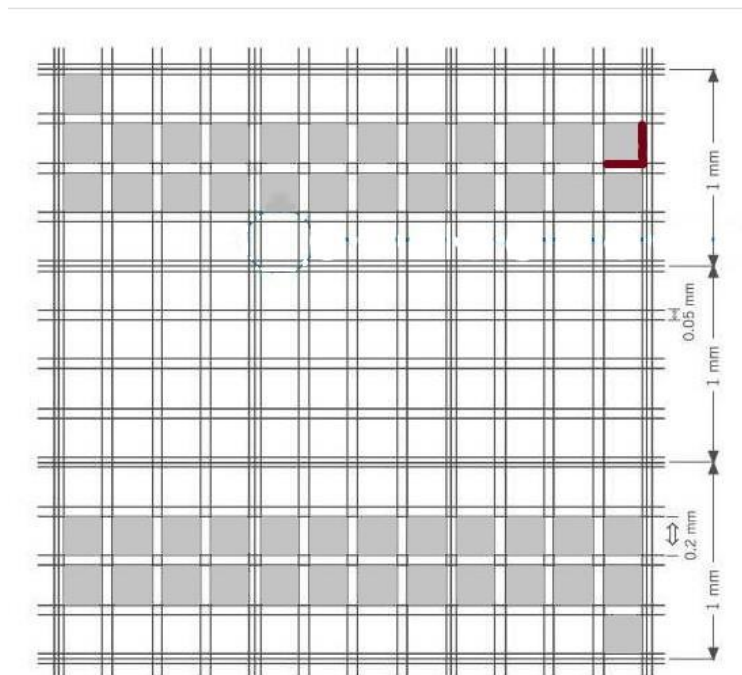
### 3.3 Metodická část

#### 3.3.1 Kultivace buněčné linie MOLT-4

K testování cytotoxické aktivity molybdenových komplexů byly vybrány suspenzní buňky T-lymfocytární leukémie linie MOLT-4, které byly získány z ECACC (Velká Británie). Kultivace buněk MOLT-4 byla provedena v KM za aseptických podmínek při 37°C v kontrolované atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.2 Stanovení počtu buněk buněčné linie MOLT-4

Stanovení počtu buněk bylo provedeno za využití barvení trypanové modří. Do zkumavky typu eppendorf bylo z kultivační lahve napipetováno 50 µl dobře promíchané buněčné linie MOLT-4 a bylo přidáno stejné množství barviva trypanové modří, celý obsah byl dobře promíchán. Po promíchání byla naplněna Bürkerova komůrka a byly spočítány živé i mrtvé buňky v 50 čtvercích, přičemž bylo dodržováno pravidlo dvou stran (Obr. 9).



Obr. 9: Zobrazení Bürkerovy komůrky (Porcinas, 2018)

**Kde:** Šedě je označeno 50 čtverců, v kterých počítáme buňky, které se dotýkají červeně zvýrazněných stran, aby bylo zachováno pravidlo dvou stran.

### 3.3.3 Příprava buněčné suspenze

Před začátkem testování byl spočítán v Bürkerově komůrce pod mikroskopem aktuální počet buněk MOLT-4. Za pomoci KM bylo upraveno množství buněk MOLT-4 tak, aby výsledná koncentrace byla  $3 \times 10^6$  buněk MOLT-4 v 10 ml kultivačního média.

### 3.3.4 Příprava roztoků testovaných komplexů

K rozpuštění testovaného komplexu bylo použito nepolární rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO). Navážka testovaného komplexu o hmotnosti 2 mg, byla rozpuštěna v 50  $\mu$ l DMSO, poté byl DMSO zředěn pomocí 450  $\mu$ l KM na výsledný objem 500  $\mu$ l, tento roztok byl označen jako zásobní roztok. Množství použitého DMSO bylo limitováno kvůli jeho toxicitě na buněčné linii a jeho schopnosti narušovat integritu buněčné membrány viz kapitola 3.4.

Pro stanovení cytotoxického účinku syntetizovaných komplexů molybdenocenu na buněčné linii MOLT-4 byly použity dále pro každý testovaný komplex 2 roztoky a to 100  $\mu$ mol/l roztok A a 5  $\mu$ mol/l roztok B, které byly nadále ředěny do mikrotitrační destičky. Za pomoci **vzorce 1** byla vypočítána koncentrace testované sloučeniny v zásobním roztoku.

**Vzorec 1** – Vzorec pro výpočet koncentrace zásobního roztoku

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

**Kde:** c je koncentrace zásobního roztoku testované sloučeniny ( $\mu$ mol/l), m je hmotnost testované sloučeniny (mg), M je molární hmotnost testované sloučeniny (g/mol) a V je objem, který byl stanoven pro zásobní roztok (ml)

Pomocí **vzorce 2** bylo spočítáno, jaké množství zásobního roztoku má být odebráno, abychom získaly 1200  $\mu$ l roztoku A o koncentraci 100  $\mu$ mol/l.

**Vzorec 2** – Vzorec pro výpočet objemu roztoku A

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

**Kde:**  $c_1$  je koncentrace roztoku A (100  $\mu$ mol/l),  $V_1$  je objem roztoku A (1200  $\mu$ l),  $c_2$  je vypočítaná koncentrace zásobního roztoku pomocí vzorce 1,  $V_2$  ( $\mu$ l) je potřebný objem zásobního roztoku

Roztok B o koncentraci 5  $\mu$ mol/l byl připraven pomocí **vzorce 2**, ale k ředění byl použit 100  $\mu$ mol/l roztok A.



### 3.3.5 Příprava mikrotitrační destičky

Stanovení cytotoxického účinku testovaných sloučenin bylo provedeno v mikrotitrační destičce, která se skládá z 96 jamek. Na jedné mikrotitrační destičce byly testovány 2 vzorky komplexů. Uspořádání mikrotitrační destičky je znázorněno viz *tab. 3*. Cytotoxicita komplexů byla testována v koncentracích 0,1; 0,4; 0,7; 1,5; 2,5; 4; 9; 15; 27 a 50  $\mu\text{mol/l}$ . Do každé jamky podle *tab. 4* byl napipetován příslušný objem KM, roztoku A i B. Následně bylo do všech jamek mimo sloupec negativní kontroly (NK), který slouží jako tzv. blank neboli slepý vzorek napipetováno  $3 \times 10^4$  buněk MOLT-4 ve 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze MOLT-4.

**Tab. 3:** Uspořádání mikrotitrační destičky testovaných sloučenin v rozmezí koncentrací od 0,1 – 50  $\mu\text{mol/l}$

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

**Kde:** Ve sloupci 1 se nachází NK tzv. blank neboli slepý vzorek, obsahující pouze 200  $\mu\text{l}$  KM. Ve sloupci 12 se nachází pozitivní kontrola (PK) obsahující 100  $\mu\text{l}$  KM a 100  $\mu\text{l}$  neovlivněné buněčné linie MOLT-4.

**Tab. 4: Tabulka pipetovaných objemů roztoků A, B a kultivačního média (KM) pro konc. 0,1-50  $\mu\text{mol/l}$** 

Koncentrace ( $\mu\text{mol/l}$ )	$\mu\text{l}$ roztoku		$\mu\text{l}$ KM
0,1	4	B	96
0,4	16		84
0,7	28		72
1,5	60		40
2,5	100		-
4	8	A	92
9	18		82
15	30		70
27	54		46
50	100		-

### 3.3.6 Inkubace

Po přípravě mikrotitrační destičky byla destička 24 hodin inkubována v inkubátoru při teplotě 37°C a v hlídané atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.3.7 Detekce

Po uplynutí inkubační doby bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu\text{l}$  WST-1 roztoku (1 ml WST: 4 ml PBS) a poté byla změřena hodnota absorbance pro každou jamku v destičce pomocí spektrofotometru INFINITY PRO 200 od firmy Tecan Trading AG při vlnové délce 440 nm. Následně byla destička 3 hodiny inkubována, a to za stále stejných podmínek (tj. 37°C a atmosféra s 5 % CO<sub>2</sub>). Po inkubaci byla opět změřena hodnota absorbance pro každou jamku v destičce pomocí spektrofotometru INFINITY PRO 200 při vlnové délce 440 nm.

### 3.3.8 Vyhodnocení WST-1 testu

Cílem této práce bylo získání hodnot IC<sub>50</sub> testovaných sloučenin molybdenocenových komplexů. Hodnota IC<sub>50</sub> nám stanovuje koncentraci testované látky mající za následek 50 % inhibici biochemických a biologických vlastností buněčné linie. Každá koncentrace se prováděla ve čtyřech opakováních, ze kterých byla spočítána průměrná hodnota absorbance a směrodatná odchylka pro každou koncentraci testované sloučeniny. Zprůměrované hodnoty absorbance byly před a po inkubační době odečteny. Využitím softwaru Origin Pro (verze 8, Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) v bloku „Analyses“ pomocí statistické

metody „ANOVA“ byly odečtené hodnoty absorbance zaneseny do grafů v závislosti viability buněk na koncentraci testovaných komplexů a po proložení křivkou, kde typ křivky vychází z analýzy směrodatných odchylek (Boltzman, DoseResp, Hill) byla odečtena hodnota IC<sub>50</sub>.

### 3.4 Stanovení cytotoxicity dimethylsulfoxidu

Ke stanovení maximální možné použitelné koncentrace dimethylsulfoxidu pro zachování buněčné integrity, byl do 96 - jamkové mikrotitrační destičky napipetován roztok DMSO v koncentracích 0,01; 0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 1; 2; 4 % hm. podle *tab. 5*. Roztoky DMSO a příslušné objemy KM byly pipetovány do destičky dle rozpisu *tab. 6*. Do každé jamky mimo sloupec 1, který slouží jako tzv. slepý vzorek bylo napipetováno  $3 \times 10^4$  buněk MOLT-4 ve 100  $\mu$ l buněčné suspenze MOLT-4. Poslední sloupec obsahoval neovlivněné buňky a sloužil jako PK.

**Tab. 5: Uspořádání mikrotitrační destičky testovaného dimethylsulfoxidu (DMSO) v rozmezí koncentrací od 0,01 – 4 % hm.**

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

**Tab. 6: Přehled pipetovaných objemů roztoků dimethylsulfoxidu (DMSO) a kultivačního média (KM) pro koncentrace 0,01-4 % hm**

% hm. (DMSO)	μl roztoku		μl KM
0,01	5	<b>B</b>	95
0,02	10		90
0,04	20		80
0,1	50		50
0,2	100		-
0,3	8	<b>A</b>	92
0,6	15		85
1	25		75
2	50		50
4	100		-

### 3.4.1 Příprava roztoků testovaného dimethylsulfoxidu

Pro změření účinku DMSO na buněčnou linii MOLT-4 byly použity 2 roztoky, a to roztok A (8 % hm.) a roztok B (0,4 % hm.). Pomocí **vzorce 1** byl připraven roztok A (8 % hm.) ze 100 % DMSO a doplněného KM na objem 1200 μl.

Roztok B o koncentraci 0,4 % hm. byl taktéž připraven pomocí **vzorce 1**, ale jako **c<sub>2</sub>** byl použit 8 % hm. roztok A.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

**Kde:**  $c_1$  je koncentrace roztoku B (0,4 % hm.),  $V_1$  je objem roztoku B (1200 μl) a  $c_2$  je koncentrace roztoku A (8 % hm.)

### 3.4.2 Inkubace

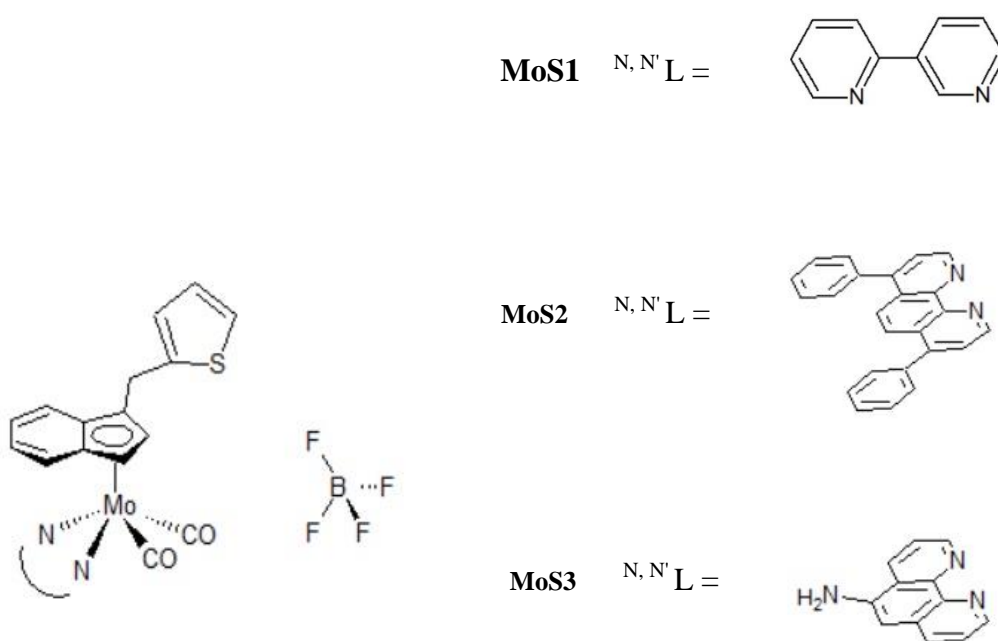
Mikrotitrační destička byla inkubována za totožných podmínek jako při stanovení cytotoxicity testovaných komplexů, tj. inkubační doba 24 h, 37°C a v hlídané atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Po uplynutí inkubační doby byl účinek DMSO na buňky MOLT-4 změřen za využití WST-1 testu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo provedeno stanovení cytotoxické aktivity u 13 nově syntetizovaných monocyklopentadienylových a indenylových komplexů molybdenu, které byly poskytnuty Katedrou obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice. Tyto komplexy byly rozděleny do 3. skupin podle různého ligandu aromatických sloučenin. Jejich cytostatická aktivita byla stanovena pomocí WST-1 testu na buněčné linii MOLT-4 odvozené od buněčné linie T-lymfocytární leukémie. Získaná data, která byla zpracovaná v programu Origin Pro jsou uvedena viz (Graf 1-13) vyjadřující závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci testovaného komplexu.

### Skupina číslo 1

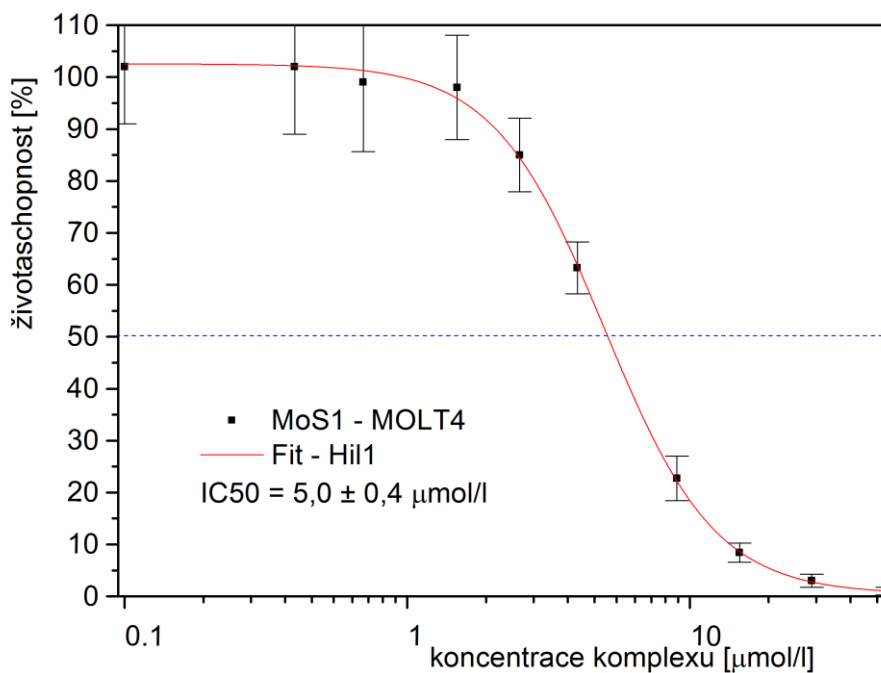
U skupiny č. 1 (**MoS1** – **MoS3**) je na centrální atom molybdenu  $\eta^5$  navázaný inden substituovaný thiofenem a chelátově vázané různé typy N, N' ligandů: (2,2-bipyridin **MoS1**, 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin **MoS2**, 5-amino-1,10-fenantrolin **MoS3**).



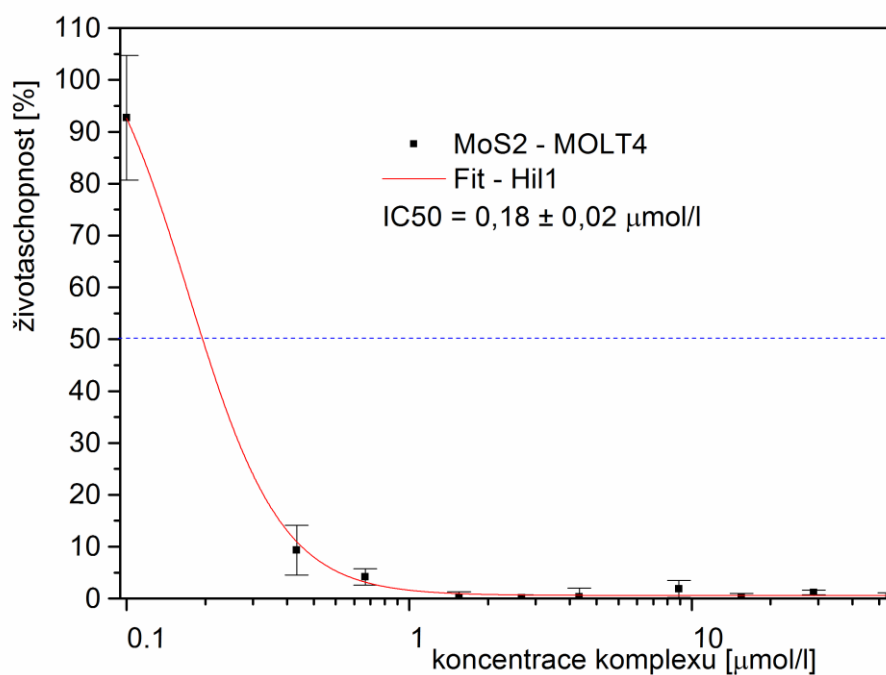
Tab. 7: Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých komplexů skupiny č. 1

Skupina	Komplex	MOLT-4 ( $IC_{50}$ $\mu\text{mol/l}$ )
1	MoS1	$5,0 \pm 0,4$
	MoS2	$0,18 \pm 0,02$
	MoS3	$1,6 \pm 0,1$

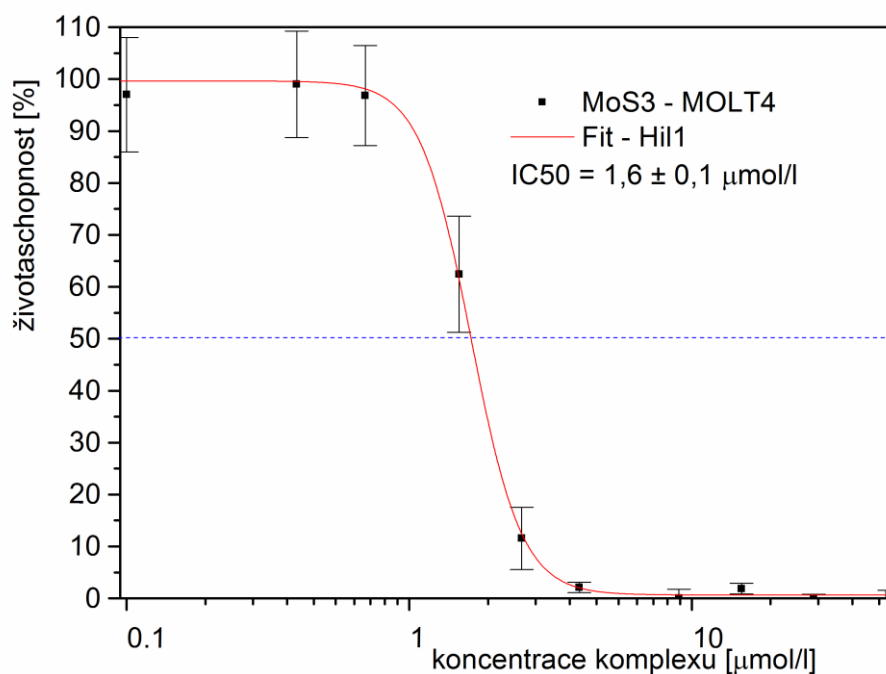
U všech indenylových komplexů zařazených do první skupiny byla prokázána vysoká cytostatická aktivita odpovídající hodnotě  $IC_{50}$  v rozmezí  $IC_{50} = 0,18$  až  $5,0 \mu\text{mol/l}$  viz tab. 7. Nejvyšší aktivita byla nalezena u komplexu **MoS2**  $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  obsahující ligand 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin, nejnižší aktivita byla nalezena u komplexu **MoS1** ( $IC_{50} = 5 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ ) s N, N'-chelátujícím ligandem 1,10-fenantrolinem. Výsledek odpovídá dříve publikovaným studiím, kde vanadocenové komplexy obsahující fenantrolinový substituent vykazují vyšší cytostatickou aktivitu než v případě strukturně obdobných komplexů obsahující bipyridin (Vinklárek a kol., 2013, s. 2665-2672; Šebestová a kol., 2015, s. 211-218).



Graf 1: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS1



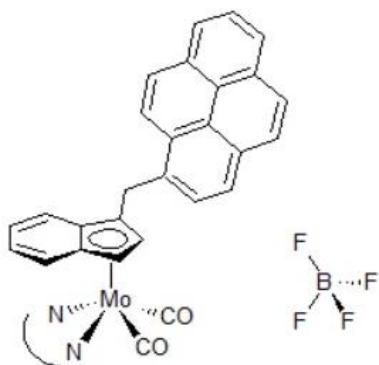
Graf 2: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS2



Graf 3: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoS3

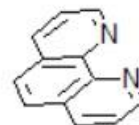
## Skupina číslo 2

U skupiny č. 2 (**MoP1** – **MoP5**) je na centrální atom molybdenu navázaný inden substituovaný benzopyrenem a chelátově vázané N, N' ligandy: (1,10-fenantrolin; 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin; 2,9-dimethyl-4,7-difenyl-1,10-fenantrolin; 2,4,7,9-tetramethyl-1, 10-fenantrolin; 2,2-bichinolin).

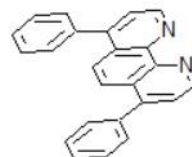


**MoP1 – MoP5**

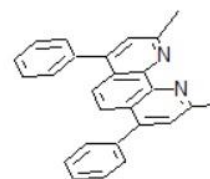
MoP1 N, N' L =



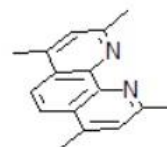
MoP2 N, N' L =



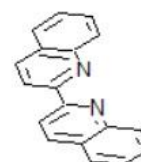
MoP3 N, N' L =



MoP4 N, N' L =



MoP5 N, N' L =

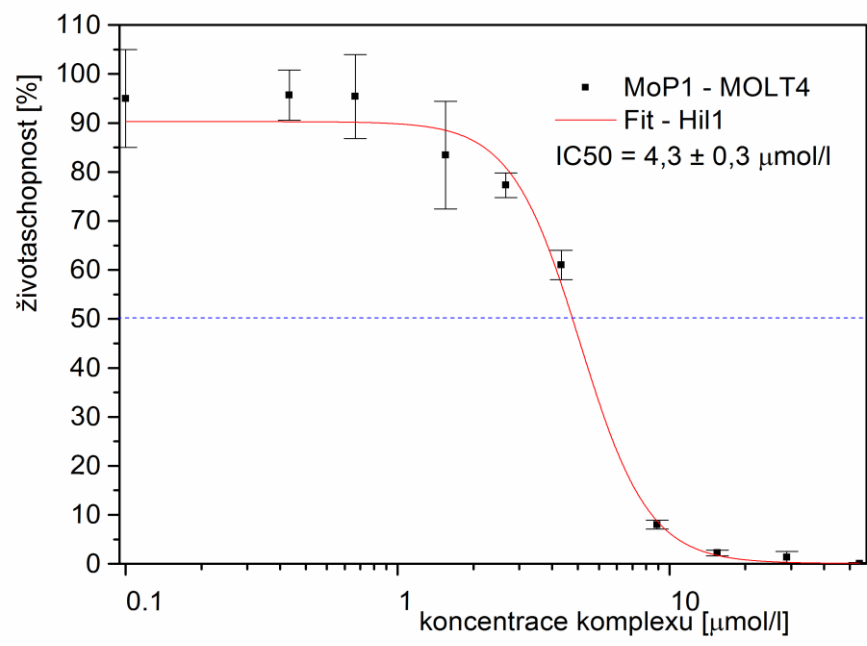




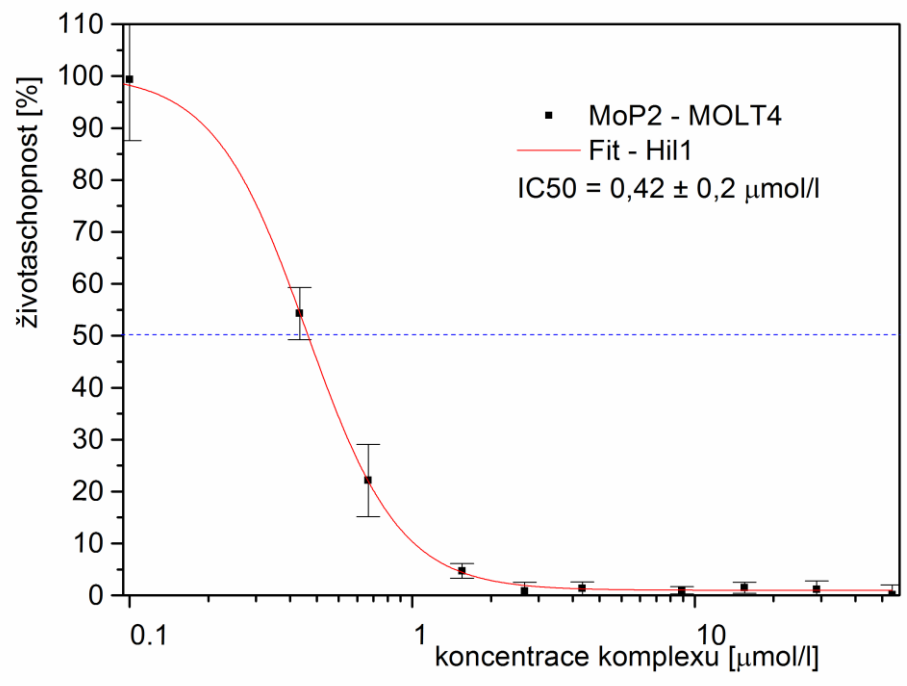
**Tab. 8: Výsledné hodnoty IC<sub>50</sub> jednotlivých komplexů skupiny č. 2**

Skupina	Komplex	MOLT-4 (IC <sub>50</sub> μmol/l)
2	MoP1	4,3 ± 0,3
	MoP2	0,42 ± 0,2
	MoP3	10,7 ± 0,7
	MoP4	0,52 ± 0,03
	MoP5	17,15 ± 0,75

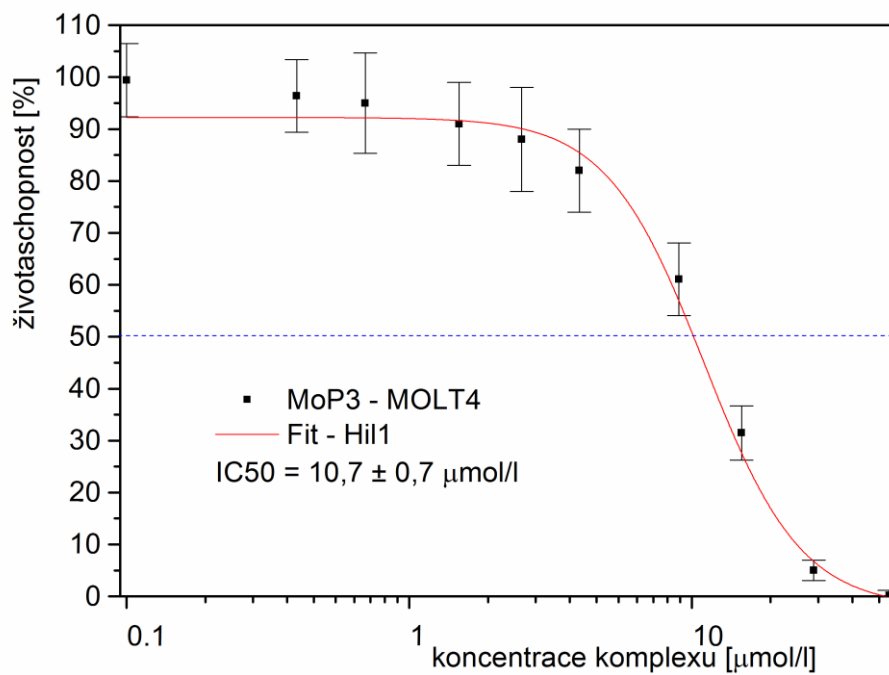
Ve druhé skupině pěti indenylových sloučenin se substituovaným benzopyrenem a N, N'-chelátově vázaným ligandem byla nalezena cytostatická aktivita v rozmezí (IC<sub>50</sub> = 0,42 až 17,15 μM, viz *tab. 8*). Komplexy s nejvyšší aktivitou byly **MoP2** s hodnotou IC<sub>50</sub> = 0,42 ± 0,2 μmol/l obsahující 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin a **MoP4** s IC<sub>50</sub> = 0,52 ± 0,03 μmol/l obsahující 2,4,7,9-tetramethyl-1,10-fenantrolin. Komplex s nejnižší aktivitou **MoP5** IC<sub>50</sub> = 17, 15 ± 0,75 obsahoval chelátově vázaný bichinolin. Z těchto výsledků můžeme říci, že přítomnost N, N' ligandu fenantrolinu ve sloučeninách **MoP1**, **MoP2**, **MoP3** a **MoP4** cytostatickou aktivitu zvyšuje.



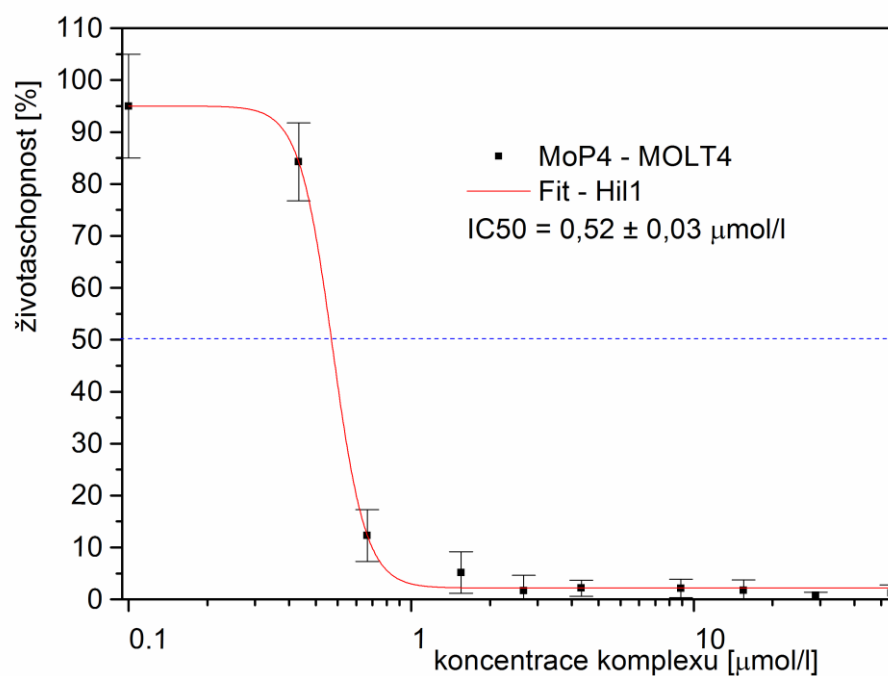
Graf 4: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP1



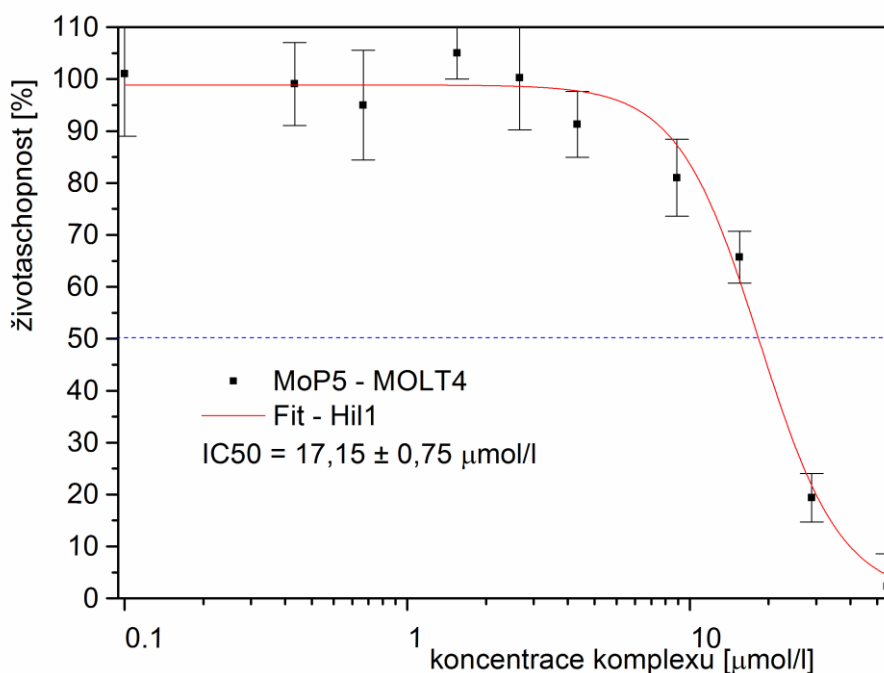
Graf 5: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP2



**Graf 6: Závíslost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP3**



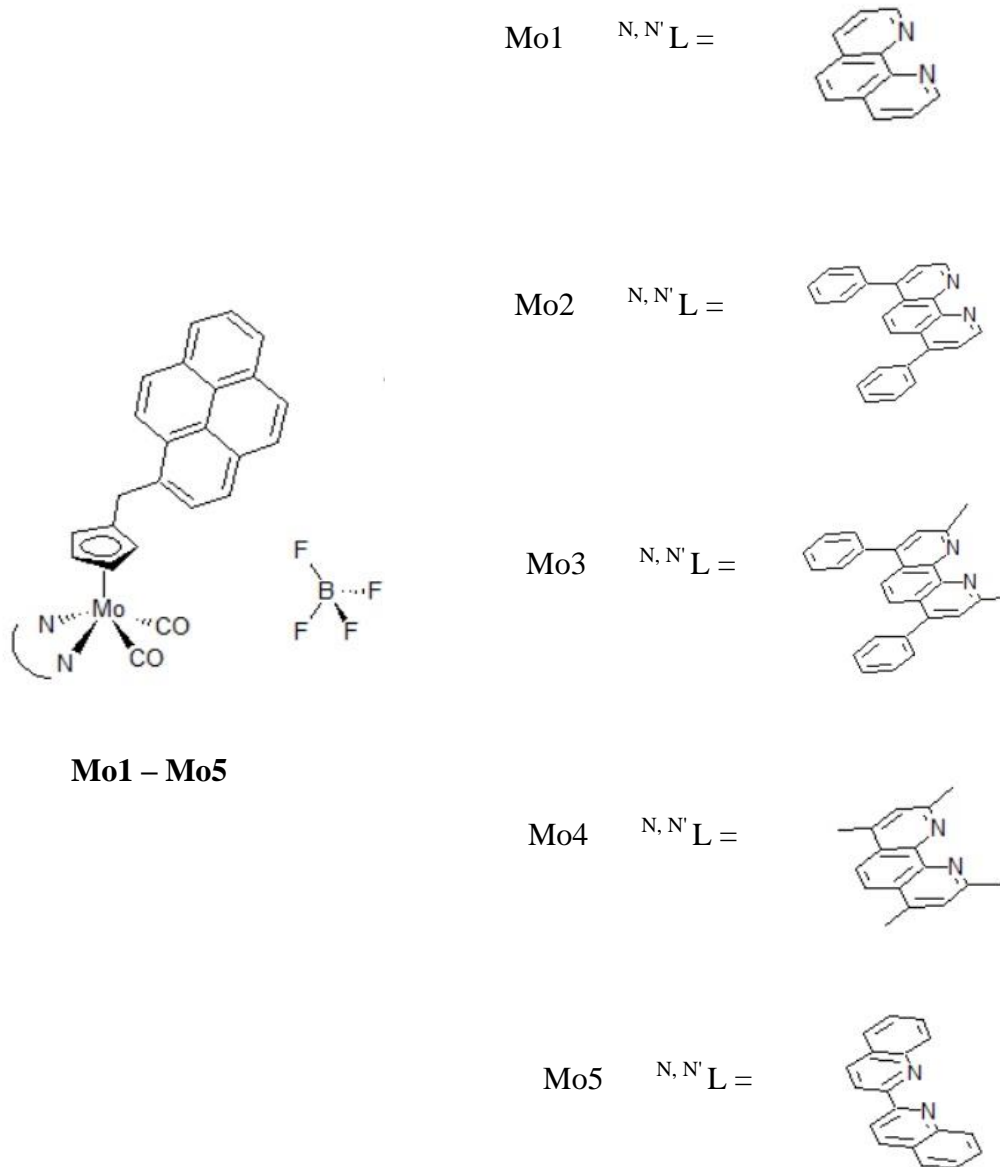
**Graf 7: Závíslost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP4**



Graf 8: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu MoP5

### Skupina číslo 3

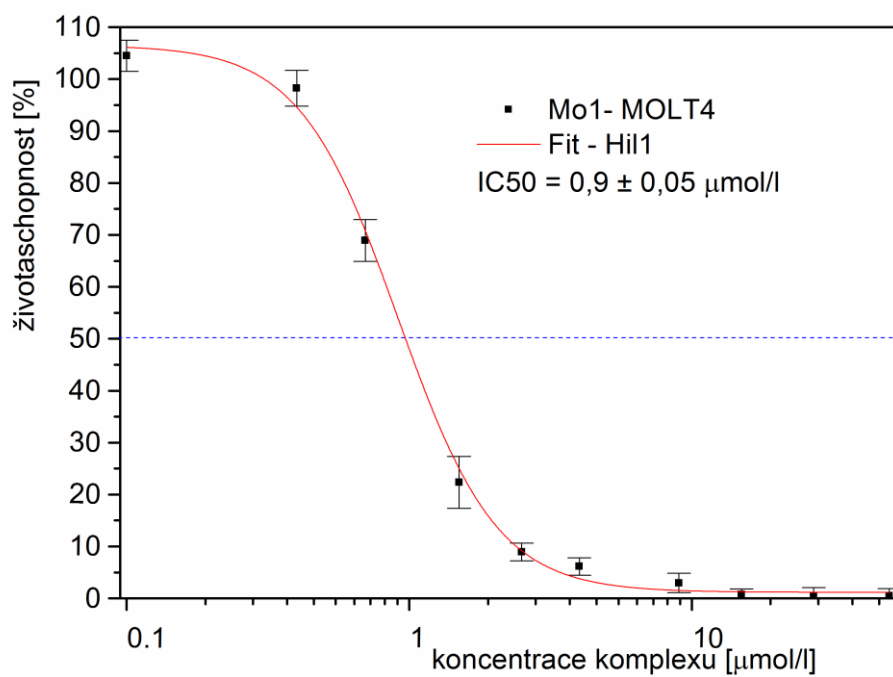
Skupina č. 3 zahrnuje monocyklopentadienylové komplexy molybdenu (**Mo1** – **Mo5**) obsahující Cp kruh substituovaný benzopyrenem a chelátově vázané N, N' ligandy stejného typu jako skupina č. 2. Nalezená cytostatická aktivita se pohybuje v intervalu ( $IC_{50} = 0,9$  až  $11,0 \mu\text{mol/l}$ ) viz *tab. 9*. Nejvyšší hodnoty byly určeny u komplexu **Mo1** s  $IC_{50} = 0,9 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$  obsahující 1,10-fenantrolin a komplex **Mo2** s aktivitou  $IC_{50} = 1,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$  obsahující 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin. Nejvyšší hodnotu  $IC_{50}$  pak byla stanovena u komplexu **Mo5**  $IC_{50} = 11,0 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$  s vázaným bichinolinem. Z výsledků můžeme usoudit, že u komplexů **Mo1**, **Mo2**, **Mo3**, **Mo4** přítomnost N, N' ligandu fenantrolinu v komplexech zvyšuje jejich cytostatickou aktivitu.



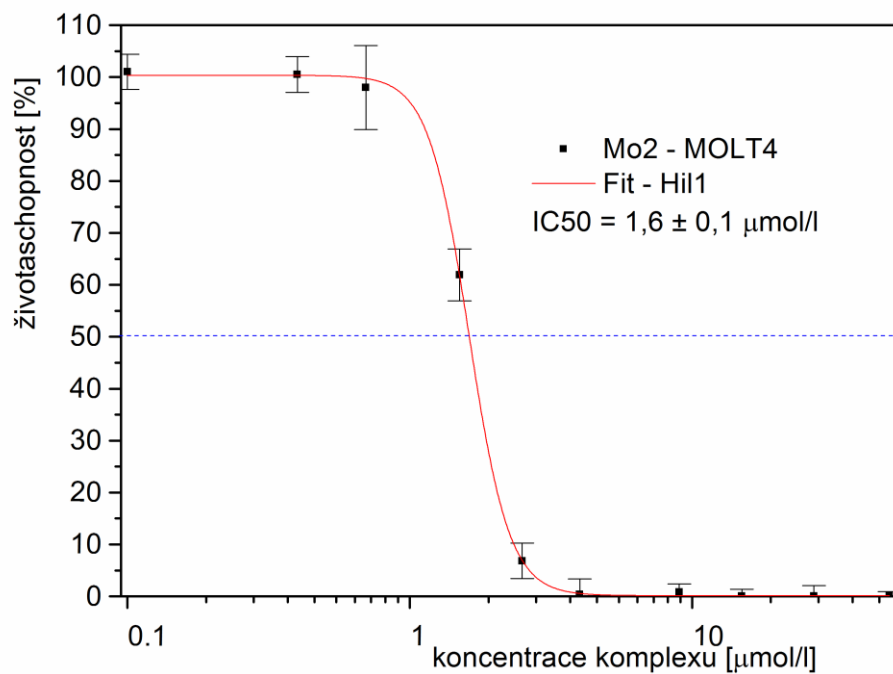
**Mo1 – Mo5**

**Tab. 9: Výsledné hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých komplexů skupiny č. 3**

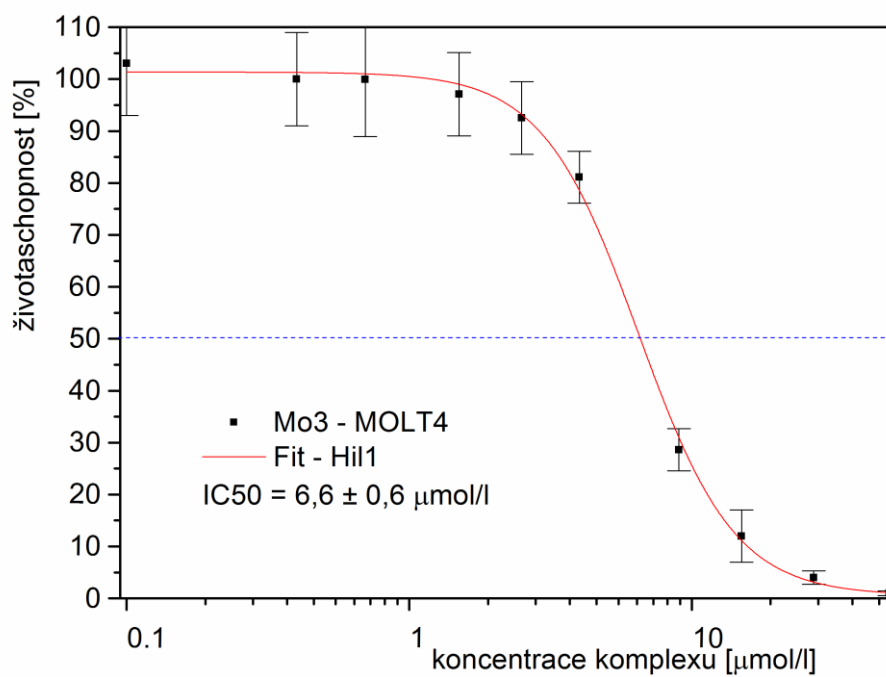
Skupina	Komplex	MOLT-4 ( $IC_{50}$ $\mu\text{mol/l}$ )
3	Mo1	$0,9 \pm 0,05$
	Mo2	$1,6 \pm 0,1$
	Mo3	$6,6 \pm 0,6$
	Mo4	$4,6 \pm 0,3$
	Mo5	$11,0 \pm 0,5$



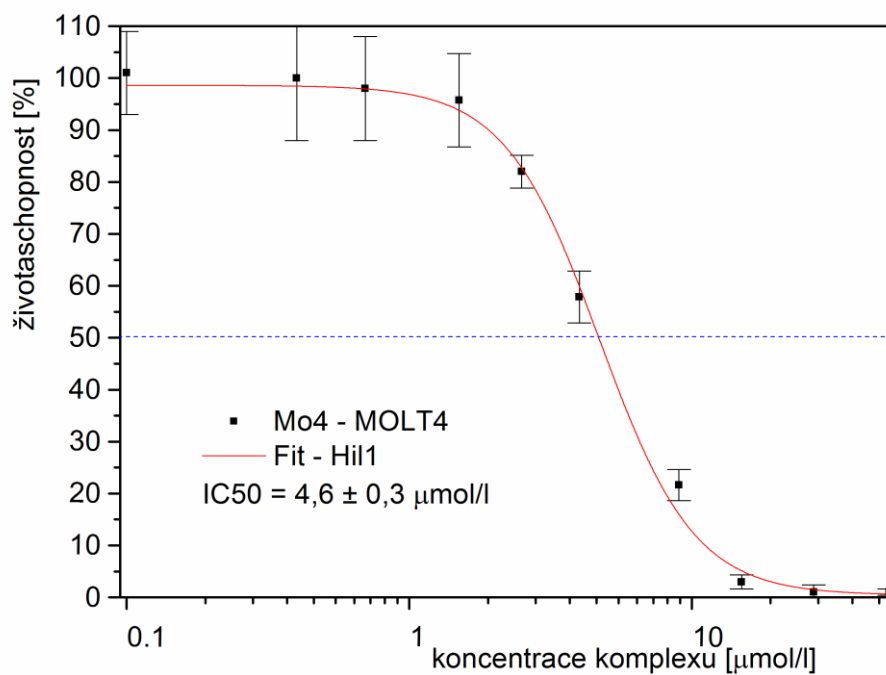
**Graf 9: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo1**



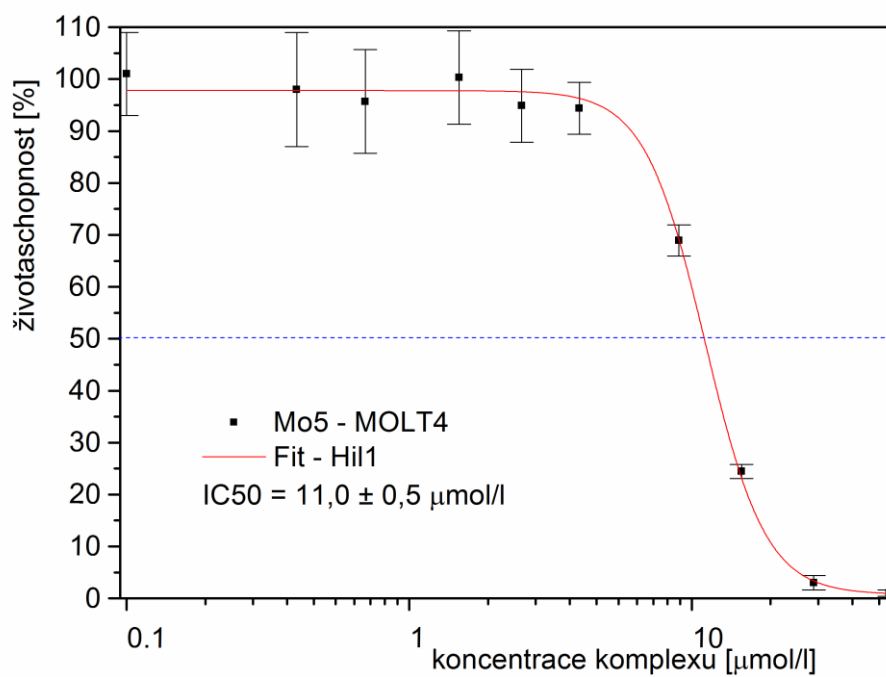
**Graf 10: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo2**



Graf 11: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo3



Graf 12: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo4



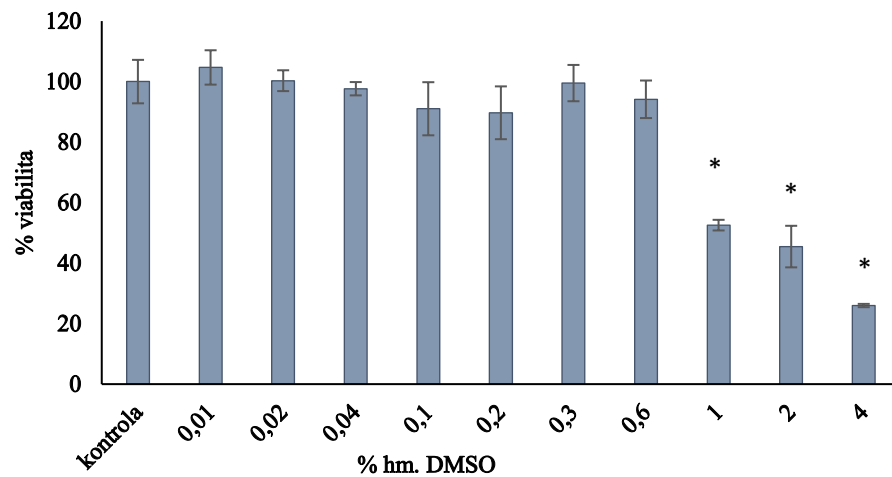
Graf 13: Závislost viability buněk MOLT-4 na koncentraci komplexu Mo5



## 4.1 Vyhodnocení cytotoxicity dimethylsulfoxidu

V tomto experimentu bylo cílem zjistit maximální možnou koncentraci DMSO pro rozpuštění testovaných komplexů, která nenarušuje integritu buněčné linie MOLT-4 a nemá vliv na viabilitu buněk.

Bylo zjištěno, že maximální možná koncentrace DMSO, kterou lze použít pro rozpuštění testovaných komplexů, aniž by došlo k poškození buněk je  $\leq 0,6$  % hm. V koncentracích od 1-4 % hm. DMSO je pozorován výrazný pokles viability buněk viz (Graf 14).



Graf 14: Závislost viability (%) buněk MOLT-4 na koncentraci DMSO (% hm.)

Kde: \* statisticky významná hodnota ke kontrole ( $P < 0,05$ )

## 5 ZÁVĚR

Všechny testované komplexy prokázaly vysokou cytostatickou aktivitu na leukemické linii MOLT-4. Ve všech případech je nalezená hodnota  $IC_{50}$  nižší než v případě nejpoužívanějšího antitumorového činidla *cis*-platiny s hodnotou  $IC_{50} = 15,8 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$  (Vinklárek, 2013, s. 2665-2672). Bylo prokázáno, že antitumorová aktivita je závislá na typu přítomného N, N'-chelátového ligandu. Nejnížší aktivitu vykazují komplexy obsahující 1,10-bichinolin. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u komplexů obsahující 4,7-difenyl-1,10-fenantrolin. Nejvyšší hodnota byla nalezena u komplexu MoS2 s  $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ . Komplexy MoS2 a MoP2 obsahující ve své struktuře indenyl substituovaný benzopyrenem a chelátově vázaným 4,7-difenyl-1,10-fenantrolinem mají v porovnání s komplexy obsahující Cp kruh substituovaný benzopyrenem vyšší aktivitu. Komplex MoP1 obsahující inden substituovaný benzopyrenem a N, N' vázaným fenantrolinem vykazuje menší účinnost, než Mo1 se strukturou monocyklopentadienylu substituovaný benzopyrenem a stejným ligandem. Z výsledků vyplývá, že monocyklopentadienylové komplexy 3. skupiny jsou ve většině případů cytostaticky aktivnější než komplexy 2. skupiny obsahující inden se stejnými ligandy.

Pro přesnější vyhodnocení aktivity různých typů ligandů by bylo nutné zkompletovat jednotlivé řady N, N'-chelátově vázaných ligandů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABEYSINGHE, P. M., HARDING, M. M. Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. *Dalton Transactions*. 2007, 3474-3482. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2007/DT/b707440a#!divAbstract>
- BANDARRA, D., LOPES, M., LOPES, T., ALMEIDA, J., SARAIVA, M. S., VASCONCELLOS-DIAS, M., NUNES, C. D., FÉLIX, V., BRANDÃO, P., VAZ, P. D., MEIRELES, M., CALHORDA, M. J. Mo (II) complexes: A new family of cytotoxic agents? *Journal of Inorganic Biochemistry* 104. 2010, s. 1171–1177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.07.006>
- BRUIJNINCX, P., SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008, 12, s. 197-206. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.11.013>
- FELICIANO, I., MATTA, J., MELENDÉZ, E. Water-soluble molybdenocene complexes with both proliferative and antiproliferative effects on cancer cell lines and their binding interactions with human serum albumin. *J Biol Inorg Chem*. 2009, 14 (7), s. 2-17. DOI:10.1007/s00775-009-0554-0
- FOLBER, F., HRABOVSKÝ, Š., DOUBEK, M. *Akutní lymfoblastická leukémie dospělých*. Interní hematologická a onkologická klinika, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno: Onkologie, 2015.
- FOLBER, F., LETALOVÁ, E., DOUBEK, M. Akutní lymfoblastická leukémie. *Zdravi.euro* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Interní hematooonkologická klinika, 2011. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/akutni-lymfoblasticka-leukemie-dospelych-458618>
- FOLTÁNOVÁ, K. *Cytostatický účinek vybraných metallocenů*. Pardubice, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická.
- HAMPL, F., RÁDL, S., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- HARTINGER, CH. G., DYSON, P. J. Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. 2009, 38, 391–401.
- HOFMANOVÁ, J. Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy. *Gentotoxicita a karcinogeneze* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, 2013, 2012-2013 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01\\_nador.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html)
- HOUSER, F. *Organokovové sloučeniny ve výuce chemie*. Praha, 2010. Disertační práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Katedra učitelství a didaktiky chemie.
- HYNIE, S., FARGHALI, H. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Triton, 2001. Lékařské repetitorium. ISBN 80-725-4181-1.

KOSTOVA, I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1(1). 2006, s. 1-22. DOI: 10.2174/157489206775246458

KÖPF-MAIER, P., KRAHL, D. Tumor inhibition by metallocenes: ultrastructural localization of titanium and vanadium in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chem Biol Interactions*. 1983, 44 (3), s. 317-328. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(83\)90059-5](https://doi.org/10.1016/0009-2797(83)90059-5)

KNOX, R. J., FRIEDLOS, F., LYDALL, D. A., ROBERTS, J. J. Mechanism of Cytotoxicity of Anticancer Platinum Drugs: Evidence That cis-Diamminedichloroplatinum(II) and cis-Diammine (1, 1 - cyclobutanedicarboxylato) platinum (DII) differ Only in the Kinetics of Their Interaction with DNA'. *Cancer research* 46. 1986, s. 1972-1979. Dostupné z: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/46/4\\_Part\\_2/1972](http://cancerres.aacrjournals.org/content/46/4_Part_2/1972)

LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2002. Lékařské repetitorium. ISBN 80-726-2168-8.

MARKOWSKA, A., KASPRZAK, B., JASZCZYŃSKA-NOWINKA, K., LUBIN, J., MARKOWSKA, J. Noble metals in oncology. *Contemporary oncology*. 2015, 19 (4), s. 271-275. DOI: 10.5114/wo.2015.54386

MARTINS, P., MARQUES, M., COITO, L., ARMANDO, POMBEIRO, J.L., BAPTISTA, P. V., FERNANDES, A. R. Organometallic Compounds in Cancer Therapy: Past Lessons and Future Directions. 2014, 14, 1199-1212.

MELENDÉZ, E. Bioorganometallic chemistry of molybdenocene dichloride and its derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* 706-707. 2011, s. 4-12. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2012.02.006

MELENDÉZ, E. Metallocenes as target specific drugs for cancer treatment. *Inorganica Chimica Acta* 393. 2012, s. 36-52. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

MRÓZEK, O., ŠEBESTOVÁ, L., VINKLÁREK, J., ŘEZÁČOVÁ, M., EISNER, A., RŮŽIČKOVÁ, Z., HONZÍČEK, J. Highly water-soluble cyclopentadienyl and indenyl molybdenum(II) complexes: second generation of molybdenum-based cytotoxic agents. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2016, s. 519-529. DOI:10.1002/ejic.201501133

NDAGI, U., MHLONGO, N., SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy Volume 11*. 2017, s. 599-616. DOI: 10.2147/DDDT.S119488

PERLÍK, F. *Základy farmakologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2011. Základy (Galén). ISBN 978-80-7262-759-2

SLÍVA, J., VOTAVA, M. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-500-8.

ŠEBESTOVÁ, L., VINKLÁREK, J., HONZÍČEK, J., HONZÍČEK, J., RŮŽIČKOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ, M. Synthesis, characterization and cytotoxic effect of vanadocene complexes bearing substituted 2,20-bipyridines and 4,5-diazafluoren. *Inorganica Chimica Acta* 427. 2015, 211–218. DOI: 10.1016/j.ica.2011.03.034

Rakovina | Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK. Uvod | Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK [online]. Copyright © 2011 MUDr. Jiří [cit. 23.06.2018]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=rakovina>

TICHÝ, O. Rakovina nejčastěji napadá kůži, prsa a trávicí trakt, ukázala aktuální data z VZP. *Vzp.cz* [online]. 2018 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://www.vzp.cz/onas/aktuality/rakovina-nejcasteji-napada-kuzi-prsa-a-travici-trakt-ukazala-aktualni-data-z-vzp>

VINKLÁREK, J., HURYCHOVÁ, H., HONZÍČEK, J., ŠEBESTOVÁ, L., PADĚLKOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ, M. Can Substitution of Chlorides Enhance the Cytotoxicity of Vanadocene Dichloride? *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013, 2665–2672. DOI: 10.1002/ejic.201201505. ISSN 14341948. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejic.201201505>

## ZDROJE OBRÁZKŮ

PORCINAS, Razas, (2018). *razasporcinas* [online]. [cit. 28.3.2018]. Dostupný z: [https://www.google.cz/search?q=camara+burker&hl=cs&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjfwyPu4\\_aAhVrKpoKHR6tDEMQ\\_AUICigB&biw=1408&bih=667#imgrc=Tm9APPt7GivuAM](https://www.google.cz/search?q=camara+burker&hl=cs&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjfwyPu4_aAhVrKpoKHR6tDEMQ_AUICigB&biw=1408&bih=667#imgrc=Tm9APPt7GivuAM)

SLÍVA, J., VOTAVA, M. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-500-8.

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

<b>Název práce</b>	Stanovení cytotoxické aktivity monocyklopentadienylových a monoindenylových komplexů molybdenu obsahující N, N chelátující ligandy
<b>Autor práce</b>	Daniela Hofmanová
<b>Obor</b>	Zdravotní laborant
<b>Rok obhajoby</b>	2018
<b>Vedoucí práce</b>	prof. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.
<b>Anotace</b>	Bakalářská práce se zaměřuje na stanovení inhibiční aktivity $IC_{50}$ monocyklopentadienylových a indenylových sloučenin molybdenu. V teoretické části jsou zahrnuty základní informace týkající se nádorového onemocnění, rozdělení a popsání cytostatických látek až po sloučeniny molybdenu. V navazující praktické části práce je popsáno testování organokovových sloučenin s centrálním kovem molybdenu za pomoci WST-1 testu na buněčné linii MOLT-4 odvozené od T-lymfocytární leukémie. Inhibiční aktivita byla celkově stanovena u 13 molybdenových sloučenin. Nejaktivnějšími komplexy byly sloučeniny (MoS <sub>2</sub> , MoP <sub>2</sub> , Mo <sub>2</sub> ) obsahující N, N <sup>-</sup> -chelátově vázaný 4, 7 – difenyl – 1, 10 – fenantrolin. Nejúčinnějším byl komplex MoS <sub>2</sub> s $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$ .
<b>Klíčová slova</b>	nádory, cytostatika, rakovina, molybdenocendichlorid, WST-1, $IC_{50}$