

# **Bimetalické komplexy a jejich vlastnosti**

Radek Adam Strauch

---

Bakalářská práce  
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2020/2021

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Radek Adam Strauch**  
Osobní číslo: **T190078**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Bimetalické komplexy a jejich vlastnosti**

**Zásady pro vypracování**

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Zaměřte se na vybrané přechodné kovy a jejich vlastnosti.
3. Vyhledejte informace o jejich vlastnostech a vlivu na životní prostředí.
4. Provedte syntézu získaných informací.
5. Výsledky přehledně zpracujte do formy BP.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

1. Jursík F.: Anorganická chemie kovů. 1. vyd. 2002.
2. Barabas K., Milner R., Lurie. Etal.: Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications.2008, 6, 1-18.
3. Zhang J., Giannis A., et al.: Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review, Science of the Total Enviroment, 2012.
4. Matějů, V., Vosáhlová, S., Kyclt, R.: Stanovení ekotoxicity, Odpadové fórum,2005.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta: Radek Adam Strauch

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato literární rešerše ilustruje vhodná chemoterapeutika na bázi kovu, jejich vlastnosti a v neposlední řadě také ekotoxikologii chemoterapeutik. Léčivá bioanorganická chemie může využívat jedinečných vlastností kovových iontů pro návrh nových léků. To například vedlo ke klinické aplikaci chemoterapeutických činidel pro léčbu rakoviny, jako je cisplatina. Problematika použití cisplatiny a jejího složitého mechanismu účinku byla sepsána společně s jejím omezením, způsobené toxickými vedlejšími účinky. V rámci mé rešerše byla shrnuta široká škála bimetalických komplexů, jejich toxických vlastností a užití při boji proti rakovině či problematických nemocích.

Podstatná část práce je také věnována působení těchto toxických sloučenin na životní prostředí. Je faktem, že jde o světově přehlížený problém, který může způsobit znečištění životního prostředí na všech úrovních včetně lidského zdraví. Po právu vzbuzuje obavy pracovní expozice a zdravotního rizika pro lidi zapojené do výroby, marketingu a distribuce protinádorových léků a v neposlední řadě vylučování moči jako hlavní faktor přispívající k různým cytostatickým zbytkům ve vodním cyklu. V práci je ilustrováno několik studií dopadu účinků látek znečišťující životní prostředí na strukturu a funkci lidského zdraví a ekologických systémů.

Situaci ani nepomáhá fakt, že v současné době nebyly identifikovány žádné látky, které by mohly chránit před všemi druhy toxicity sloučenin a následnou expozicí do životního prostředí. Z toho důvodu nekončí dlouhotrvající boj chemiků a vědců při vývoji nových protirakovinných činidel na bázi kovů, které mají různé způsoby působení a mechanismy účinku. Obzvláště v posledních pěti letech vědci dosáhli významných pokroků v této problematice a můžeme jen nadšeně očekávat další průlom.

Klíčová slova: cisplatina, toxicita, ekotoxicita, metalické komplexy, léčba rakoviny, měď, zlato, ruthenium, ferrocen, protirakovinové komplexy, enviromentální toxikologie

## **ABSTRACT**

My research illustrates an appropriate iron based chemotherapeutic agents, their properties and last but not least their ecotoxicology. Medical bioinorganic chemistry is able to use unique properties of iron ions for creating new drugs. This led to a clinical application of chemotherapeutic agents like cisplatin to cure various cancers. Issues with using cisplatin and it's complicated mechanism of effects have been written down combined with it's restrictions rooted in toxic side effects. In my research I summarise a wide variety of bimetallic complexes, their toxic properties and their use in a fight against cancer or other serious illnesses.

In a huge part of my thesis I also talk about an impact these toxic compounds have on the environment. A world wide overlooked issue is the fact that these compounds can cause a multitude of environmental problems affecting even our own health. Rightfully, there are concerns of exposure and health risks among people working in production, marketing and distribution of anti-tumor medication and urine excretion as a main factor contributing to various cytostatic residues in water cycle. In the thesis I analyse multiple studies focusing on impact of compounds polluting the environment and it's effect on health of the population and nature.

In present, we haven't discovered any agents that could counteract all types of toxicity of mentioned compounds and following exposure of the environment. For this reason the argument regarding the development of new iron based agents with various applications between chemical industry and scientists isn't stopping. Especially in the last five years, scientists have made an enormous progress in this field and we can expect more breakthroughs in the future.

Keywords: cisplatin, toxicity, ecotoxicity, metallic complexes, cancer treatment

copper, gold, ruthenium, ferrocene, anticancer complexes, environmental toxicology

## **Poděkování**

Rád bych upřímně poděkoval Mgr. Lucii Hanouskové za pomoc při prvotním výběru tématu bakalářské práce a za ochotu, cenné rady a čas, který mi věnovala v průběhu psaní této práce. Dále bych rád poděkoval panu prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D., který se ujal mé práce a vyšel mi ve všech ohledech vstříc, jak jen mohl. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem vyučujícím, kteří mi pomohli vyřešit problémy s mojí prací: panu doc. Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D., panu Mgr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D., paní Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. a panu Ing. Jaroslavu Filipovi, Ph.D. Děkuji jim také za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a také za jejich kurzy, které mě kvalitně připravily na vypracování této bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
I.TEORETICKÁ ČÁST .....	11
<b>1 BIMETALICKÉ SLOUČENINY .....</b>	<b>12</b>
1.1 HISTORIE KOORDINAČNÍCH SLOUČENIN .....	12
1.2 CISPLATINA .....	13
1.2.1 Mechanismus reakce cisplatiny .....	15
1.2.2 Karboplatina.....	16
1.2.3 Oxaliplatina.....	17
1.2.4 Nedaplatina .....	18
1.2.5 Lobaplatina .....	19
1.3 VÍCEJADERNÉ METALICKÉ KOMPLEXY .....	20
1.4 ZLATO.....	20
1.4.1 Heterobimetalický komplex zlata a platiny .....	21
1.4.2 Heterobimetalický komplex s pbiH ligandem .....	22
1.4.3 Heterobimetalický derivát auranofinu .....	24
1.5 OSMIUM.....	25
1.5.1 Protinádorová aktivita osmia .....	25
1.6 IRIDIUM .....	26
1.6.1 Polosendvičové komplexy irida.....	27
1.7 PALLADIUM .....	28
1.7.1 CH25 .....	29
1.8 RUTHENIUM.....	30
1.8.1 NAMI-A.....	31
1.8.2 KP1019 .....	32
1.8.3 Heterobimetalické komplexy ruthenia.....	33
1.8.3.1 [Ru(L)2(B)Pt]Cl2.....	33
1.8.3.2 Léčba Alzheimerovy choroby.....	35
1.8.3.3 AH197.....	36
1.8.3.4 Ruthplatiny.....	38
1.9 MĚĎ.....	41
1.9.1 Heterobimetalické komplexy s oxindoliminovým ligandem.....	42
1.10 FERROCEN .....	45
1.10.1 Vlastnosti .....	45
1.10.1.1 Interakce přenosu elektronu a jejich biologické využití .....	46
1.10.2 Ferrocenyl deriváty při léčbě rakoviny .....	48
1.10.2.1 Rakovina prsu .....	48
1.10.2.1.1 Ferrocifen.....	49
1.10.2.1.2 Ruthenocifen.....	50
1.10.2.2 Inhibice topoizomerázy.....	51
1.10.2.3 Léčba malárie.....	52
1.10.2.4 Rakovina plic .....	53
1.10.2.5 Komplexy na bázi guanidinu .....	55



<b>2</b>	<b>EKOTOXICITA .....</b>	<b>60</b>
2.1	CHOVÁNÍ CYTOSTATIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	62
2.1.1	Ekotoxicita vybraných cytostatik.....	63
2.1.1.1	Cisplatina a její deriváty .....	64
2.1.2	Ekotoxikologické testy .....	65
2.1.2.1	Test $\gamma$ -H2AX.....	66
2.1.3	Toxikologie cytostatických kovů.....	67
2.1.3.1	Měď .....	67
2.1.3.2	Železo.....	68
2.1.3.3	Zlato .....	69
2.1.3.4	Platina a Palladium .....	70
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>82</b>

## ÚVOD

Cis-diammindichloridoplatnatý komplex je čtvercově planární koordinační sloučenina známá také pod názvem cisplatin. Tahle sloučenina se stala vůbec prvním cytostatikem na bázi platiny, která byla používána k léčbě ovaríí, metastatických tumorů varlat a karcinomu močového měchýře. Účinek cytostatika je však doprovázen velkou řadou vedlejších účinků např. nefrotoxicitou (toxicita pro ledviny), neurotoxicitou (poškození nervové soustavy), ototoxicitou (porucha sluchu) aj. Kromě toho byla u pacientů zjištěna rezistence vůči cisplatině, která může být vrozená nebo získaná při opakovaném podání. Z toho důvodu bylo věnováno velké úsilí o zredukování toxických účinků a byly syntetizovány prvně deriváty platiny (karboplatina, oxaliplatin aj.) Jejich úkol je prostý. Snížení toxických účinků na organismus a menší počet vedlejších účinků v porovnání s cisplatinou, čehož také vědci dosáhli. Deriváty platiny úspěšně nahradily cisplatinu při léčbě některých druhů rakoviny. Avšak ani deriváty platiny nepřekonalý problém lékové rezistence právě z důvodu příbuzenství s cisplatinou. Strukturně se jedná o jednojaderné komplexy platiny (II) v *cis*- nebo *trans*- konformaci.

Tato situace vědce přivedlo na myšlenku zkombinovat účinky dvou kovů do jedné sloučeniny. Průlomový nápad otevřel cestu pestrým syntézám dvou a vícejaderných komplexních sloučenin, které se strukturně od cisplatin a jejích jednojaderných derivátů více či méně odlišují, což má za výsledek jiný mechanismus účinku a jiné spektrum biologické aktivity. To vedlo ke studiím a syntézám neplatinových sloučenin, jakými jsou sloučeniny ruthenia, mědi, zlata aj., které se rovněž ukázaly jako rovnocenní kandidáti v závodu v nalezení adekvátního léku. Každopádně vzniklá množina vícejaderných sloučenin představuje širokou škálu mechanismů působení a otevírá dveře kreativním nápadům s cílem získání takové kombinace mechanismu biologické aktivity, která by přinesla málo toxický lék s žádnou rezistencí a měl by dostačující antiproliferativní účinky na danou buněčnou linii.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIMETALICKÉ SLOUČENINY

Tvorba bimetalických komplexních sloučenin je charakteristickou, ne však výhradní, vlastností přechodných kovů neboli *d*-prvků. Komplexní sloučeniny jsou složeny z částic tvořených centrálním atomem, který představuje kov a je koordinačně kovalentními (donor-akceptorními) vazbami vázán s atomy, ionty, popřípadě atomovými skupinami souhrnně označovanými jako ligandy. Ligandy poskytují volný elektronový pár (Lewisova báze) do vakantních *d*-orbitalů centrálního atomu.<sup>5</sup>

Tato vazba je zvláštním případem kovalentní vazby, která se od klasické kovalentní vazby liší pouze svým vznikem nikoliv vlastnostmi a je tedy rovnocenná k ostatním kovalentním vazbám. Experimentálně ji tedy nelze odlišit od klasické kovalentní vazby. Oba elektrony této vazby jsou společné oběma atomům a mají opačný spin. Tyto elektrony nazýváme vazebné elektrony a jsou sdíleny oběma atomy.<sup>6</sup>

U koordinačních sloučenin může být zastoupena jednoduchá  $\sigma$ -vazba, vazba násobná, anebo může docházet k zpětné donaci  $\pi$ -elektronů, kde ligand vystupuje současně jako  $\sigma$ -donor, tak  $\pi$ -akceptor. Toto rozložení elektronů je charakteristické pro ligandy karbonylu a vazby tohoto typu patří k nejpevnějším.<sup>6</sup>

Ligandy společně s centrálním atomem tvoří koordinační sféru. Koordinační sféra, kterou ve vzorcích značíme hranatými závorkami, svým složením ovlivňuje podobu koordinačních sloučenin. Koordinační sloučeniny mají v závislosti na oxidačním stavu centrálního atomu, velikosti koordinačního čísla a náboje ligandu charakter kationtu, aniontu nebo částice elektroneutrální povahy. Pokud se v komplexech vyskytuje pouze jeden centrální atom, jde o jednojaderné (mononukleární) komplexy. Avšak koordinační sféra může obsahovat více centrálních atomů spojených buď můstkovým ligandem, anebo vazbou kov-kov. Takové komplexy se pak označují jako vícejaderné (polynukleární).<sup>7</sup>

### 1.1 Historie koordinačních sloučenin

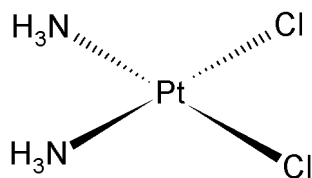
Za samotného zakladatele koordinační chemie je považován německý chemik Alfred Werner, který v roce 1893 publikoval své celoživotní dílo věnované problematice konstituce anorganických sloučenin.<sup>1</sup> Alfred Werner objasnil příčiny existence koordinačních sloučenin, jejich složení a stabilitu. Vyvrátil dosavadní představu, že koordinačně vázané atomy vytváří kovalentní vazbu s takovým počtem částic, který odpovídá jeho mocenství, a vyjádřil, že atomy mají hlavní a vedlejší typ valence.<sup>1</sup> Hlavním typem valence je myšlen

oxidační stav atomu, tedy v koordinačních sloučeninách oxidační číslo centrálního atomu, který k sobě musí mít i odpovídající hodnotu aniontu, aby byl zachován neutrální náboj. Wernerovým druhým typem valence je valence vedlejší, která odpovídá prostorovému uspořádání. Tento typ valence může být vyvažován jak anionty, tak neutrálními molekulami. Tato vedlejší valence odpovídá pojmu „koordinační číslo“, které nám udává počet donorových atomů přímo vázaných na centrální atom.<sup>3</sup> U koordinačních sloučenin každému koordinačnímu číslu přísluší jasná koordinační geometrie. Přechodné kovy nabývají nejčastěji koordinačních čísel 2-9 a nejběžnějšími jsou koordinační čísla 4 a 6.<sup>2</sup>

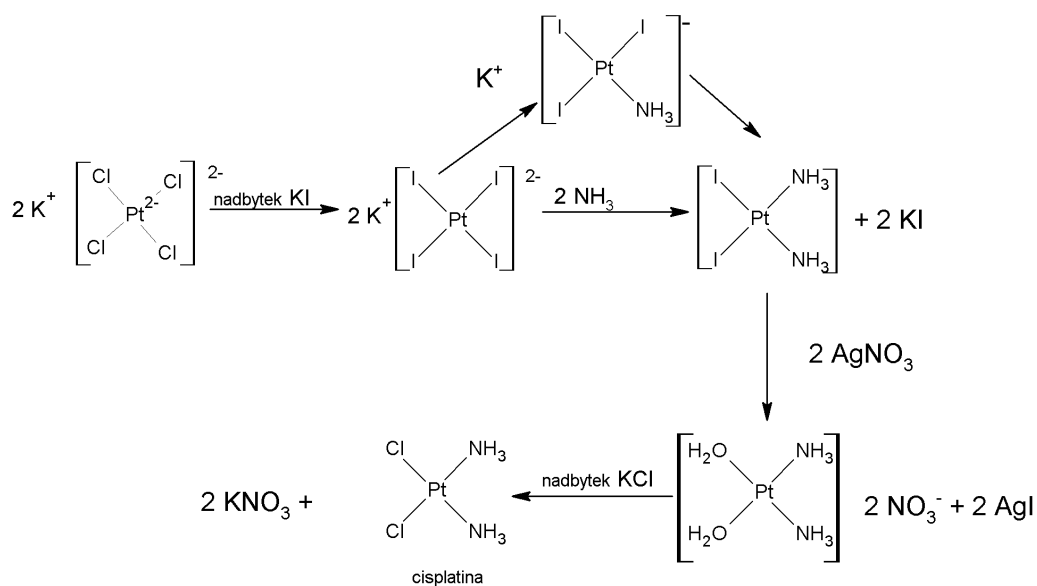
Alfred Werner vysvětlil do té doby nevysvětlitelné vlastnosti a chování složitých komplexních solí. Za jeho přínos vědě mu byla jako prvnímu roku 1913 udělena Nobelova cena v oblasti anorganické chemie, a to za návrh oktaedrické struktury komplexů přechodných kovů.<sup>4</sup>

## 1.2 Cisplatina

Cisplatina, *cis*-diamindichloroplatnatý komplex; (*cis*-DDP) je komplexní sloučenina, kde je centrálním kovem platina v oxidačním čísle +II, na který jsou vázány dva chloridové a dva amin ligandy, jež jsou vzájemně v *cis*- poloze. Amin ligandy v molekule cisplatiny jsou pevně vázány, zatímco chloridové skupiny mohou být nahrazeny jinými ligandy (nukleofily). Na Obr. 1 je znázorněna molekula cisplatiny a na Obr. 2 pak metoda její přípravy. Biologické vlastnosti cisplatiny byly objeveny Rosenbegem a Van Campem náhodně při elektrolýze za použití platinové elektrody, a poté byla látka aplikována při léčbě Sarkomu 180 u bílých myší.<sup>8</sup>



Obrázek 1: *Struktura cisplatiny*



Obrázek 2: Mechanismus přípravy cisplatiny

Po mnohých preklinických a klinických studiích byla cisplatinu od roku 1978 používána pro léčbu rakoviny a je používána do dnes.<sup>8</sup> Od té doby se stala jedním z celosvětově nejužívanějších léčiv pro léčbu rakoviny varlat, vaječníků, močového měchýře a malobuněčného nádoru plic.<sup>10</sup> Použití cisplatiny pro léčbu nádorových onemocnění je spojeno s několika nevýhodami. První nevýhodou je velmi úzké rozmezí nádorových linií, na které cisplatinu působí, a také to, že dochází ke vzniku rezistence vůči jejímu působení. Cisplatinu má také omezenou rozpustnost ve vodném roztoku<sup>8</sup>, a proto je podávána ve fyziologickém roztoku 0,9% chloridu sodného intravenózně v kombinaci s gemcitabinem, (analog pyrimidinového nukleosidu deoxycytidinu, který vytváří metabolity blokující metabolismus nukleových kyselin).<sup>21</sup> S gemcitabinem nese cisplatinu větší účinnost proti nádorovým onemocněním.

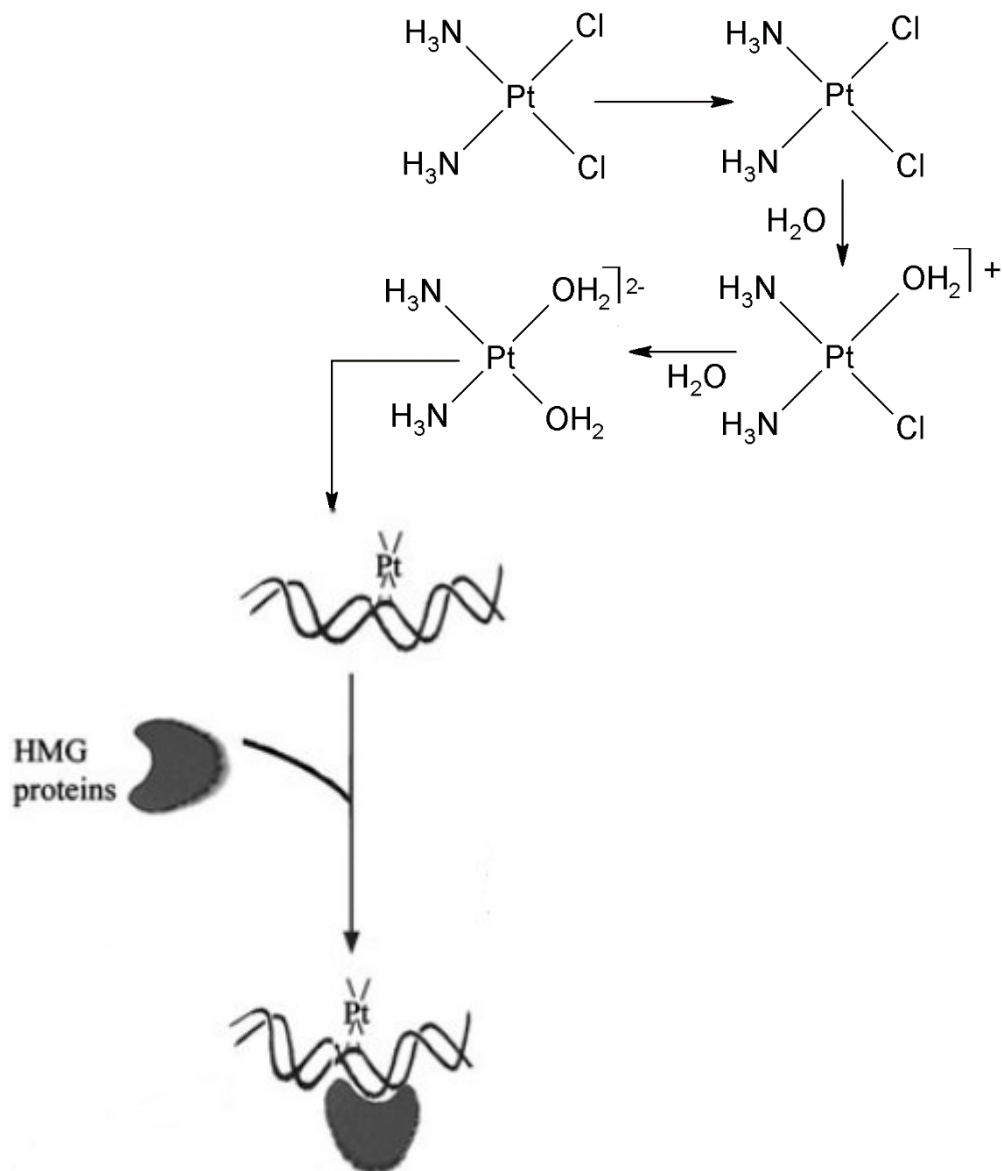
Další nevýhodou použití cisplatiny při léčení jsou její vedlejší účinky, mezi které patří například poškozování ledvin, periferní neuropatie (poškození nervového systému),<sup>22</sup> leukopenie (pokles počtu leukocytů v periferní krvi),<sup>23</sup> poškození močového ústrojí, zvracení, nevolnost dále nefrotoxicita (poškození ledvin)<sup>13</sup> a ototoxicita (poškození vnitřního ucha).<sup>9</sup> Nedávné studie prokázaly, že cisplatinu blokuje funkci jednoho z nejdůležitějších enzymů sodno-draselné pumpy (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPázy).<sup>12</sup> Z důvodu úzkého spektra užití cisplatiny a mnoha vedlejších účinků docházelo k hledání účinnějších a méně toxických alternativ založených například na modifikaci složení cisplatiny.<sup>8</sup> Toto úsilí

směřovalo k syntéze tisíců komplexních sloučenin na bázi platiny, které byly *in vitro* testovány na různých nádorových liniích. Pouze zlomek těchto testovaných látek však dosáhl klinických studií a většina z nich byla nakonec z klinických testů vyřazena. Ty, které dosáhly klinického použití a byly schváleny pro klinické užití, jsou například karboplatina, diammin [1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)-*O,O'*-platnatý komplex, oxaliplatina [*SP-4-2-(1R-trans)*](cyklohexan-1,2-diamin-*N,N'*)[ethandiolato(2-)-*O,O'*] platnatý komplex a nedaplatina *cis*-[diammin-glykolato] platnatý komplex.<sup>8</sup>

### 1.2.1 Mechanismus reakce cisplatiny

Od objevení cisplatiny uplynulo již více než 35 let. Přestože bylo popsáno již mnoho mechanismů účinku této látky, její zcela přesný mechanismus působení není dosud zcela objasněn.<sup>8</sup> K dispozici je velké množství důkazů, že k usmrcení nádorových buněk dochází ze schopnosti cisplatiny tvořit kovalentní vazbu s jadernou DNA. Cisplatina se v buňce váže na purinové báze, konkrétně na *N7*-guaninu, čímž blokuje mechanismus transkripce DNA, a tím i její replikaci.<sup>8</sup> Podrobněji můžeme účinek cisplatiny popsat tak, že působí na DNA v buněčném jádře (Obr. 3), kde je koncentrace chloridových aniontů menší než v extracelulárních tekutinách. V intracelulárním prostředí buňky obsahujícím nízké koncentrace chloridových iontů dochází k odštěpování dvou chloridových ligandů za vzniku kladně nabitě mono- a poté di-aqua formy komplexu. Bylo dokázáno, že právě aqua formy se přímo váží na DNA.<sup>14</sup>

Komplex se váže ve dvou krocích, kdy nejprve vytvoří mono-funkční adukty přednostně na bázích guaninu, které se následně naváží v blízkosti vnitřní řetězcové vazby mezi sousedními purinovými zbytky (1,2-GG nebo 1,2-AG vnitřní řetězcová vazba).<sup>8</sup> Dál dochází k tvorbě menších aduktů 1,3-GXG (X  $\frac{1}{4}$  A,C, T).<sup>8</sup> Adukty tvořené cisplatinou v DNA ovlivňují její sekundární strukturu. *In vitro* studie prokázaly, že interakce mezi molekulou cisplatiny a DNA může přispívat k vytváření superoxidových Radikálů, které způsobují zánik rakovinných buněk.<sup>14</sup> Následná pozorování odhalila, že cisplatina může zastavit *G*<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu (fáze cyklu, kdy dochází ke kondenzaci chromozomů, k tvorbě mitotického aparátu a destrukci jaderného obalu a buňka se připravuje na rozdělení)<sup>25</sup> a spustit programovanou buněčnou smrt (apoptóza). Nicméně jelikož apoptóza je komplexní proces, musí být ještě objeveno množství jiných možných cest pro úplné pochopení mechanismu, pomocí kterého cisplatina spouští apoptózu.<sup>8</sup>



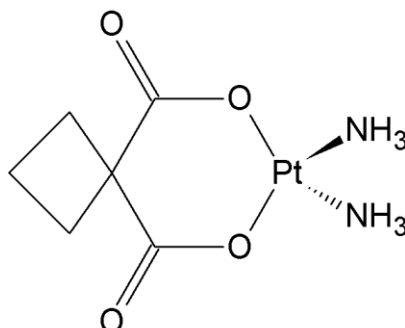
Obrázek 3: Mechanismus působení cisplatiny

### 1.2.2 Karboplatina

Tato sloučenina s obecným vzorcem diammin[1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)]- $O,O'$ -platnatý komplex (obr.4) je prvním derivátem cisplatiny používaným v klinické praxi. Byla syntetizována náhradou snadno odštěpitelných chloridových skupin chelatujících 1,1-cyklobutandikarboxylovou kyselinou.<sup>15</sup> V tomto komplexu je kovový ion koordinován bidentátním dikarboxylovým ligandem. Vzhledem k tomu, že karboxylátová skupina je stabilnější než chloridová, karboplatina vykazuje pomalejší kinetiku.<sup>15</sup> Karboplatina je také stabilnější než cisplatin, a to především kvůli tomu, že ligandy jsou spojeny do chelátového



kruhu a díky tomuto uspořádání se v menším množství váže na bílkoviny a močí se vylučuje v nezměněném stavu.<sup>18</sup>



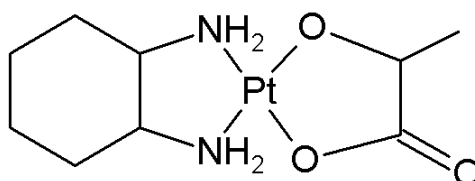
Obrázek 4: *Karboplatina*

V porovnání s cisplatinou je karboplatina lépe tolerována organismem s menším počtem vedlejších účinků. Nižší reaktivita karboplatiny vede také k menší toxicitě pro močové cesty a gastrointestinálního traktu ve srovnání s cisplatinou. Karboplatina úspěšně nahradila cisplatinu při léčbě některých druhů rakoviny, jako je pokročilý recidivující karcinom plic a pokročilá nebo recidivující rakovina vaječníků. Kromě toho nižší toxicita umožňuje použití vyšších dávek a prodloužení doby léčby. Nicméně karboplatina nepřekonává problém lékové rezistence v důsledku zkřížené rezistence (současná necitlivost nádorových buněk na lék, který má podobnou chemickou strukturu a stejný mechanismus účinku) s cisplatinou. Ačkoliv je karboplatina méně toxická a snadněji se podává, nenese žádné zásadní výhody oproti cisplatině.<sup>15</sup> Dnes se běžně užívá jako léčivo v USA, ve Spojeném Království a Kanadě.

### 1.2.3 Oxaliplatin

Oxaliplatin [(1*R*,2*R*)-cyklohexan-1,2-diamin]etanedioato-*O,O'*)platina(II) (obr.5) je další analog cisplatin, který se získá nahrazením snadno odštěpitelných chloridových skupin.<sup>19</sup> V oxaliplatině je kovový iont koordinován 1,2-diaminocyklohexanem a oxalátovým (šřavelovým) ligandem. V roce 1990 byla schválena pro klinické použití na území Evropské unie a v roce 2000 na území Spojených států.<sup>16</sup> Oxaliplatin je nyní používána pro léčení rakovinných linií rezistentních vůči jiným analogům komplexů platiny.<sup>15</sup> Používá se hlavně pro léčbu kolorektálního karcinomu, a to v kombinaci s 5-fluorouracilem a leukovorinem, který obnovuje metabolismus kyseliny listové v kombinaci známé jako FOLFOX.<sup>15</sup> Její účinnost oproti cisplatině je vyšší, ovšem toxicita vůči ledvinám je nižší, což bylo

dokázáno v preklinických studiích prováděných *in vivo*. Bylo také dokázáno, že nevykazuje zkříženou rezistenci s cisplatinou.<sup>15</sup> Cytotoxická aktivita tohoto léku vyplývá z inhibice syntézy DNA v rakovinných buňkách. Ve skutečnosti tvoří jak vně řetězcové, tak vnitro řetězcové vazby v DNA zabraňující replikaci a transkripci DNA a spouští tak buněčnou smrt. Aduky tvořené z oxaliplatinu ztrátou oxalátového řetězce jsou účinnější v inhibici syntézy DNA než adukty DNA vznikající z cisplatinu.<sup>15</sup>

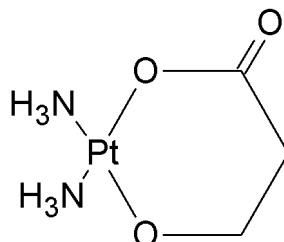


Obrázek 5: Oxaliplatina

#### 1.2.4 Nedaplatina

Nedaplatina [*cis*-diammin-glykolato] platnatý komplex (Obr.6) je analog cisplatinu druhé generace, který byl vyvinut v Japonsku.<sup>17</sup> Tento lék byl vytvořen s cílem minimalizovat nefrotoxicitu a gastrotoxicitu cisplatinu při zachování stejné účinnosti. Nedaplatina představuje dva ammin a glykolátový ligand, který tvoří pětičlenný kruh s platinovým iontem.<sup>15</sup> Rozpustnost nedaplatiny ve vodě je desetkrát vyšší než u cisplatinu. Ve skutečnosti vykazuje nižší nefrotoxicitu než cisplatinu a karboplatina, a zároveň má protinádorové účinky srovnatelné s cisplatinou. Nedaplatina interaguje s DNA podobně jako cisplatinu nebo karboplatina. Její účinnost je podobná jako u cisplatinu, ale bylo dokázáno, že je méně toxická pro ledviny, gastrointestinální trakt a nervový systém.<sup>15</sup> V současné době je registrována v Japonsku pro léčbu nádorových onemocnění hlavy, krku, varlat, plic, vaječnicků, nemalobuněčné rakoviny plic.<sup>8</sup> Může způsobit trombocytopenii (snížení počtu trombocytů v periferní krvi) a také nefrotoxicitu při absenci hydratace před a po ošetření.

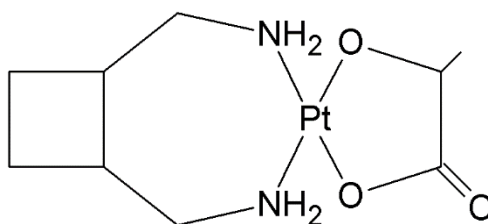
V současné době probíhají klinické testy nedaplatiny zejména v kombinaci s jinými léky proti nemalobuněčné rakovině plic, děložního hrdla, jícnu, varlat, hlavy a krku.<sup>15</sup>



Obrázek 6: Nedaplatina

### 1.2.5 Lobaplatina

V lobaplatině (Obr. 7), jejíž systematický název je [SP-4-2-(1R-trans)](1,2-bisaminomethylcyklobutan-*N,N'*)[hydroxypropaonato(2-)-*O,O'*]platnatý komplex, je platinový ion Pt(II) koordinován dusíkovými atomy 1,5-diaminomethyl-cyklobutanu a jednou molekulou kyseliny mléčné ( $C_3H_6O_3$ ).<sup>15</sup>



Obrázek 7: Lobaplatina

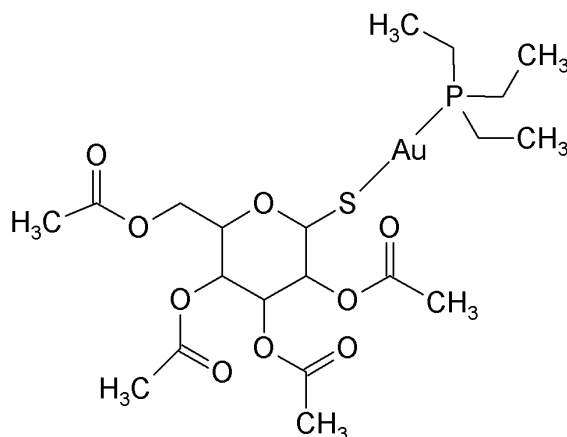
Lobaplatina váže DNA přednostně na zbytcích *N7*-guaninu a vytváří hlavně mezi řetězcové příčné vazby, avšak současně inhibuje DNA a RNA polymerázy. Lobaplatina vykazuje *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti širokému spektru nádorových buněčných linií včetně těch nádorů, které jsou rezistentní vůči působení cisplatinu a karboplatiny.<sup>15</sup> Lobaplatina byla schválena v Číně pro léčbu chronické myeloidní leukemie a neoperovatelných metastatických malobuněčných rakovin plic a prsu. Klinické studie byly rovněž dokončeny v jiných zemích jako jsou USA, Brazílie, JAR a v zemích Austrálie a Evropy pro léčbu rakoviny prsu, jícnu, plic, vaječníků a chronické myeloidní leukemie.<sup>15</sup> Lobaplatina vykazuje malou hodnotu vedlejších účinků oproti cisplatině a menší hodnotu neurotoxicity a nefrotoxicity.<sup>26</sup>

### 1.3 Vícejaderné metalické komplexy

Protože jsou komplexy platiny (II) dobře zavedená léčiva v moderní protinádorové terapii, neřeší klinické problémy jako je získaná rezistence, úzké spektrum účinku, vysoká toxicita a množství vedlejších účinků.<sup>28</sup> Jedna ze strategií k překonání těchto omezení nalézá svou inspiraci v bimetalických katalyzátorech a metaloproteinech. To spočívá v použití vícejaderných komplexních sloučenin s cílem zvýšení biologické aktivity. Je prokázáno, že interakce mezi kovy v těsné blízkosti vede k novým mechanismům účinku proti nádorovým buňkám a díky tomu i ke zvýšení cytotoxicity. Rovněž se bimetalické komplexy mohou v biologickém prostředí rozdělit na dva samostatně působící komplexy, tzv. bimodální látky. Bimodální látky jsou takové, ve kterých každá ze dvou částic může na nádorovou buňku působit zcela odlišným mechanismem účinku, a tím tak zvýšit aktivitu sloučeniny.<sup>28</sup> Tyto komplexy přechodných kovů nabízejí interakci s DNA na několika vazebných místech. Přechodné kovy se mohou vázat na DNA pomocí různých vazebných interakcí, jako je iontová vazba, kovalentní vazba, popřípadě interkalací (vymezením – vazba jednoho ligandu usnadňuje navázání dalšího).<sup>48</sup>

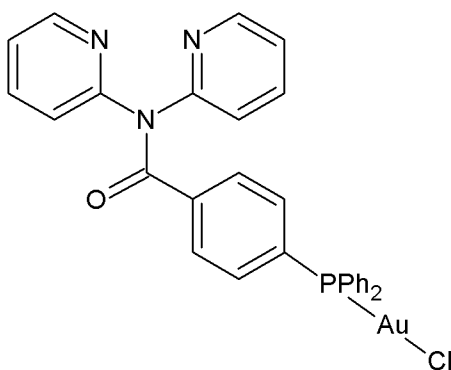
### 1.4 Zlato

Komplexy zlata se již od poloviny 20. století používaly k léčbě artritidy (= autoimunitní onemocnění kloubů provázené ztrátou jejich hybnosti).<sup>27</sup> Dříve se k léčbě používal  $(\text{Na}_3[\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2])$  pod obecným názvem Sanocrysin, avšak v dnešní době se k léčbě tohoto onemocnění používá sloučenina s názvem Auranofin (Obr 8). Auranofin je (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glukopyranosyl)(triethylfosfin) zlatný komplex. Obsahuje fosfinový ligand, který zvyšuje rozpustnost v lipidech a následné vstřebávání léčiva ve střevech.<sup>29</sup>



Obrázek 8: *Auranofin*

Dále bylo dokázáno, že fosfinový ligand má významný vliv na protirakovinnou biologickou aktivitu. S ohledem na výsledky těchto studií byly později syntetizovány a biologicky testovány vícejaderné komplexy zlata.<sup>28</sup> Dále se vědci zabývali zlatem v oxidačním stavu III a bylo prokázáno, že Au (III) má vliv na propustnost buněk (zamezování průchodu částic skrz membránu) a funkci iontových kanálů, receptorů a enzymů. Mimo to bylo zjištěno, že sloučeniny obsahující ve své struktuře Au (III) vyvolávají smrt nádorové buňky tím, že inhibují funkci intracelulárních proteinů, a tím mění mitochondriální funkce.<sup>31</sup> Byly syntetizovány a charakterizovány řady monojaderných i heterodvojjaderných komplexů zlata (I) a platiny (II) s novým dipyridylammino-fosfinovým ligandem (Obr 9).<sup>28</sup>



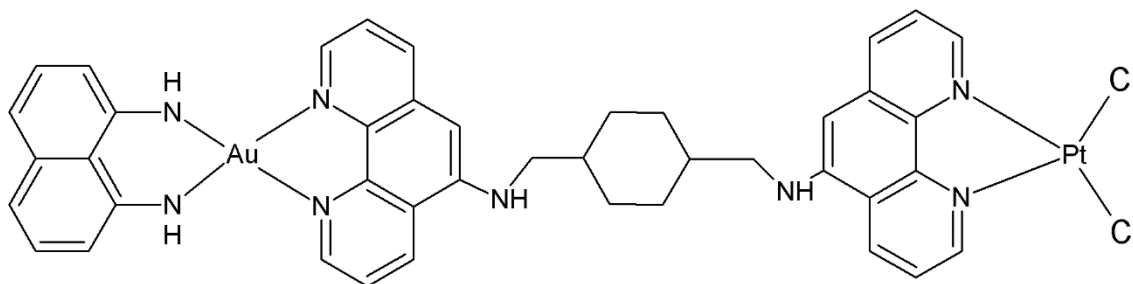
Obrázek 9: Monojaderný komplex s  $PPh_2$  ligandem

#### 1.4.1 Heterobimetalický komplex zlata a platiny

Jak již víme, platnaté léky na bázi platiny jsou jedněmi z nejužívanějších pro léčbu nádorů varlat a vaječníků. V případě komplexů zlata (III) je známo, že ionty tohoto kovu vykonávají celou řadu aktivit, včetně potlačení buněčné proliferace (množení buněk),<sup>30</sup> nesou protinádorovou aktivitu, působí v prevenci proti malárii a také nesou apoptické účinky.<sup>31</sup> Podobnost mezi platinou (II) a izoelektronickým zlatem (III) naznačuje, že komplexy zlata mohou vykazovat slibnou cytotoxicitu.<sup>31</sup>

Byl syntetizován komplex obecného složení  $[Au(L1)(L2)Pt]Cl_2$  (Obr. 10) ( $L1 = 1,8$ -diamminonaftalen,  $L2 = bis-1,4$ -di[[1,10]fenantrolin-5-yl) aminomethyl] cyklohexan).<sup>31</sup> V současné době je tento komplex studován pro jeho protinádorovou aktivitu.

Jedná se o prozatím první studie komplexu tohoto typu při léčbě rakoviny. Účinky této látky byly studovány a testovány na rakovinných embryonálních krysích fibroblastech podobných lidským rakovinným buňkám.<sup>31</sup> Výsledky ukázaly, že komplex nese vyšší aktivitu než cisplatina a *in vitro* studie prokázaly, že jeho účinnost se selektivně zaměřuje pouze na rakovinné buňky, nikoliv na buňky zdravé.<sup>31</sup>

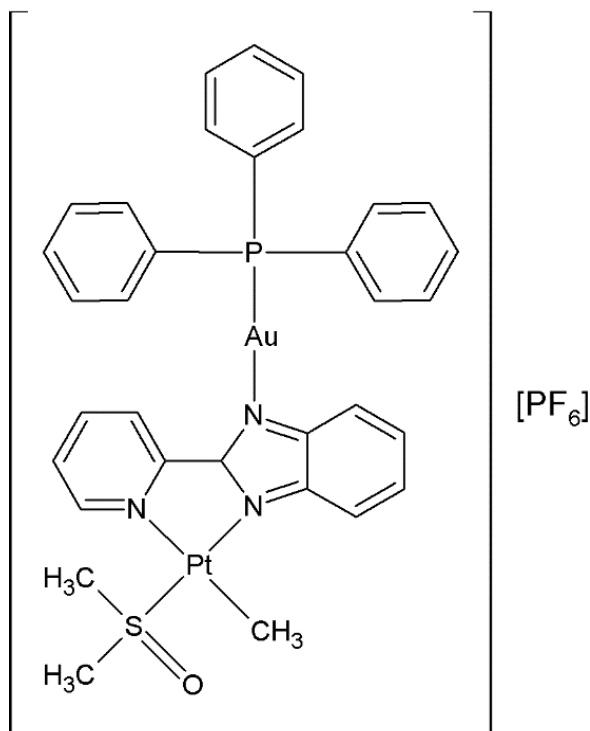


Obrázek 10: Struktura molekuly  $[Au(L1)(L2)Pt]Cl_2$

#### 1.4.2 Heterobimetalický komplex s pbiH ligandem

Navzdory rozmanitosti molekulárních mechanismů, které se projevují v různých třídách platinových komplexů, se ukázala jaderná DNA většinou jako hlavní cíl. Pro většinu z nich jsou rezistenční procesy často aktivovány po dlouhodobé expozici lékům platiny. Za účelem rozšíření spektra aktivity těchto sloučenin se zaměřilo mnoho vědců na potenciál protinádorových léčiv obsahujících centra bez platinových kovů.<sup>56</sup> Mezi nimi bylo prokázáno, že léky obsahující ruthenium a zlato jsou slibná alternativní protirakovinová léčiva. Na základě druhé možnosti, čímž je myšlena synergie mezi léčivem založeným na platině s cytotoxickými neplatinovými kovy, bylo také vyvinuto několik smíšených systémů Pt/Au, které v některých případech představovaly zlepšené chemicko-fyzikální vlastnosti. V rámci toho se vědci rozhodli vyvinout nové heterobimetalické komplexy založené na Pt (II) a Au (I) s využitím 2-(2'-pyridyl)-benzimidazolu (pbiH) jako potenciálního můstkujícího ligandu.<sup>56</sup> Byla syntetizována celá série mono- a dvoujaderných Au (I) a Au (III) komplexů

s tímto ligandem, avšak nejslibnější byl komplex o obecném vzorci  $[(PPh_3)Au(\mu\text{-pbi})Pt\text{-}(Me)(DMSO)][PF_6]$  (Obr. 11).

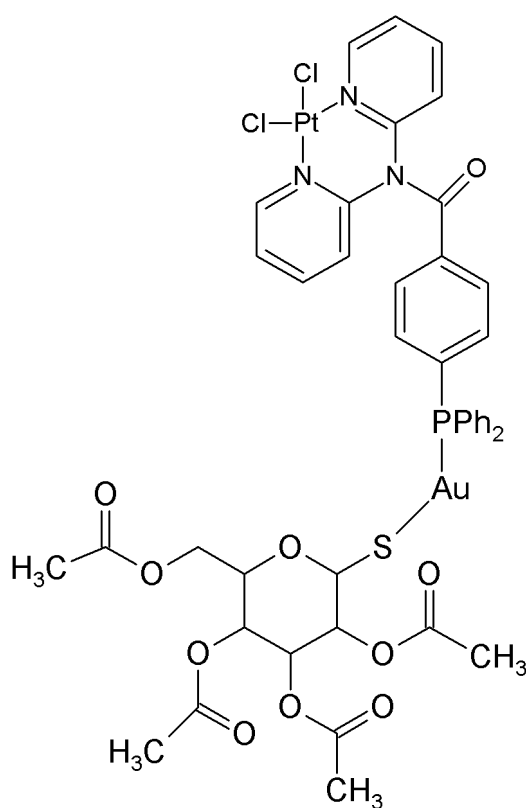


Obrázek 11: Struktura molekuly  $[(PPh_3)Au(\mu\text{-pbi})Pt\text{-}(Me)(DMSO)][PF_6]$

Antiproliferativní účinky tohoto komplexu byly studovány a hodnoceny *in vitro* a vyjádřeny v hodnotách  $IC_{50}$ . Byl testován oproti cisplatině resistantní rakovině vaječníků A2780/S a A2780/R buněčných linií, u kterých nabývá hodnot  $0,19 \pm 0,3$  (A2780/S) a  $0,37 \pm 0,05$  (A2780/R). Zdá se tedy, že v tomto případě dva kovové druhy přítomné v heterobimetalické sloučenině nevykazují synergický efekt, ale spíše aditivní účinek. To vědci usuzují z faktu, že monojaderný komplex Au (I), který je právě výchozí látkou pro přípravu bimetalického komplexu, vykazoval jen o trochu horší cytotoxickou aktivitu. Na druhou stranu je pozoruhodné, že spojení dvou kovových skupin ve stejném molekulárním struktuře nezmenšuje biologický účinek každého z nich.<sup>56</sup>

### 1.4.3 Heterobimetalický derivát auranofinu

V cytotoxické rodině na bázi zlata byly prokázány silné inhibitory buněčné proliferace v lidských nádorových buňkách, pomocí di- a trinukleárních cyklometalovaných komplexů zlata (III) s bis- nebo tris fosfino ligandy a fenylypyridiny. Taková volba byla diktována skutečností, že komplexy zlata a platiny se ukázaly jako jedny z nejvíce cytotoxických metalo drog a že jejich předpokládané intracelulární cíle jsou odlišné. Zatímco platinové komplexy jsou známy svou vysokou afinitou vazby k nukleovým kyselinám, komplexy zlata reagují přednostně s proteinovými cíli.<sup>57</sup> Ke spojení dvou kovů, byl navržen bifunkční ligand, který obsahuje dipyridylaminovou jednotku (DPA) spojenou s difenylfosfinem na jeho konci. Byl syntetizován a charakterizován heterodinukleární komplex zlata (I) a platiny (II) s dipyridylamin-fosfinovým ligandem a kromě toho následná substituce chloridového ligandu zlata s 1-thio- $\beta$ -D-glukóza-tetraacetátem umožnila dosáhnout bimetalického komplexu (Obr. 12), který je derivátem cytotoxického léčiva auranofinu<sup>57</sup>.



Obrázek 12: *Struktura derivátu auranofinu*



Ukázalo se, že tento komplex má vyšší cytotoxickou aktivitu vůči buněčným liniím A2780<sup>cisR</sup> a HEK-293T a jen o málo nižší aktivitu vůči buněčným liniím A549 ve srovnání s cisplatinou. Je důležité ještě zmínit, že u tohoto komplexu byla pozorována vzácná selektivita mezi rakovinnými a zdravými buňkami, které komplex ponechává bez povšimnutí. Vědci berou získané výsledky jako uspokojivé, protože sloučenina vykazovala výrazné antiproliferační vlastnosti a dokázala překonat fenomén rezistence na cisplatinu.<sup>57</sup>

## 1.5 Osmium

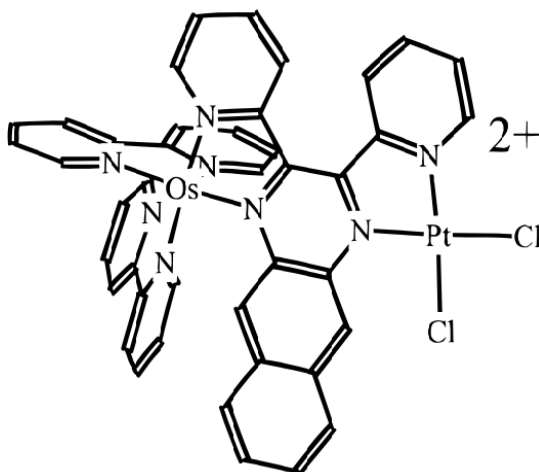
Kovové osmium je velmi podobné platině, ať už v chemických vlastnostech nebo sklonu obou prvků tvořit komplexní sloučeniny. Z tohoto důvodu se vědci snaží rozvíjet potenciální využití osmia dalšími studii a syntézami s cílem přípravy sloučeniny s možnou biologickou aktivitou.<sup>32</sup> Ukazuje se, že komplexy osmia by mohly být velmi prospěšné při léčbě rakoviny vaječníků, tlustého střeva a plic.<sup>32</sup>

### 1.5.1 Protinádorová aktivita osmia

Je dokázáno, že mnohé organokovové sloučeniny osmia vykazují zajímavé účinky vůči rakovinným buňkám. Například  $[\text{OsCl}_6(\eta^6\text{-bifeny})(\text{pinakolát})]$  vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii rakoviny vaječníků A2780 a plic A549.<sup>37</sup> Příkladem může být syntéza 32 polosendvičových komplexů osmia s deriváty fenylazopyridin obecného vzorce  $[\text{Os}(\eta^6\text{-aren})(\text{fenylazopyridin})\text{X}]^+$  ( $\text{X} = \text{chlorid, jodid, aren} = p\text{-cymen, bifenyl}$ ). U těchto sloučenin byla studována cytotoxicita vůči buněčné nádorové linii karcinomu vaječníku A2780, a to již při nanomolárních koncentracích. Rovněž bylo zjištěno, že záměna  $p\text{-cymenu}$  za bifenyl nebo monodentátního ligandu X, tedy chloru za jod, vede k výraznému zvýšení cytotoxické aktivity této sloučeniny.<sup>37</sup>

Organokovové komplexy osmia se staly inspirací pro návrh nových komplexních protinádorových léčiv. Byly syntetizovány komplexy obecného složení  $[(\text{bpy})_2\text{M}(\text{dpb})\text{PtCl}_2]\text{C12}$ : ( $\text{M} = \text{Ru, Os, bpy} = 2,2'\text{-bipyridin, dpb} = 2,3\text{-bis}(2\text{-pyridyl})\text{benzquinoxalin}$ ) (Obr. 13).<sup>35</sup> Zajímavost látek tohoto typu spočívá v tom, že obsahují světlo absorbující ruthenium či osmium, a zároveň platinu.<sup>35</sup> Bylo zjištěno, že komplexy podobných struktur, které obsahují 2,3-bis(2-pyridyl)(benzquinoxalin) ligandy, se vážou

na vazbu DNA často interkalačním způsobem (vmezeřením – vazba jednoho ligandu usnadňuje navázání dalšího).

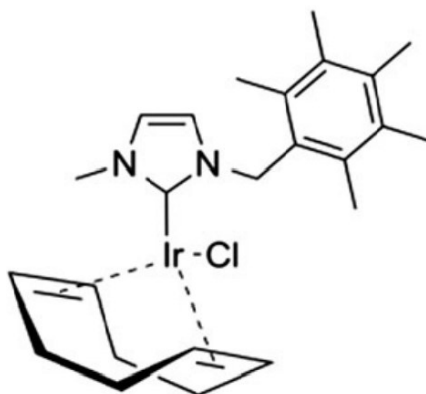


Obrázek 13: Převzato: *Struktura molekuly [(bpy)<sub>2</sub>M(dpb)PtCl<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>*

Myšlenkou bylo párovat cisplatinový zbytek za použití ligandu, který je schopen interkalace do DNA. To poskytuje komplex se dvěma možnými druhy vazby na DNA, interkalace a vazba kovalentní.<sup>35</sup> Výsledky ukazují, že [(bpy)<sub>2</sub>M(dpb)PtCl<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> komplex stejně jako cisplatina tvoří především meziřetězcové příčné vazby, a to dokonce ve větší míře, než je tomu v případě cisplatin.<sup>36</sup> Dále stojí za zmínku komplex osmia [Os(η<sup>6</sup>-*p*-cymen)(pta)Cl<sub>2</sub>], který také vykazuje cytotoxicitu vůči nádorovým liniím HT-29 karcinomu tlustého střeva.<sup>41</sup>

## 1.6 Iridium

Komplexy iridia jsou rovněž předmětem studií, protože samotné komplexy tohoto kovu vykazují slibnou protinádorovou aktivitu. Příkladem může být *N*-heterometalický karbenový komplex iridia, neboli (NHC) iridia (Obr. 14). Vědce zaujal pro jeho zajímavé vlastnosti, protože v současné době je již známo několik kovových karbenových komplexů, které vykazují antiproliferativní účinky.<sup>38</sup> Přestože mechanismus účinku této třídy kovových komplexů je studován, použité iridium (III) neukázalo pouze silnou luminiscenci, ale vykazuje také antiproliferativní vlastnosti *in vitro* a *in vivo*.<sup>38</sup>

Obrázek 14: Převzato: *NHC komplex iridia*

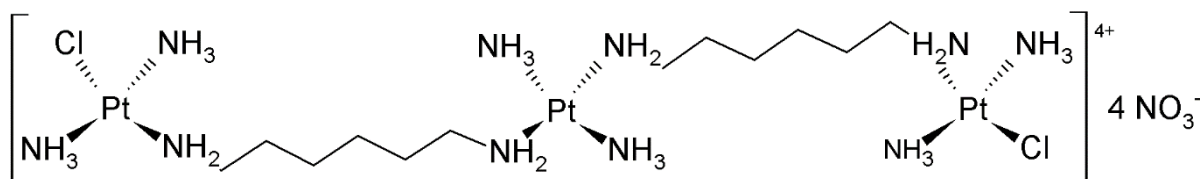
Kvůli nižší stabilitě oxidačního stupně je mnohem menší pozornost věnována komplexům iridia v oxidačním čísle (I). Neexistuje mnoho sloučenin iridia (I), které by mělo antibakteriální, antiparazitické nebo antiproliferativní vlastnosti.<sup>38</sup> Avšak i přes to je mnoho NHC komplexů iridia (I) studováno, a dokonce byla zjištěna přítomnost komplexu v rakovinových buňkách, jako je tomu u NHC komplexu iridia (I) s obecným názvem [1-methyl-3-(pentamethylbenzyl)-imidazol-2-ylidin] cykloheptadien. U tohoto komplexu byla zjištěna antiproliferativní aktivita pomocí MTT testu (stanovení metabolické aktivity) vůči rakovinným buňkám MCF-7 (adenokarcinom prsu), HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva) a HEK-293T (karcinom ledvin), a to při střední inhibiční koncentraci, při které dochází k zamezení růstu organismu  $IC_{50}=14,6\mu\text{M}$ .<sup>38</sup>

### 1.6.1 Polosendvičové komplexy irida

Stejně jako u osmia, tak i u iridia najdeme polosendvičové komplexy, které vykazují slibnou protinádorovou aktivitu. Příkladem může být polosendvičový komplex obecné struktury [(9-EtCbz-3-N:CH-2-py)Ir(Cp\*)Cl][PF<sub>6</sub>], (kde Cp\* = 1,2,3,4,5-pentametylcyklopentadienyl), který vyazuje cytotoxicitu proti rakovinným buňkám MCF-7 hodnotou  $IC_{50}= 8 \mu\text{M}$  koncentracích.<sup>39</sup> Nebo také polosendvičový komplex [Ir(Cp\*)(dm4bt)Cl]SbF<sub>6</sub> (kde dm4bt= 2,2'-difeny-4,4'-bithiazol), který vyazuje cytotoxicitu vůči karcinomu prsu MDA-MB-231 a T47D.<sup>40</sup>

## 1.7 Palladium

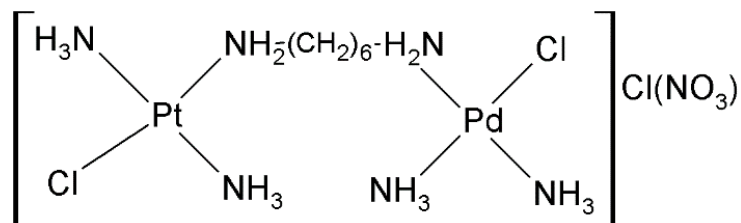
Komplexům paladia není prozatím věnována značná pozornost, jako je tomu u ostatních kovů VIII. B skupiny, avšak i zde nalezneme slibné sloučeniny, u kterých se vyskytují antiproliferativní vlastnosti. U komplexu  $[\text{Pd}(\text{Dox})\text{Cl}_2]$  (dox= doxycyklin) proběhla studie cytotoxické aktivity u myši vůči chronickým myelogenním leukemickým buňkám typu K562. Zmíněný komplex je účinný v inhibici růstu buněk při mikromolekulárních koncentracích a zpomaluje tak průběh nemoci.<sup>42</sup> Co se týče heterometalických komplexů s platinou, tak je věnována pozornost sloučeninám platiny se strukturou zřetelně odlišnou od cisplatiny s myšlenkou rozdílné interakce na DNA. Jeden takový je vícejaderný komplex platiny, který obsahuje dva nebo více platinových jednotek spojených pomocí diamminoalkánových řetězců. Pozoruhodný příklad je BBR3464 (obr 15), který se skládá z transplatinových molekul spojených dohromady pomocí dvěma 1,6-diaminohexanovými molekulami.



Obrázek 15: *Struktura molekuly BBR3464*

U této sloučeniny bylo zjištěno, že obchází přirozenou nebo získanou rezistenci cisplatiny jak *in vitro*, tak *in vivo*. BBR3464 byl již ve fázi II klinických studií, ale další studie byly pozastaveny z důvodu zjištění, že komplex je toxický a způsobuje neutropenii, průjem a nevolnost. Výhodou bylo, že dvě koncové platinové jednotky v tomto komplexu vytváří (primárně meziřetězcové) kovalentní interakce s DNA, zatímco centrální platinová jednotka vytváří pouze nekovalentní interakce, jako jsou vodíkové vazby a elektrostatické interakce. Podle tohoto principu vznikla myšlenka nahrazení centrálního atomu jiným kovem za přítomnosti zbývajících platinových jednotek. Přestože by to mohlo mít jemný vliv na nekovalentní interakce vedoucí k jiným spektrům účinnosti komplexu, tak byly připraveny sloučeniny trojjaderného komplexu o obecném vzorci Pt-Pd-Pt. U sloučenin byla nalezena účinnost proti buněčným liniím lidské rakoviny a jedna měla dokonce 20 x větší aktivitu než cisplatina proti buněčným liniím A2780<sup>cisR</sup>.<sup>43</sup> Po tomto zjištění došlo k přípravě

dvoujaderného komplexu Pt-Pd, který je v současné době studován pro svou protinádorovou aktivitu. Obecný vzorec tohoto komplexu, známý také pod jménem DHD, je [*trans*-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]{μ-(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)}{*trans*-PdCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}(NO<sub>3</sub>)Cl (Obr 16).



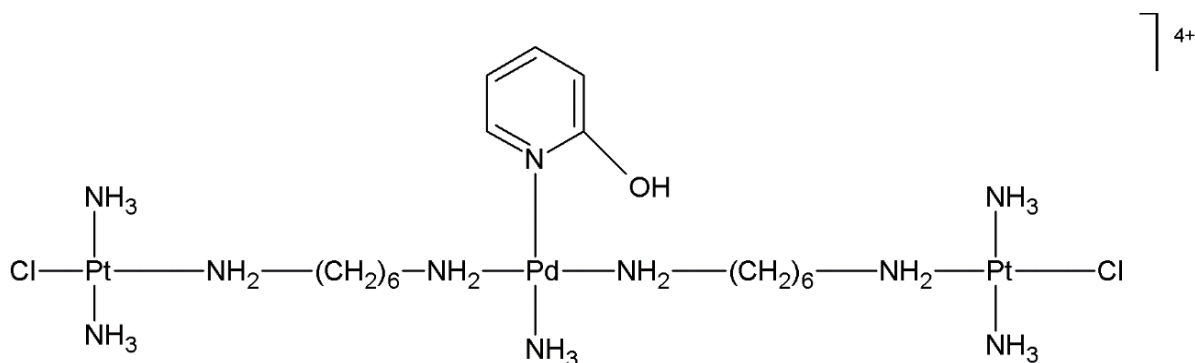
Obrázek 16: *Struktura molekuly DHD*

DHD komplex je syntetizován spojením *trans*-platinové molekuly a *trans*-palladiové molekuly. Jako můstek je použit 1,6-diaminohexan a jako vyrovnávací záporné ionty slouží Cl<sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Testy prokázaly, že látka nese zajímavou protinádorovou aktivitu vůči lidským nádorovým liniím A2780, a věří se, že překoná mnoho rezistencí působících v A2780<sup>cisR</sup> buněčných liniích.<sup>43</sup>

### 1.7.1 CH25

Navzdory neúspěchu při klinických studiích BBR3464 a na základě myšlenky, že změny centrálních kovových iontů nemusí významně měnit kovalentní vazbu koncových kovových iontů, byl syntetizován a charakterizován trinukleární komplex platiny a palladia, který obsahuje právě dvě platinová jádra a jedno jádro palladia spojené můstkujícími diaminoalkánovými řetězci za vzniku sloučeniny o obecném vzorci [*trans*-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]{μ-*trans*-Pd(NH<sub>3</sub>)(2-hydroxypyridin)-(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>}Cl<sub>4</sub> pod označením CH25 (Obr 17).<sup>58</sup> Byla stanovena aktivita sloučeniny proti buněčným liniím lidského karcinomu vaječníků: A2780, A2780<sup>cisR</sup> a A2780<sup>ZD0473R</sup>. Bylo zjištěno, že sloučenina vykazuje významnou protirakovinnou aktivitu proti buněčným liniím a je přibližně 45 krát účinnější než cisplatina proti buněčné linii A2780, přibližně 76 krát účinnější než cisplatina proti buněčné linii A2780<sup>cisR</sup> a přibližně 7 krát účinnější než cisplatina proti linii buněk A2780. Vyšší aktivita CH25 naznačuje, že sloučenina je schopna překonat několik mechanismů rezistence působících v buněčných liniích A2780<sup>cisR</sup> a A2780<sup>ZD0473R</sup>. Předpokládá se, že sloučenina vytváří řadu aduktů s duplexní DNA, která indukuje globální změny v konformaci DNA

na rozdíl od cisplatiny. Vysoká aktivita CH25 ve srovnání s klinicky neúspěšným BBR3464 naznačuje, že nekovalentní interakce zahrnující 2-hydroxypyridinový ligand mohou hrát významnou roli ve zvyšování aktivity CH25.<sup>58</sup>



Obrázek 17: *Struktura molekuly CH25*

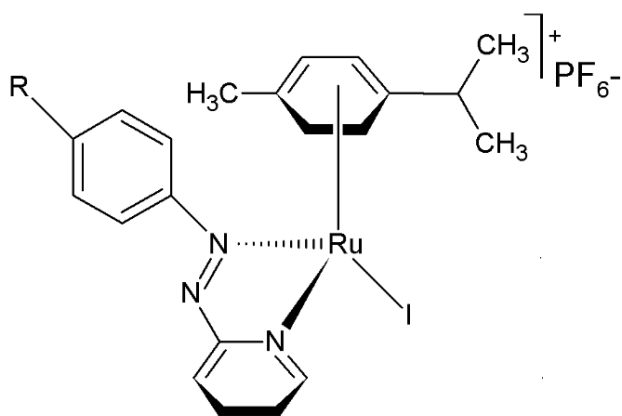
## 1.8 Ruthenium

Ruthenium může existovat v několika oxidačních stavech, avšak co se protinádorových léčiv týká, používá se v oxidačních stavech (II) a (III). Faktem je výměnná konstanta  $\text{Ru}^{3+}$ , která je poněkud pomalá pro reakce iontu s biologickými cíli, zatímco výměnná konstanta  $\text{Ru}^{2+}$  je o řád větší než u  $\text{Pt}^{2+}$ , což naznačuje, že komplexy  $\text{Ru}^{2+}$  jsou vhodnější pro reakci s biologickými cíli v těle. Nicméně obecně pro ruthenium platí, že hlavním faktorem u komplexů je závislost na povaze připojených ligandů. Mezi zajímavosti sloučenin ruthenia (III) patří také to, že v biologickém prostředí se redukují na aktivní částice v ox.s. II.<sup>19</sup>

Komplexy ruthenia, které se používají mimo jiné ve velké míře jako chemické katalyzátory, se ukázaly jako slibné pro léčbu protinádorových onemocnění. Některé sloučeniny ruthenia se používají při léčbě primárních nádorů a jiné mají zajímavé vlastnosti týkající se prevence, zabraňují rozšíření nádorů do dalších částí těla. Komplexy projevují své biologické účinky tak, že se chovají jako specifický inhibitor enzymu, který je důležitý k přežití buňky.<sup>19</sup>

Zajímavými sloučeninami ruthenia (III) nesoucí biologickou aktivitu jsou NAMI-A a KP1019 nebo v případě ruthenia (II) pak  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-bifeny})\text{(en)Cl}]\text{PF}_6$  a  $[(\eta^6\text{-benzen})\text{Ru}(\text{pta})\text{Cl}_2]$ . Poslední dvě zmíněné sloučeniny představují novou skupinu arenových sloučenin s protinádorovou aktivitou. Jejich působení v biologickém prostředí je odlišné oproti působení komplexů platiny. Dochází totiž k odštěpení pouze jednoho ligandu, kterým

je chlor, následuje aquatace a interakce s DNA, která je pouze přes jednu vazbu, nikoliv přes dvě, jako tomu je u platiny. Jelikož mechanismus působení je naprosto odlišný, tím pádem i spektrum nádorových linií, proti kterým jsou tyto látky aktivní, je naprosto jiné, než je tomu u platiny, což znamená že tyto látky jsou naopak aktivní i proti nádorovým liniím rezistentním vůči cisplatině. Nicméně některé sloučeniny ruthenia, které vykazují protinádorovou aktivitu, jsou relativně kineticky inertní a předpokládá se, že vykazují své biologické účinky netradičními mechanismy. Jedním z takových je  $[(\eta^6\text{-cymen})\text{Ru}(\text{azpy})\text{I}]\text{PF}_6$  (Obr 18). Zdá se, že tato sloučenina zabíjí buňky vytvářením ROS (zprostředkováním apoptózy) pomocí katalytických mechanismů.<sup>19</sup>



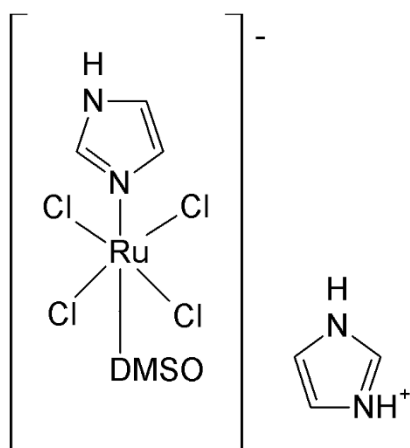
Obrázek 18: Struktura molekuly  $[(\eta^6\text{-cymen})\text{Ru}(\text{azpy})\text{I}]\text{PF}_6$

### 1.8.1 NAMI-A

NAMI-A (Obr. 19) je Ru(III) sloučenina, jejíž systematický název je  $[\text{imH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO-S})(\text{im})]$ . Je syntetizován pomocí komplexu  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  za přidání HCl. Na komplex se váže DMSO ligand (dimethylsulfoxid) a imidazolový ligand, které jsou vůči sobě v *trans* poloze.<sup>19</sup>

NAMI-A není příliš toxická v porovnání s cisplatinou a dávky mohou být i  $500\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}/\text{den}^{-1}$ , avšak při vyšších dávkách může docházet k tvoření puchýřů na rukách a nohách pacientů. Dále bylo zjištěno, že účinek této sloučeniny tkví v zabránění šíření metastazujících nádorů do dalších částí těla<sup>19</sup>, a to především u Lewisova plicního karcinomu, karcinomu mléčné žlázy a B16 melanomu.<sup>44</sup> NAMI-A se nepodílí na zabíjení primárního nádoru, přesto

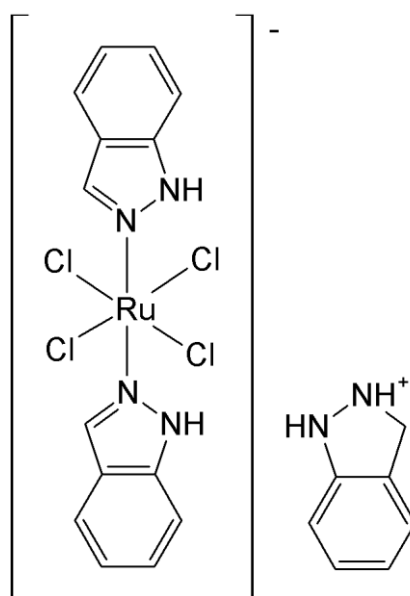
významně zpomaluje průběh nemoci, což dává lékařům více času na případné chirurgické odstranění nádoru, a tak rozšiřuje možnosti při léčbě rakoviny.<sup>19</sup>



Obrázek 19: *Struktura molekuly NAMI-A*

### 1.8.2 KP1019

KP1019 (Obr. 20) je další sloučeninou Ru (III), jejíž systematický název je *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>]. Syntetizoval ho Prof. Keppler a jeho spolupracovníci. Stejně jako u NAMI-A, tak i zde je výchozí látkou RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O s přidavkem HCl a nadbytek heterocyklické báze indazolu za vzniku *trans* komplexu indazolové soli.<sup>19</sup> Na rozdíl od NAMI-A je KP1019 velice účinná látka při léčbě primárních nádorů, rovněž je minimálně toxická a málo rozpustná ve vodě, a proto se podává ve fyziologickém roztoku intravenózně.<sup>46</sup>



Obrázek 20: *Struktura molekuly KP1019*



U této látky nebyly zjištěny žádné znatelné vedlejší účinky a je účinná při léčbě nádorů tlustého střeva SW480 a HT29. Zajímavé také je, že při užívání KP1019 po delší dobu (například 1 rok) se stejně jako u ostatních léků vytváří rezistence nádorových buněk vůči léku, avšak u KP1019 je rezistence po takové době pouze 2x větší, než je tomu u buněk, které nikdy nebyly vystaveny vlivu žádné Ru sloučeniny.<sup>19</sup> Pro srovnání je tato rezistence velice malá a přibližně 10 % při srovnání se získanou rezistencí buněčných linií, které byly vystaveny cisplatině.<sup>45</sup>

### 1.8.3 Heterobimetalické komplexy ruthenia

V dnešní době jde o velice důkladně studovanou skupinu látek, které věnují pozornost všechny prestižní laboratoře světa ve snaze najít účinný lék s antiproliferativními vlastnostmi při léčbě různých druhů rakoviny. Vědci vycházejí z myšlenky spojení dvou a více kovů za vzniku vícejaderných komplexních sloučenin, čímž chtějí docílit ke zvýšení biologické aktivity.<sup>28</sup> U heterobimetalických komplexů ruthenia vycházejí především z cisplatiny a jejích analogů a ruthenia s pestrá molekulární strukturou za použití různých ligandů, protože u obou zmíněných kovů byly již syntetizovány sloučeniny s protinádorovými vlastnostmi.<sup>48</sup> V současné době je pozornost zaměřena především na vazebné vlastnosti ruthenia s biomolekulami, jako jsou DNA a RNA.<sup>49</sup>

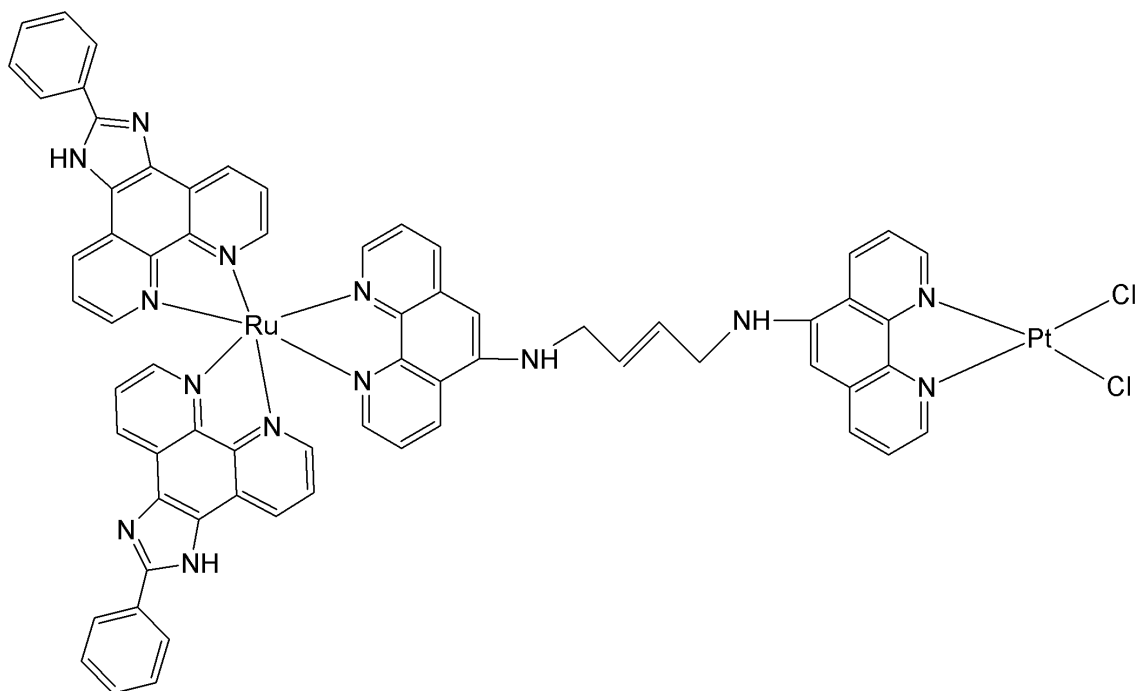
Zajímavými příklady jsou komplexy  $\text{Na}_2\{[\text{RuCl}_4(\text{DMSO-S})(-\mu\text{-pyz})_2\text{PtCl}_2]\}$  s obecným názvem AH197 a  $\text{K}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO-S})(-\mu\text{-pyz})\text{Pt}(\text{DMSO-S})\text{Cl}_2]$  s obecným názvem IT127. U obou komplexů bylo pomocí elektroforézy zjištěno, že mají protinádorové účinky u buněčných linií A549 nemalého karcinomu plic a MDA-MB-231 karcinomu prsu. Především první zmíněný komplex byl mnohem účinnější než NAMI-A. Druhý dvoujaderný komplex byl o něco lepší než NAMI-A.<sup>47</sup>

#### 1.8.3.1 $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{B})\text{Pt}]\text{Cl}_2$

Kationtové komplexy disponující planárními aromatickými ligandy se mohou vázat interkalačně na DNA. Takové metalointerkalátory mají sklon být silně mutagenní a některé z nich ukázaly slibnou chemoterapeutickou aktivitu. Jevily se jako velice nápomocné při prozkoumávání DNA struktury, jejích funkcí a interkalace, protože ligandy komplexů se mohou snadno měnit řízeným způsobem, a tak usnadnit individuální použití. Oktaedrická

struktura a redoxní aktivita komplexů ruthenia (II) zahrnující aromatické planární bidentátní ligandy mají jedinečné a prakticky vyhovující prvky, jako je třeba silně viditelná absorbance ve viditelném spektru. Mnoho ammino komplexů ruthenia (II) má sklon se selektivně vázat na imino skupiny v biomolekulách, protože mají k dispozici volné dusíkaté páry pro koordinaci kovového iontu.<sup>49</sup> Tudíž komplexy ruthenia se často selektivně vážou na histidin, imidazol v proteinech a na purinové báze *N7*-guaninu. V porovnání s jinými komplexy je oktaedrický polypyridil komplex ruthenia mnohem vhodnější, protože je koordinačně nasycený a inertní vůči substituci. Takové komplexy se vážou na DNA skrz tři typy slabých interakcí, a to především převládající elektrostatickou vazbou, která zahrnuje interakci mezi kationtem kovového komplexu a záporným nábojem fosfátu na DNA. Další je interakce ligandu, která je charakterizována pomocí interkalace elektronově deficitní vazby planárního aromatického kruhu (dva – tři šestičlenné kruhy), které přiléhají k párům bází šroubovice nukleové kyseliny. Třetí interakcí je vazba, ve které se kovové komplexy vážou na DNA pomocí vodíkové vazby nebo Van der Walsovými silami.<sup>49</sup>

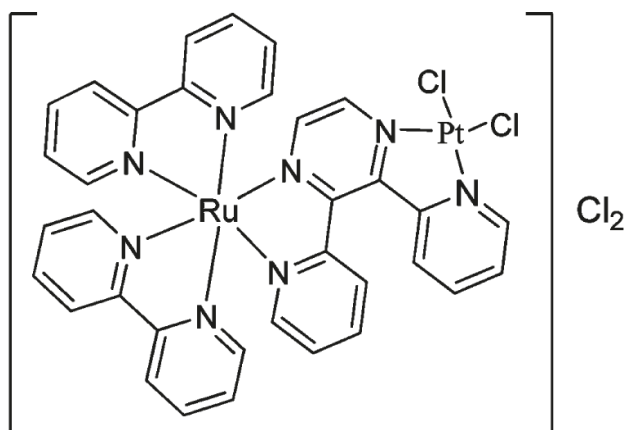
Vědci tedy vycházeli z těchto poznatků a syntetizovali komplex o obecném vzorci  $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{B})\text{Pt}]\text{Cl}_2$  (obr 21). Byl syntetizován s použitím ( $\text{L} = 2$ -fenylimidazo [4,5-*f*] [1,10] fenantrolin a můstku  $\text{B} = \text{bis-1,4-di} [([1,10] \text{ fenantrolin-5-yl}) \text{ ammino}]-2$ -buten). Mutagenita tohoto komplexu byla zkoumána krátkodobým bakteriálním mutačním testem, který se široce používá k detekci mutagenity, tzv. Ames testem. Byl zkoumán pro kmen salmonely TA 98 nesoucí frameshift mutaci (vlození nukleotidu, což způsobí posun čtecího rámce, tzv. frameshift, který vede ke vzniku předčasného terminačního kodónu, a tím tvorbě zkráceného nefunkčního proteinu). Testovaná sloučenina byla přímo účinná na kmen TA 98 již při dávce  $100\mu\text{g}$ .<sup>49</sup>

Obrázek 21: Molekula  $[Ru(L)_2(B)Pt]Cl_2$ 

### 1.8.3.2 Léčba Alzheimerovy choroby

Alzheimerovu chorobu (AD) lze charakterizovat jako progresivní neurodegenerativní poruchu, která vede ke kognitivnímu poklesu a demenci u starších osob. AD je jednou z nejčastějších neurologických poruch a ve Spojených státech je jí postiženo více než 5 milionů lidí. Očekává se, že toto číslo se v příštích několika desetiletích zčtyřnásobí, pokud nedojde k průlomů při objevování léku pro boj s touto chorobou.<sup>50</sup> Mozky pacientů s AD obsahují velké nánosy senilních plaků složených převážně ze 40 a 42 zbytkových peptidů nazývaných peptidy amyloidu- $\beta$  ( $A\beta$ ). Důkazy naznačují, že kognitivní pokles a demence u pacientů s AD vznikají při tvorbě různých agregovaných forem  $A\beta$ , včetně oligomerů, protofibrilů a fibrilů. Zprávy rovněž naznačují, že nízkomolekulární rozpustné oligomery  $A\beta$  jsou primární neurotoxické látky odpovědné za paměťové deficity. Navíc bylo zjištěno, že přírodní produkty, jako je kurkumin, vitamín A a další obsahující polyhydroxyfenoly, jsou účinnými inhibitory při zmírňování amyloidní toxicity u transgenních myší. Interakce přechodných kovů s  $A\beta$  peptidem byla dobře charakterizována a předpokládá se, že hraje důležitou roli v AD.<sup>50</sup>

Zdá se, že klíčem úspěchu při léčbě AD je zároveň překonání největšího problému, a tím je inhibice  $A\beta$  agregace v raných fázích, pokud možno na monomerní úrovni, protože oligomery jsou známé jako neurotoxické. V tomto ohledu se využívá chelatační vlastnost kovu, kterou je schopnost vytvářet s  $A\beta$  molekuly, jež mohou překonat tuto překážku. Bylo uvedeno, že jeden takový kovový komplex ( $[Pt(BPS)Cl_2]$ ) efektivně inhibuje agregaci a toxicitu  $A\beta_{42}$ .<sup>50</sup> Tento komplex byl schopen se navázat na  $A\beta_{42}$  na N-koncové části peptidu a vyvolal tak konformační změnu vedoucí k účinné inhibici. Vědci se proto rozhodli navázat na předchozí studie a syntetizovali sloučeninu o obecném vzorci  $[(bpy)_2Ru(dpp)PtCl_2]Cl_2$  (Obr. 22).



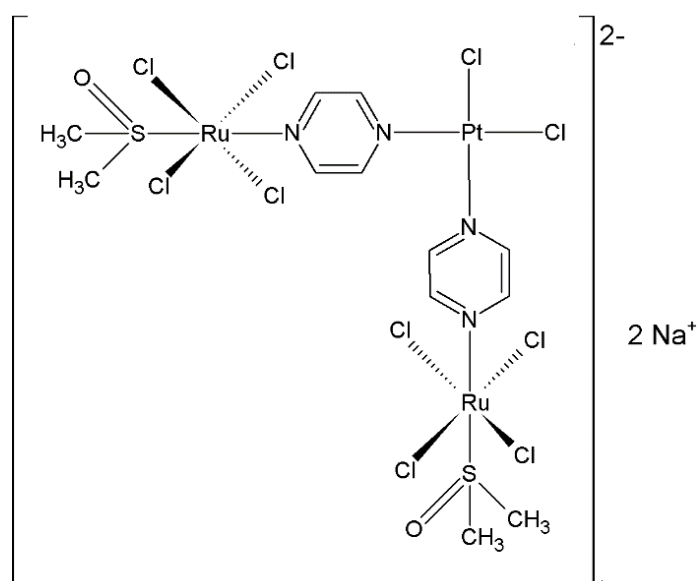
Obrázek 22: Molekula  $[(bpy)_2Ru(dpp)PtCl_2]Cl_2$

Sloučenina byla navržena zavedením druhého kovu obsahující Ru (II) přes přemostující hydrofobní bipyridylový ligand pro centrum Ru (II), protože bipyridylové ligandy (podobné polyaromatickým sloučeninám) koordinují na Ru a vytváří velký hydrofobní povrch, který může zvýšit schopnost sloučeniny vzájemně na sebe působit s podobnými povrchy v  $A\beta$  peptidu. Při kontrolních testech vykazovala sloučenina při nižších koncentracích podobné výsledky jako platnatá sůl a při vyšších koncentracích měla lepší výsledky inhibice agregátu  $A\beta_{42}$ , což vědce utvrdilo v jejich ideji o kladném přínosu druhého kovového centrálního atomu.<sup>50</sup>

### 1.8.3.3 AH197

Použití platinových komplexů jako chemoterapeutických činidel je praxí, která vládla při léčbě rakoviny, protože lék na bázi platiny, cisplatina, byl zaveden před téměř čtyřmi

desetiletími. Zatímco mnoho forem chemoterapie, včetně léčby cisplatinou, mohou být mimořádně účinné při léčbě primárních nádorových onemocnění, tak mnohé z těchto léků nezůstávají účinné poté, co se rakovina stane maligní.<sup>59</sup> Z tohoto důvodu byly spolu s nežádoucími vedlejšími účinky a rezistencí na léky spojené s cisplatinou a jinými léčivy na bázi platiny vyhledávány nové farmaceutické přípravky obsahující alternativní kovy. V posledních letech vykazovaly komplexy ruthenia slibné jak antiproliferativní, tak i anti-metastatické účinky. Z několika málo těchto sloučenin, které jsou v současné době v klinických studiích, bylo prokázáno, že NAMI-A, dobře studovaný druh ruthenia (III), se váže na sérum proteinů a jako léčivo významně inhibuje mobilitu rakovinných buněk, což pravděpodobně odpovídá jeho celkové anti-metastatické aktivitě. Právě anti-metastatická povaha NAMI-A je obzvláště slibná v tom, že by mohla potenciálně pozvednout skupinu komplexů, které jsou aktivní při léčbě pozdějších stadií maligních nádorů.<sup>59</sup> Již je známo, že mnohojaderné komplexy s různými kovovými centry mohou potenciálně vykazovat synergický efekt, a tak mít větší vliv na jejich biologický cíl než jednotlivé komplexy odděleně. Již bylo objeveno mnoho jednojaderných platinových sloučenin, které mají unikátní chování a vykazují různé interakce s DNA ve srovnání s cisplatinou. Podle těchto poznatků byl syntetizován tříjaderný komplex AH197 (Obr. 23) se strukturálním vzorcem  $[\text{Na}_2]\{[\text{RuCl}_4(\text{DMSO-S})(-\mu\text{-pyz})]_2\text{PtCl}_2\}$ , který vychází ze struktury NAMI-A a cisplatiny za účelem získání těch nejlepších vlastností obou tříd léčiv. Bylo prokázáno, že AH197 interaguje s DNA ve větší míře než cisplatinou.



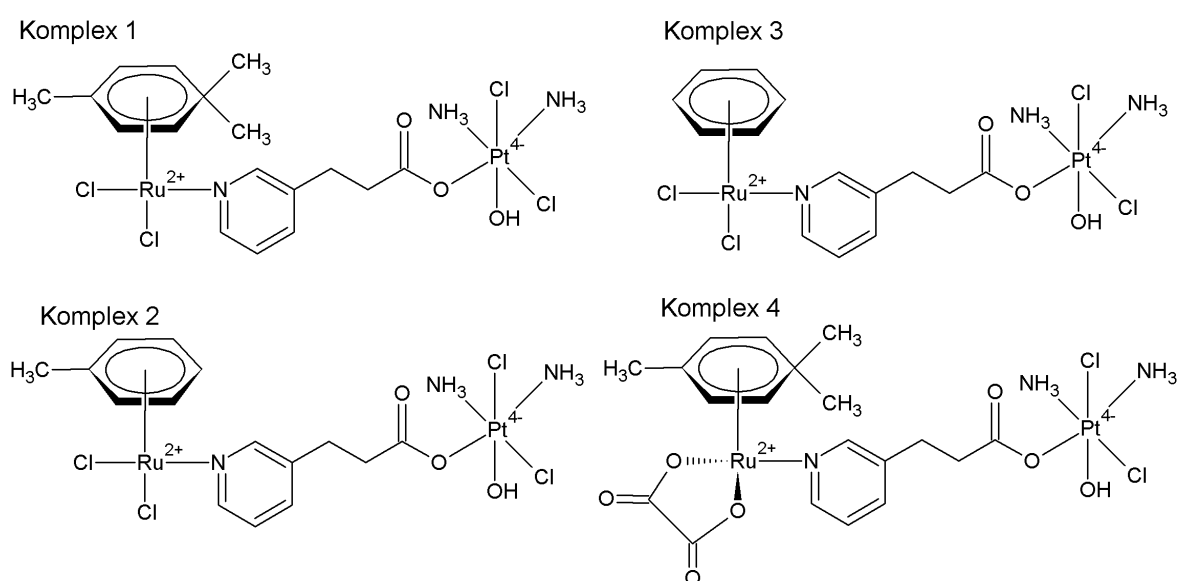
Obrázek 23: *Struktura molekuly AH197*

Vzhledem k přirozené obtížnosti při charakterizaci komplexů ruthenia (III) bylo nutno použít alternativní spektroskopické metody, aby bylo možné studovat průběh jejich reakcí nebo identifikovat meziprodukty a konečné produkty.<sup>59</sup> EPR se užívá jako omezený spektroskopický nástroj ke sledování redukce ruthenia (III) na ruthenium (II) v komplexech typu NAMI jako detektor "off/on", kde signál EPR mlčí pro diamagnetické ruthenium (II). To pomáhá při charakterizaci aktivních druhů *in vivo*, protože komplexy ruthenia (III) jsou spekulovány, že působí jako prekurzory mechanismu "aktivace redukcí". Právě proto za účelem vyhodnocení potenciálu tohoto komplexu jako anti-metastatický byl pomocí této metody testován vliv na mobilitu ve dvou rakovinných buněčných liniích, a to A549 a MDA-MB-231. Jelikož obě buněčné linie jsou vysoce invazivní a byly použity pro podobné testy mobility v předchozích studiích, byly tyto linie považovány za zvláště vhodné pro použití při hodnocení sloučeniny jako anti-metastatické látky. Bylo zjištěno, že sloučenina je aktivní vůči oběma biologickým liniím, a to při menších koncentracích než cisplatina a také nutno dodat, že sloučenina má výrazné inhibiční účinky na mobilitu buněk. Úplná inhibice byla pozorována již při 10  $\mu\text{M}$ , zatímco při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  byla hladina inhibice srovnatelná s inhibicí NAMI-A při 100  $\mu\text{M}$ , což naznačuje, že AH197 vykazuje inhibiční účinky, které jsou přibližně o dva řády větší než NAMI-A. Ačkoliv anti-metastatické vlastnosti komplexů ruthenia nejsou ještě stále plně pochopeny, tak vědci mají za to, že inhibice buněčné mobility je spojena s anti-metastatickou povahou komplexů a také tím, jak se zvyšuje počet kovových center v komplexu.<sup>59</sup>

#### 1.8.3.4 Ruthplatiny

Rezistence vůči lékům a metastazující nádory jsou hlavními překážkami pro účinnou chemoterapeutickou léčbu rakoviny. Z těchto důvodů jsou velmi žádoucí nové strategie a způsoby pro získání takových léků, které právě umožňují bojovat s rezistencí vůči lékům nebo s metastazujícími nádory. V klinických podmínkách byla široce aplikovaná kombinační terapie, a to pomocí různých typů protirakovinných léčiv s malými molekulami, které jsou dobře vyvinuté a aplikovatelné na bázi kovu, jako je Pt, Ru, Au atd. Tyto heterometalické a multimetalické komplexy mohou způsobit synergismus tím, že se zaměřují na různé biologické cíle s použitím dvou nebo více kovů v jedné molekule. Použitím dvou a více léčiv jako jedné molekuly může umožnit kontrolu farmakokinetických a biologických vlastností léčiv.<sup>60</sup> Navíc, i když u různých typů lidských rakovinových buněk může cytotoxicita některých heterobimetalických nebo multimetalických sloučenin

překročit hladinu cisplatinu, která je dosud zlatým standardem protinádorových léčiv na bázi kovu, tak jen velmi málo z nich vykazuje působivé účinky při zabíjení buněk rezistentních na cisplatinu v submikro molárním rozmezí. Proto podle inspirace kladného působení platiny i ruthenia při léčbě rakoviny byla navržena řada heterodinukleárních komplexů Pt (IV) a Ru (II) rozpustných ve vodě označovaných jako ruthplatiny (Obr. 24) s cílem, aby bylo získáno výhod obou kovů za účelem bifunkčních protinádorových léků.



Obrázek 24: Ruthplatinové komplexy 1-4

Ruthplatiny jsou ojedinělým příkladem bifunkčního heterodinukleárního komplexu Pt (IV) a Ru (II). Patří mezi nejaktivnější sloučeniny proti nádorovým typům rezistentních vůči cisplatině a mají významné antimetastatické vlastnosti.<sup>60</sup> Ruthplatiny 1 – 4 byly získány v rozumných výtěžcích reakcí PPA-Pt (IV) s různými dimery arenu-Ru (II). Komplexy ruthplatiny 1 – 3 mají cymen skupinu s různými substituenty, zatímco ruthplatina 4 má oxalát místo dvou chloridů, který koordinuje s Ru. Všechny zmíněné ruthplatiny mají větší rozpustnost než cisplatinu. Tyto ve vodě rozpustné bifunkční heterodinukleární komplexy Pt (IV) a Ru(II) s jedinečným účinkem vykazují submikromolární a nanomolární cytotoxicitu ve většině testovaných lidských rakovinných buňkách, což je mnohem vyšší než cisplatinu.<sup>60</sup>

U různých typů rakovinných buněk citlivých na cisplatinu vykazují ruthplatiny až 32krát větší cytotoxicitu ve srovnání s cisplatinou. Ruthplatiny jsou také více cytotoxické než jiné léky zahrnující PPA-Ru (II), PPA-Pt (IV) a směs cisplatinu a PPA-Ru (II). Ještě zajímavější

je, že ruthplatiny vykazují významnou aktivitu u buněk rezistentních na cisplatinu A2780<sup>cisR</sup> a A549<sup>cisR</sup>, a to až do 107násobného zvýšení ve srovnání s cisplatinou. Například hodnoty IC<sub>50</sub> cisplatin v buňkách A2780 a A2780<sup>cisR</sup> jsou 0,92 a 16 mM, zatímco hodnoty komplexu ruthplatiny 2 ve stejných buněčných liniích jsou 0,12 a 0,15 mM. Faktor rezistence (RF) definovaný jako poměr hodnoty IC<sub>50</sub> v buňkách rezistentních na cisplatinu k hodnotám v buňkách citlivých na cisplatinu činí 17 právě pro cisplatinu. RF se dramaticky snižuje na 1,3 pro ruthplatinu 2. Významně zvýšená cytotoxicita a snížení RF bylo také pozorováno u buněk A549 a A549<sup>cisR</sup> a ruthplatiny jsou rovněž velmi aktivní proti růstu lidského prsu (MCF-7, MDA-MB-231) a růstu cervikálních (HeLa) a leukemických (HL -60) rakovinných buněk. Avšak ve srovnání s cisplatinou se cytotoxicita ruthplatiny významně neliší u buněk Hs27 a MRC-5<sup>60</sup>.

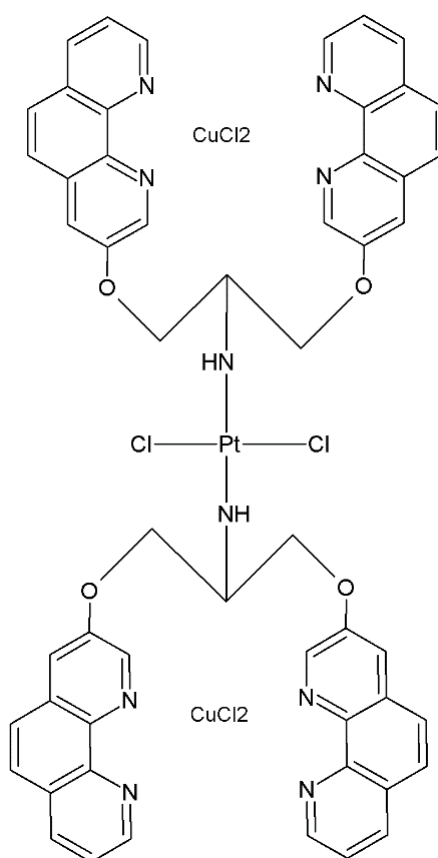
**Tabulka č. 1.** IC<sub>50</sub> (mM) hodnoty heterodinukleárních sloučenin (ND = není určeno)

<b>Buněčná linie</b>	<b>cisplatin</b>	<b>komplex 1</b>	<b>komplex 2</b>	<b>komplex 3</b>	<b>komplex 4</b>
<i>A2780</i>	0,92 ± 0,3	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,03
<i>A2780<sup>cisR</sup></i>	16 ± 5	0,43 ± 0,01	0,15 ± 0,09	0,32 ± 0,06	0,19 ± 0,03
<i>RF<sup>b</sup></i>	17	3,6	1,3	2,7	2,1
<i>A549</i>	4,3 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,09
<i>A549R</i>	24 ± 3	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6	1,0 ± 0,3
<i>RF</i>	5,6	1,4	1,2	2,0	1,7
<i>MDA-MB-231</i>	9,2 ± 2,4	0,55 ± 0,2	ND	ND	ND
<i>MCF-7</i>	9,6 ± 0,8	0,41 ± 0,04	ND	ND	ND
<i>HeLa</i>	3,4 ± 0,1	0,74 ± 0,10	0,91 ± 0,2	0,92 ± 0,04	0,35 ± 0,04
<i>HL-60</i>	4,1 ± 1	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,02
<i>MRC-5</i>	1,0 ± 0,3	1,7 ± 0,7	4,2 ± 1,1	1,5 ± 0,7	3,1 ± 2,0
<i>Hs27</i>	12 ± 1	5,4 ± 1,9	7,0 ± 1,7	7,4 ± 1,7	13,0 ± 2,0



## 1.9 Měď

Jednou z významných terapeutických strategií eradikace rakovinných buněk je vývoj léků zaměřených na poškození DNA. Právě interakce takových léků s DNA často vede ke vzniku koordinačních, kovalentních nebo nekovalentních aduktů, čímž narušuje transkripci anebo replikaci. Cisplatina a bleomycin jsou známými zástupci této kategorie vysoce účinných protinádorových činidel. Bleomycin (cytostatikum interferující s DNA) byl izolován od *Streptomyces verticillus* poprvé v roce 1966. Při spojení s železem nebo mědí za přítomnosti redukčního činidla mohou vzniklé komplexy katalyzovat v tvorbu jednořetězcových a dvouřetězcových DNA lézí, které jsou smrtelné pro rakovinné buňky.<sup>51</sup> Toto zjištění vedlo k návrhu a přípravě syntetických bleomycinových modelů, jako je Cu (3-Klip-Fen). Tento pevný komplex o obecném vzorci  $\text{Cu} [\text{Pt}-1-(1,10\text{-fenantrolin-3-yloxy})-3-(1,10\text{-fenantrolin-8-yloxy})\text{propan-2-amin}]-\text{Cl}_2] \text{Cl}_2$  (Obr. 25) byl navržen tak, aby změnil vnitřní mechanismus působení platinové části i části Cu (3-Klip-Fen), kde Klip je označení pro serinový můstek mezi částmi fenantrolinového ligandu.



Obrázek 25: Molekula  $\text{trans-Cu}[\text{Pt}(3\text{-Klip-Fen})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$

Komplex obsahuje platinové centrum, které je koordinované s dvěma 3-Klip-Fenovými skupinami, pomocí aminového ligandu a dvěma chloridy, které jsou v *trans* konformaci.<sup>51</sup> Vzhledem k silným interakcím s DNA, v níž dominovaly jak elektrostatické interakce, tak částečné interkalace, -Fen deriváty vykazují velmi vysoké aktivity nukleázy. Nicméně Cu (3-Klip-Fen) není schopen provádět přímé narušení dvouřetězce (DSB) sloučeniny, proto platina, která je přímo vázána na komplex DNA v Cu (3-Klip-Fen), hraje důležitou roli.<sup>52</sup> Výsledkem je, že platinová část v sloučenině působí jako protinádorové léčivo, a zároveň jako kotva k DNA, čímž umožňuje části Cu (3-Klip-Fen) provést štěpení v těsné blízkosti Pt-DNA. Tím jsou posíleny možnosti dosažení dvouřetězových zlomů (DSB), které jsou právě vysoce cytotoxické.<sup>51</sup>

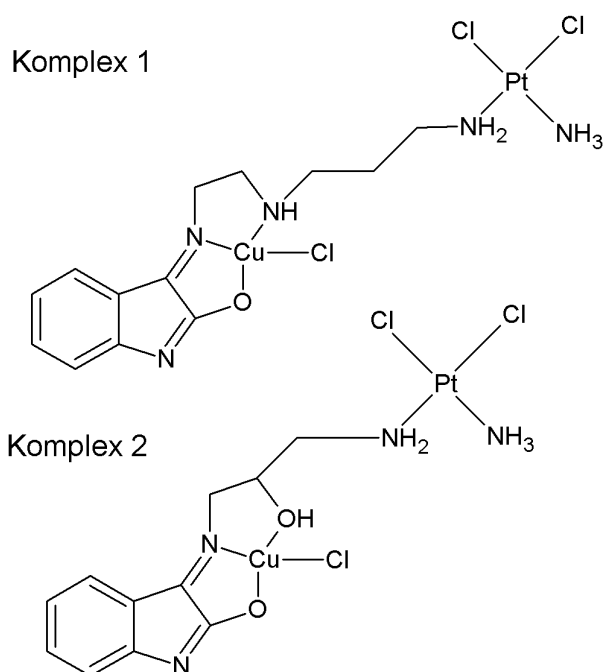
Rakovinné buňky mají zabudované ve svém genu přežít, takže budou selektivně vybrány všechny genetické změny, které podporují přežití před nepříznivými stavy. V důsledku toho některé nádory přežívají i při styku s těmi nejsilnějšími terapeutickými léky. Je třeba mít na paměti, že migrující rakovinové buňky (zodpovědné za tvorbu metastáz) jsou rezistentní vůči proapoptotickým činidlům (způsobující apoptózu) a 80 % současných léků užívaných onkology k boji proti rakovině je proapoptotická látka, která vykazuje omezenou účinnost proti metastázovým rakovinným buňkám. Z toho vyplývá, že 90 % pacientů s rakovinou umírá v důsledku jejich metastáz.<sup>51</sup> Snížení úrovně migrace metastázových rakovinných buněk významně zvýší citlivost na proapoptotická léčiva. Z toho důvodu byla sloučenina testována na buněčných liniích A549 nemalobuněčného nádoru plic (NSCLC) a na modelu humánního U373 glioblastomu (GBM). Je důležité zmínit, že obě buněčné linie A549 NSCLC a U373 GBM jsou rezistentní vůči proapoptotickým činidlům. Podle výsledků má sloučenina sice slabší cytotoxické účinky *in vitro*, avšak je spojena s výraznými antiimigračními účinky, čímž se významně liší od ostatních. Z toho vyplývá, že dalším záměrem a předmětem studií bude kombinovaná terapie s konvenčními cytotoxickými činidly (jako je taxol, irinotekan, temozolomid a gemcitabin) a následné testy *in vivo*.<sup>51</sup>

### 1.9.1 Heterobimetalické komplexy s oxindoliminovým ligandem

Vědci vyvíjí velké úsilí a zkoumají různé typy kovových komplexů co se týče jejich preferenční cílů a možných mechanismů působení. DNA je právě opakujícím se cílem mnoha navrhovaných protinádorových léků, protože reverzibilní nebo irreverzibilní modifikace nukleových kyselin mohou vést k narušení jejich transkripce a replikace, což

nakonec vyvolá smrt rakovinných buněk. V mnoha případech je však redoxní chemie kovového centra odpovědná za hlavní způsob působení takových komplexů a v jiných případech mohou být léky na bázi kovu aktivovány právě redoxním procesem. Využívá se proto začlenění druhého kovu do rozšířeného ligandu, kdy dojde k posílení chemických vlastností, jako je reaktivita komplexu, stabilita, lipofilnost, redoxní vlastnosti a antiproliferační účinky, ve srovnání s jeho mononukleární analogy.<sup>61</sup>

Předchozí studie ukázaly, že komplexy mědi (II) oxindol-Schiff jsou schopny štěpení řetězců DNA, působit jako činidlo uvolňující vazbu proti směru homogenizace a významně inhibovat topoizomerázu IB a cyklin-dependentní kinázy (Cdk). Způsob působení tohoto typu komplexu je velmi odlišný od způsobu popsaného pro cisplatinu a příbuzné komplexy.<sup>61</sup> V literatuře již bylo uvedeno několik studií se zaměřením na sloučeniny mědi a platiny a všechny z nich upřednostňují interakce potenciálního protirakovinného činidla s DNA za použití heterocyklických aromatických ligandů, jako je třeba fenantrolin. V těchto studiích byly použity bifunkční ligandy, aby se významně zvýšila aktivita štěpení DNA komplexu ve srovnání s komplexy mědi samotnými. S cílem ověřit rozdíly, popřípadě synergické účinky mezi oběma kovovými centry, byly navrženy, izolovány a charakterizovány dva nové komplexy mědi (II) a platiny (II) s rozšířenými ligandy obsahujícími jak oxindoliminové, tak aminové koordinační skupiny (komplexy 1 a 2) (Obr. 26) schopné silně vázat oba kovové ionty.<sup>61</sup>



Obrázek 26: Struktura molekul komplexů 1 a 2

Cisplatinová část může indukovat deformaci při silné vazbě na DNA, zatímco strana oxindoliminu a mědi je schopna poškodit DNA a mitochondrie oxidačním mechanismem a dále inhibovat klíčové proteiny. Reaktivita těchto heterobinukleárních komplexů vůči nádorovým buňkám byla následně ověřena ve srovnání s odpovídajícími mononukleárními komplexy mědi (II) se stejnými bifunkčními oxindolimin-aminovými ligandy a cisplatinou. Cytotoxické aktivity komplexů byly srovnávány s cytotoxickými účinky cisplatinou vůči myššímu melanomu B16F10 a sarkomovým buňkám lidské dělohy MES-SA a MES-SA/Dox5. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. Stanovené hodnoty  $IC_{50}$  vůči myššímu melanomu jsou v rozmezí od 0,6 do 1,9  $\mu\text{M}$  a komplexy obsahující platinu byly aktivnější než právě odpovídající měďnaté komplexy.<sup>61</sup> Komplex 1 byl pozoruhodně reaktivnější než cisplatina s hodnotou  $IC_{50}$  4krát nižší, zatímco komplex 2, stejně jako mononukleární sloučeniny mědi, vykazoval přibližně stejnou reaktivitu s cisplatinou. Pokud jde o sarkomové buňky, byly jaderné komplexy mědi (II) mnohem méně reaktivní než komplexy obsahující Pt. V tomto případě bylo prokázáno, že komplex 1 je stejně aktivní jako cisplatina s  $IC_{50}$  stejného řádu ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ), zatímco komplex 2 vykazoval mnohem menší aktivitu. Porovnáním standardních sarkomových buněk s rezistentními buňkami vůči působení heterobinukleárních komplexů 1 a 2 je odlišné od působení mononukleárních komplexů mědi. Sloučeniny obsahující platinu prokázaly nižší rezistenci vůči rezistentním buňkám.<sup>61</sup>

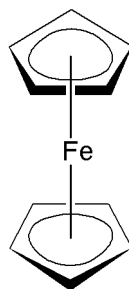
Vzhledem k tomu, že rezistence v těchto sarkomových buňkách byla vyvinuta léčbou doxorubicinem, léčivem, které je z buňky P-glykoproteinem nadměrně exprimováno v rezistentních buňkách, mohou tyto výsledky naznačovat způsob působení komplexů. Komplex 1 s delším linkerem mezi kovovými centry byl nejvíce reaktivní pro oba typy buněk vykazující nižší nebo podobné hodnoty  $IC_{50}$  ve srovnání s cisplatinou.<sup>61</sup>

**Tabulka č. 2.**  $IC_{50}$  (mM) hodnoty heterometalických sloučenin

<i>Buněčná linie</i>	<i>cisplatina</i>	<i>komplex 1</i>	<i>komplex 2</i>
<i>MES-SA</i>	0,93 ± 0,06	0,98 ± 0,05	2,89 ± 0,20
<i>MES-SA/Dox5</i>	0,46 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,98 ± 0,05
<i>B16F10 melanom</i>	2,88 ± 0,45	0,63 ± 0,25	1,91 ± 0,20

## 1.10 Ferrocen

Organokovová chemie a biochemie se spojily během posledních dvou dekad do nového oboru, a to bioorganometalické chemie. Tato relativně nová oblast výzkumu věnuje velkou část svého úsilí syntéze sloučenin ferrocenu (Obr. 27) a jejich biologickým a lékařským účinkům proti některým typům nemocí, jako je rakovina a malárie. Ferrocen se rovněž používá ve vojenství.<sup>53</sup>



Obrázek 27: Molekula Ferrocenu

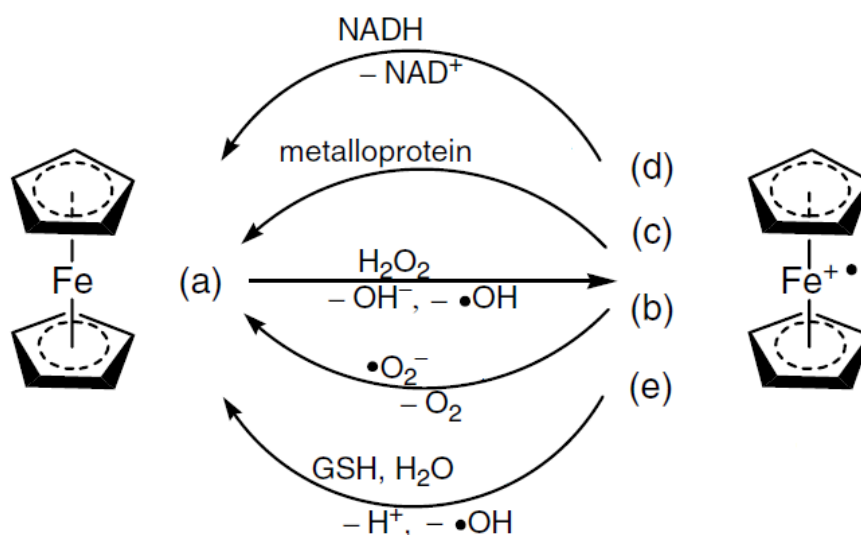
### 1.10.1 Vlastnosti

V průběhu posledních let dochází k rychlému růstu použití ferrocenu v bioorganometalické chemii, protože se jedná o stabilní, netoxickou sloučeninu a má dobré redoxní vlastnosti. Jde o organokovovou sloučeninu s celým názvem di( $\eta^5$ -cyklopentadienyl)železa (II) skládající se ze dvou cyklopentadienových aromatických kruhů, mezi nimiž je koordinováno dvojmocné železo pentahaptickou vazbou. Poprvé byl tento oranžový prášek připraven roku 1951 reakcí cyklopentadienyl magnesium bromidu s chloridem železitým. V této sloučenině je kovový atom přechodných kovů vázán  $\pi$ -vazbou na dvě kruhové struktury – cyklopentadienylové cykly. Umístění je v podstatě kolmo k rovině kruhu. Váže se k cyklům pomocí  $\pi$ -elektronů tak, že daruje své vnější elektrony (d-elektrony ferrocenu a jeho kongenery) k překrytí.<sup>53</sup> Jako důsledek spolupráce vazby zahrnující  $\pi$ -elektrony všech zúčastněných atomů uhlíku v těchto sloučeninách neexistují jednotlivé vazby kov-uhlík. Spojovací mechanismus je typu  $p_{\pi}$ - $d_{\pi}$  a najdeme jej v kongenerech, jako je ruthenocen di( $\eta^5$ -cyklopentadienyl)ruthenia a osmocen di( $\eta^5$ -cyklopentadienyl)osmia. Jako u ostatních členů této třídy v molekule ferrocenu jsou dva ligandy cyklopentadienylového kruhu v podstatě ve volné otáčivosti a všechny valenční elektrony jsou spárované, proto je sloučenina diamagnetická. Z celkového počtu 18 elektronů, které jsou k dispozici vazbě, se 12 z nich nachází v silně vazebných orbitalech, přičemž zbývajících 6 elektronů se nachází v nevazebných orbitalech. Tato konfigurace je zásadní, jelikož přítomnost nevazebných elektronů v těchto orbitalech s vysokou energií určuje redoxní chování sloučeniny a mnoho

dalších chemických vlastností. Z těchto orbitalů je možné snadno odstranit elektron za vzniku kationtu a vlastní-li právě nepárový elektron, tak kation představuje typický volný radikál.<sup>53</sup>

### 1.10.1.1 Interakce přenosu elektronu a jejich biologické využití

Právě předávání nepárového elektronu z vysoce energetického molekulárního orbitalu je podle vědců jedním z klíčů budoucnosti využití ferrocenu. Předáním elektronu dojde k transformaci neutrální, diamagnetické sloučeniny na pozitivně nabitý, paramagnetický železitý iontový radikál. Jde o reverzibilní reakci, tedy při jednom elektronovém redukčním kroku se iontový radikál vrací za různých podmínek zpět k nenabité mateřské sloučenině (Obr. 28). V biologickém prostředí je ferrocen oxidován například peroxidem vodíku v přítomnosti křemové peroxidázy. Kation může tvořit komplexy přenosu náboje reakcí s donorovými skupinami v proteinech, jako je tryptofan. Bylo prokázáno, že reverzní reakce probíhá, ve schématu (b), pomocí pH-řízeného účinku bleskově fotolyticky generovaného superoxidového aniontového radikálu, který se v reakci převede na kyslík. Další možností je oxidace metaloproteinů, jako je např. cisplatina (II), karboplatina (II) a jiné deriváty v dobře zavedeném klinickém použití.<sup>53</sup>



Obrázek 28: Převzato: biologické interakce přenosu elektronu u ferrocenu

Podívejme se nyní na tento podklad u některých procesů s volnými radikály, které se účastní patologie rakoviny. Přestože jsou biologické procesy, které kontrolují karcinogenitu

a progresi rakoviny, extrémně rozmanité a jen částečně pochopitelné, a to i v současné době, reaktivní druhy kyslíku a související radikální reakce významně přispívají k celkové souhře těchto procesů. Redukce kyslíku v aerobní buňce, která dýchá, produkuje reaktivní deriváty kyslíku včetně peroxidu vodíku, anionu superoxidových radikálů a vysoce destruktivního volného radikálu hydroxylů. Ve zdravém organismu budou tyto druhy kontrolovány detoxikačním účinkem řady buněčných ochranných enzymů, jako je superoxidodismutáza (SOD), kataláza, GSH peroxidáza nebo hem-oxidáza mobilizované hostitelskými obrannými mechanismy.<sup>53</sup> Pokud se udržují pod kontrolou, reaktivní druhy kyslíku, jako je peroxid vodíku, mohou ve skutečnosti plnit zásadní úlohu při udržování homeostázy, a tím i zdravé rovnováhy prostřednictvím indukce apoptózy škodlivých buněk. Na druhou stranu, pokud jsou ponechány nekontrolované, fungují proti hostiteli, ačkoliv je v dobrém stavu. Byla nalezena a pozorována silně snížená aktivita SOD v mnoha rakovinných buňkách. Generace superoxidů a sekundárních volných radikálů ve zvýšených koncentracích může vyvolat patologické reakce, protože se tyto druhy vážou na DNA buňky s následnými chybami při replikaci během mitotické etapy, a tak může dojít ke spuštění karcinogeneze.<sup>53</sup>

Různé klinicky užívané protinádorové léky mohou ve skutečnosti reagovat jako volné radikály nebo podstoupit *in vivo* metabolismu pomocí volných radikálů a jejich antineoplastická aktivita může zahrnovat mechanismus záchytů radikálů. Je zřejmé, že jakákoliv sloučenina existující jako radikál nebo schopná *in vivo* transformace do volného radikálu metabolitu by mohla v zásadě interferovat s radikálovou aktivitou v rakovinné buňce, a tím působit jako inhibitor buněčného růstu. Rozpoznání těchto poměrně složitých vzájemných vztahů mezi volnými radikály a jejich fyziologickými nebo patologickými reakčními partnery povzbudilo k rozsáhlému výzkumu solí železitých jako potenciálních karcinostatických činidel.<sup>53</sup>

Takové zjištění vedlo nejprve ke studiím již dříve popsanych solí, a to zejména cytostatického titanocenu dichloridu, u kterého byly nalezeny antiproliferační účinky, a to třeba u adenokarcinomu tlustého střeva, jehož růst byl inhibován o 50–70 %, anebo u karcinomu prsu M3, jehož růst byl inhibován o 60–80 %. Při těchto studiích bylo rovněž zjištěno tzv. dvoufázové chování, které vykazuje většina železnatých solí používajících se v biologických studiích. Zatímco nádor je inhibován při nízké počáteční koncentraci, tak při vyšších dávkách byl růst nádoru značně urychlen. Vědci došli k závěru, že sloučeniny inhibovaly růst nádoru, zatímco ještě stále existovaly v původním molekulárním stavu a mohly tak reagovat s aktivními místy jaderné DNA. Postupný katabolismus s tvorbou

oxidovaných druhů, a nakonec i iontové železo, by pak mohly aktivovat intracelulární redoxní procesy vedoucí k zrychlení růstu nádoru.<sup>53</sup>

### 1.10.2 Ferrocenyl deriváty při léčbě rakoviny

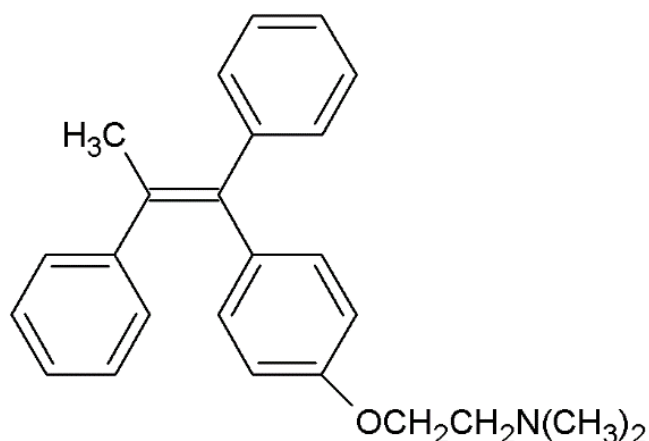
Rakovina je onemocnění charakterizované nekontrolovanou proliferací buněk a schopností těchto buněk napadat jiné tkáně. Rakovinu lze léčit několika způsoby včetně chemoterapie, která je jednou z hlavních zbraní v boji proti ní. Chemoterapie je léčba rakoviny pomocí léků (protinádorových léčiv), které ničí rakovinné buňky. Rakovinové postižení a kardiovaskulární onemocnění společně představují jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů na celém světě. Odhaduje se, že v USA jedna z každých pěti osob se podíří nějaké formě rakoviny. Podobný vzorec úmrtnosti na rakovinu je pozorován i v ostatních západních zemích. Ještě víc zlověstný trend je zaznamenán v mnoha různých částech světa. Například v jižní Africe je rakovina třetí nejčastější příčinou úmrtí mezi tmavě zbarveným obyvatelstvem a druhou nejčastější příčinou zbývajících populačních skupin.<sup>54</sup>

#### 1.10.2.1 Rakovina prsu

Rakovina prsu je nejčastější rakovinou u žen. Postihuje přibližně 1 z 8 žen na Západě. Obecně lze nádory prsu rozdělit na dvě skupiny, které se vyznačují přítomností [ER(+)] nebo absencí [ER(-)] estrogenního receptoru. Asi dvě třetiny všech případů patří do typu ER(+), který je citlivý na hormonální terapii pomocí selektivních modulátorů estrogenních receptorů. V ER(+) buněčných liniích existují dva receptorové podtypy, ER<sub>α</sub> a ER<sub>β</sub>. Primární léčivo používané k léčbě tohoto onemocnění je tamoxifen (Obr. 29) a hydroxytamoxifen.<sup>54</sup>

Tamoxifen působí *in vivo* jako obzvláště dobře tolerovaná cytostatická látka. Tamoxifen je významný v tom, že má antiestrogenní a antiproliferativní účinky, které vyplývají z kompetitivní vazby na ER<sub>α</sub>, čímž se potlačuje transkripce DNA zprostředkovaná estradiolem v nádorové tkáni. Tamoxifen má některé nežádoucí vedlejší účinky, neboť rezistence vůči léku se může vyvinout během dlouhodobé léčby, a zvyšuje riziko srážení krve v plicích a rovněž není účinný proti hormonálně nezávislým nádorům.<sup>54</sup>

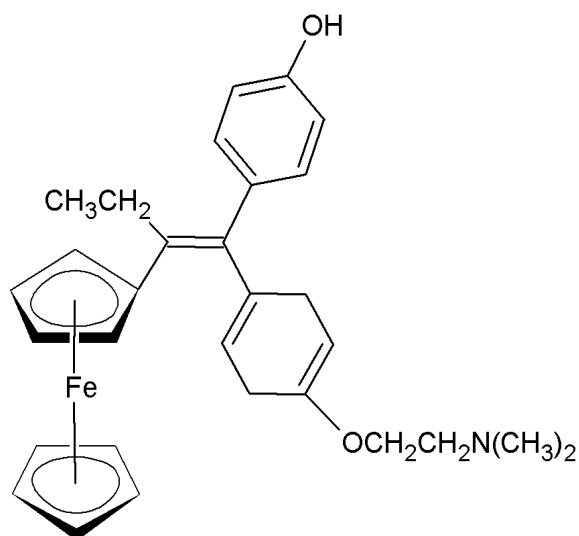




Obrázek 29: Molekula tamoxifenu

#### 1.10.2.1.1 Ferrocifen

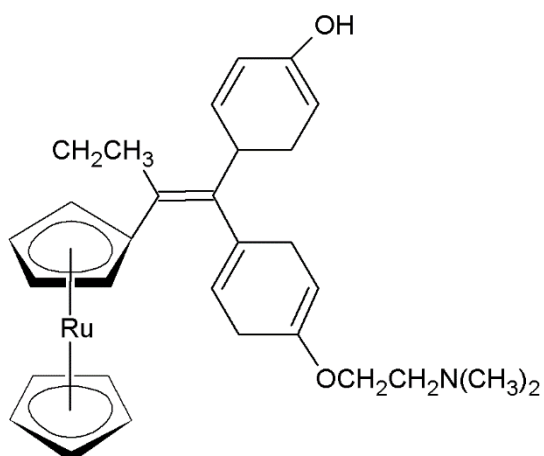
Dále za zmínku stojí, že vědci se snažili zesílit účinky již známého tamoxifenu, který působí jako modulátor anti-estrogenního selektivního estrogenního receptoru (látky působící proti účinkům ženských pohlavních hormonů, používají se při léčbách rakoviny prsu, poruchách menstruačního cyklu či neplodnosti u žen). Z těchto poznatků byl syntetizován ferrocenový derivát hydroxytamoxifenu tzv. ferrocifen (Obr. 30), u kterého bylo dokázáno, že sloučenina má rovněž dvojí úlohu, a to vyvíjet anti-estrogenní účinek a vykazovat cytotoxickou aktivitu.<sup>53</sup> Ta byla studována na proliferaci dvou linií buněk rakoviny prsu, jednu pro nádory zprostředkované ER<sub>α</sub> receptory a jedna pro nádory zprostředkované ER<sub>β</sub>. Antiproliferativní účinek ferrocifenu na buňky rakoviny prsu byl měřen za použití buněčné linie MCF7. Jde o standard pro studium nádorů ER<sub>α</sub> a buněčné linie MDA-MB231, což je standard pro linie rakoviny prsu ER<sub>α</sub> a ER<sub>β</sub>. U buněčné linie MCF7 vykazuje zkoumaný ferrocifen antiproliferační účinky. Výsledky ukázaly, že ferrocifen je účinný proti hormonálně závislým a hormonálně nezávislým buňkám rakoviny prsu, čímž se výrazně liší od tamoxifenu. Tato aktivita byla připisována imunostimulačnímu účinku metalocenu vyvoláním aktivace T-lymfocytů generací H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a následným buněčným redoxním stresem.<sup>54</sup>



Obrázek 30: Ferrocenový derivát hydroxytamoxifenu

#### 1.10.2.1.2 Ruthenocifen

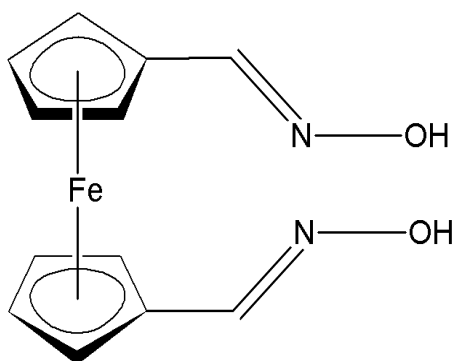
O ruthenocenu je známo, že rovněž vykazuje dobrou protinádorovou aktivitu. To může být způsobeno podobností mezi ferrocenem a ruthenocenem ve struktuře a také v redoxních vlastnostech. Díky zjištění významných antiproliferačních účinků ferrocifenu vědce napadlo připravit podobnou sloučeninu na základě struktury tamoxifenu a byl připraven Ru-analog ferrocifenu se vzorcem 1-{4-[O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]fenyl}-1-(4-hydroxyfenyl)-2-ruthenocenylybut-1-en (Obr. 31). Jeho účinnost byla rovněž testována na ER(+) a ER(-) buněčné linie rakoviny prsu.<sup>54</sup> Výsledky ukázaly, že deriváty ruthenocifenu působí jako anti-estrogeny k buněčné linii rakoviny prsu ER(+) MCF7, ale nemají žádný cytotoxický účinek na rakovinu prsu ER(-) MDA-MB231 buněčné linie. Tento výsledek je překvapivý tím, že není stejný s deriváty ferrocenu, které vykazují cytotoxický účinek v buněčné linii rakoviny prsu E (-). Rozdíl v aktivitě mezi ferrocenem a deriváty ruthenocenu může být způsoben různými redoxními vlastnostmi obou metalocenů. Elektrochemické studie rovněž ukazují, že po přenosu elektronů se rutheniový radikál rychle rozpadá, což není případ stabilního radikálu u ferrocenu.<sup>54</sup>



Obrázek 31: Ruthenocenový derivát hydroxytamoxifenu (Ruthenocifen)

### 1.10.2.2 Inhibice topoizomerázy

Dalším zjištěním u derivátů ferrocenu byl silný inhibující účinek topoizomerázy II, a to pomocí 1,10-dikarboxaldoximem ferrocenu, (Obr. 32), který se ukázal antiproliferativně aktivní proti několika lidským nádorovým buněčným liniím, zejména adenokarcinomu Colo 205 tlustého střeva.<sup>54</sup>



Obrázek 32: Molekula 1,10-dikarboxaldoxim ferrocenu

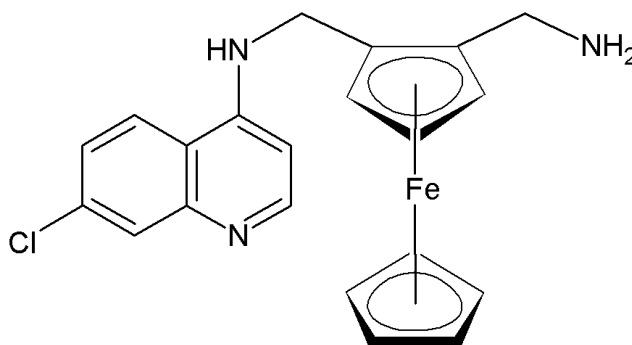
Topoizomeráza II je klíčovým enzymem v jaderné replikaci, transkripci a opravách DNA a její inhibice vede k chromozomálním aberacím a konečné smrti buněk. Inhibice nebo otravy lidských topoizomeráz se podílejí na mechanismu aktivity několika protinádorových léčiv a vzhledem k tomu, že nádory využívají zvýšení aktivity topoizomerázy, inhibice topoizomeráz se stává důležitým cílem při dosahování protinádorové aktivity.<sup>53</sup> Mechanismus zahrnuje tvorbu komplexu s enzymem a následnou interakci komplexu Topo

II s buněčnou DNA, což vede ke štěpení tohoto vytvořeného komplexu (DNA + Topo II + ferrocenylový derivát) a aktivita enzymu je zastavena. Právě některé léky, které působí jako inhibitory Topo II, zahrnuje rovněž řada dnešních klinicky podávaných látek, a proto vykazují vynikající potenciál jako protirakovinné léky.<sup>54</sup>

### 1.10.2.3 Léčba malárie

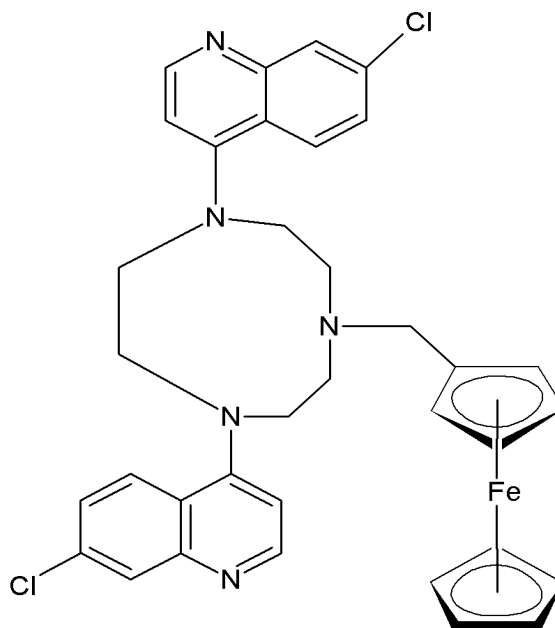
Malárie je jednou z nejproblematictějších parazitických infekcí na světě, kterým čelí velká část světa, zejména nejchudší země především v Africe. Malárie je nemocnění způsobené prvokem *Plasmodium* a prodělává část životního cyklu v samičce komára rodu *Anopheles*, která je přenáší na člověka kousnutím. Nalezení léku proti této infekční nemoci je prioritou číslo jedna Světové zdravotnické organizace (WHO). Existují čtyři druhy parazitů, které způsobují lidskou malárii, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* a *Plasmodium malariae*. Nejúčinnější léky proti malárii jsou Chlorochin (CQ), meflochin a chinin. Z druhu *Plasmodium* je nejvíc nebezpečný parazit *Plasmodium falciparum*, který vykazuje rezistenci k těmto lékům. Právě proto syntéza nových antimalarických léků na bázi ferrocenu přitahuje mnoho pozornosti.<sup>54</sup>

Ferrochin (FQ) (Obr. 33) je ferrocenylová sloučenina, která je prozatím v klinických studiích. Je určena k překonání chlorochinu a ve skutečnosti podle testů byl FQ účinnější než CQ při inhibici růstu *Plasmodium falciparum in vitro* a *Plasmodium berghei in vivo*, a rovněž vykazoval 22krát vyšší aktivitu než chlorochin *in vivo* u myší infikovaných *P. berghei* a *P. yoelii* (druhy parazitů u zvířat). Další výhodou je to, že nebyl zjištěn žádný důkaz toxicity ferrochinu. Syntéza ferrochinu je založena na začlenění ferrocenu do molekuly chlorochinu za vzniku FQ.<sup>54</sup>



Obrázek 33: Molekula ferrochinu

Další z třídy antimalarických léků je na bázi triazacyklononanu s obecným vzorcem 7-chlor-4-[4-(7-chlor-7-ferrocenylmethyl-1,4,7-triazacyklononan-1-yl)] chinolin (Obr. 34). V řadě pokusů byla tato sloučenina srovnávána s aktivitou proti chlorochinu resistantní (Dd2) *Plasmodium falciparum*. Prozatímní testy ukázaly silnou antimalarickou aktivitu *in vitro* vůči chlorochinu resistantnímu kmenu Dd2.<sup>54</sup>



Obrázek 34: Ferrocenylový derivát z triazacyklononananu

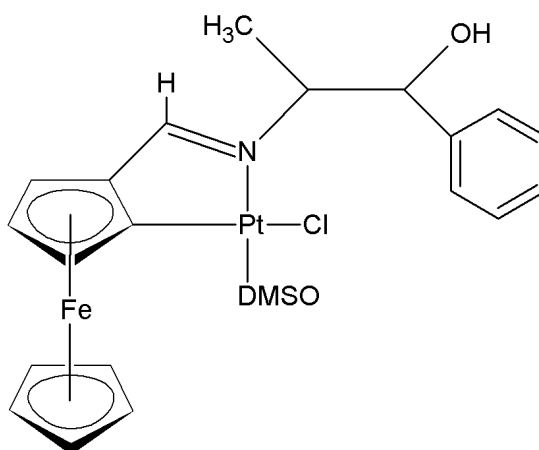
#### 1.10.2.4 Rakovina plic

Plicní onemocnění je dnes hlavní příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou na celém světě. Toto onemocnění se běžně rozděluje na dvě velké skupiny: malobuněčný karcinom plic (SCLC) a nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC). NSCLC představuje přibližně 85 % všech případů rakoviny plic a pouze 15 % nakažených se dožije více než 5 let. Jelikož je obvykle diagnostikována v pokročilém stádiu, dominantní klinickou strategií je léčba na základě chemoterapie, avšak v současnosti je výsledek stále zdaleka neuspokojivý. V kombinované terapii se ve většině léčebných případů NSCLC používají léky platiny, jako je cisplatina a karboplatina v kombinaci s různými protirakovinovými činidly včetně docetaxelu, bevacizumabu a gemcitabinu. Nicméně účinnost těchto kombinací léků není přijatelná kvůli jejich vedlejším účinkům a značné rezistenci na léky. Proto vědci vyvíjí

velké úsilí v konstrukci nových léků, které by mohly být součástí kombinovaných terapií léčby NSCLC.<sup>55</sup>

Cykloplatinované komplexy přitahovaly rostoucí zájem jako nové protinádorové látky. To je způsobeno jejich vyšší stabilitou ve fyziologickém prostředí a jejich nižší toxicitou vůči normálním buňkám než cisplatinou a deriváty. Jednou z možných strategií ke zlepšení těchto léčiv je začlenění ferrocenylových molekul do cykloplatinových komplexů nebo již používaných léčiv. Nicméně navzdory možným synergickým biologickým účinkům, které mohou vzniknout přítomností centra Pt (II) a ferrocenu, nejsou studie protinádorové aktivity těchto sloučenin příliš časté.

Avšak nedávno byl popsán komplex Pt (II) s obecným vzorcem  $(S_p,1S,2R)$ -[Pt $\{(\kappa^2$ -C,N)[ $(\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>)-CH=N-CH(Me)-CH(OH)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)}Cl(DMSO)] (Obr. 35) a významnou aktivitou proti nemalobuněčnému karcinomu plic A549.<sup>55</sup>



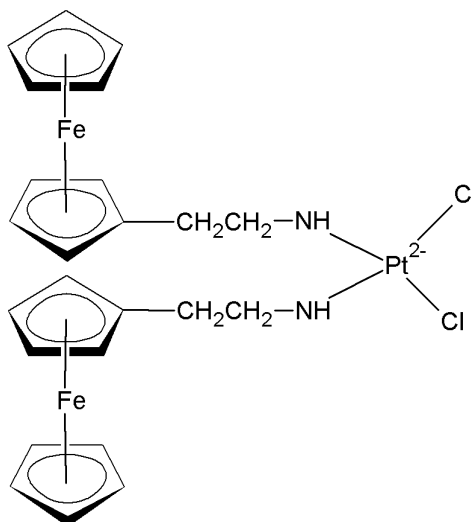
Obrázek 35: Molekula cykloplatinového komplexu

Mechanistické studie ukázaly, že sloučenina indukuje nukleární translokaci proteinu FOXO3 (protein, který pravděpodobně funguje jako spouštěč apoptózy prostřednictvím up regulace genů nezbytných pro buněčnou smrt, jako je Bim a PUMA nebo snížení regulace anti-apoptotických proteinů, jako je FLI) v buňkách U2OS a A549. Proto léčba buněk A549 sloučeninou aktivuje vnitřní kaspázovou dráhu a dramaticky zvyšuje procento apoptotických buněk. Navíc sloučenina vykazuje synergický antiproliferativní účinek, když je aplikována společně s cisplatinou. Mimo jiné je také aktivní v jiných rakovinných buněčných liniích, jako je třeba adenokarcinom prsu (HCT116) nebo adenokarcinom prsu (MDA-MB-231) a také velkých nádorových buněk plic NCI-H460.<sup>55</sup>

### 1.10.2.5 Komplexy na bázi guanidinu

Molekuly obsahující funkční skupinu na bázi guanidinu ukazují působivý příslib pro řadu zajímavých aplikací v mnoha oblastech chemie, jako je organokatalýza, koordinační chemie a rozpoznání anionů. To je částečně způsobeno jejich schopností se chovat jako neutrální, tak kationtová, popřípadě aniontová entita. Navíc guanidinová část je esenciální složkou pro řadu biologicky důležitých molekul a guanidiny se také nacházejí v přírodních produktech a ve farmaceutických přípravcích, jako je třeba biguanid a sulfaguanidin.<sup>62</sup> Následkem toho se objevuje rostoucí zájem zaměřený na objev nových sloučenin s guanidinovým jádrem vhodným pro vývoj aktivních léčiv, například jako potenciálních chemoterapeutických činidel. Mezi přímé metody syntézy guanidinů patří katalytická guanylace aminů pomocí karbodiimidu. Tato reakce má atomovou ekonomiku 100 % a je bezproblémovým procesem. Navíc bylo zkoumáno několik aminoferocenů jako redoxních mediátorů v elektrochemickém biosenzudu DNA a jako pomocné ligandy (s centry Pd a Pt) pro katalytické polymerace olefinů. Stejně tak pozitivně nabitě amino substituované ferrocenylov prokázaly, že jsou schopné dosáhnout vysoké vazebné afinity s buňkami a tvoří neobvykle stabilní inkluzní komplexy. Je zajímavé, že účinky léčiv na bázi aminoferocenu byly nedávno zkoumány na zdravých a rakovinových lidských buňkách.<sup>62</sup>

V důsledku nízké toxicity, významné stability a lipofilnosti, snadné funkcionalizace a jedinečného elektrochemického chování je použití ferrocenu rychle se rozvíjející oblastí výzkumu. Ferrocenylová část byla začleněna do struktury biologicky aktivních molekul, jako jsou protinádorová, antimaláriová a antibiotická léčiva, což vede ke zvýšení jejich aktivity. Množství neutrálních derivátů ferrocenu a některých kationtových ferrocenových solí vykazují dobré výsledky *in vitro* a inhibici růstu nádorů *in vivo*. Podobně bylo zjištěno, že cytotoxicita některých derivátů ferrocenylu je zvýšena začleněním dalšího cytotoxického přechodného kovu do stejné molekuly.<sup>62</sup> Vědci se drželi těchto poznatků a byl syntetizován komplex o obecném vzorci  $cis-[PtCl_2\{Fe(\eta^5-C_5H_5)-(CH_2)_2NH_2\}_2]$  (Obr 36), který obsahuje dva 2-(ferrocenyl)ethylaminové ligandy kovalentně vázané k cytotoxické Pt (II).



Obrázek 36: Molekula  $cis-[PtCl_2\{Fe(\eta^5-C_5H_5)-(CH_2)_2NH\}_2]$

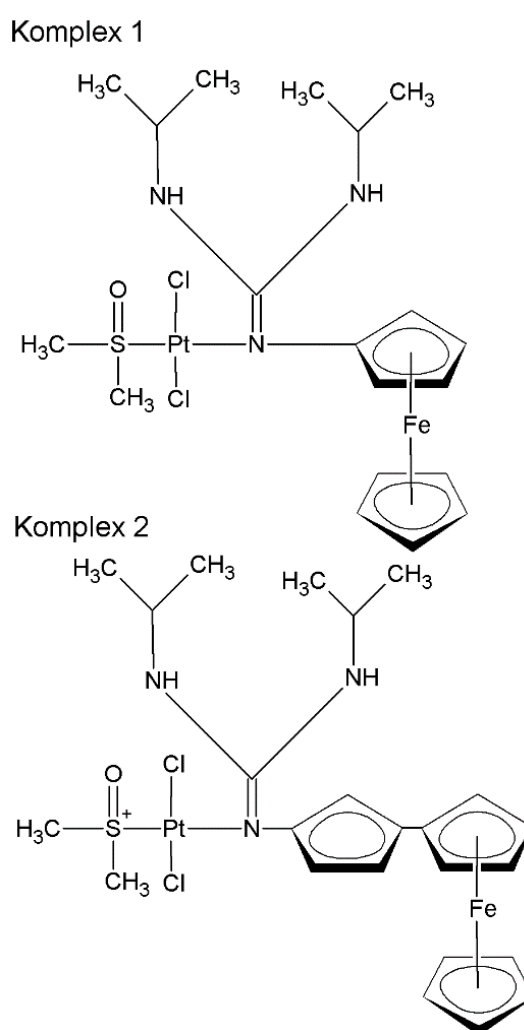
Zajímavé je, že trimetalická sloučenina je aktivní vůči všem testovaným buněčným liniím lidských nádorů (tabulka 3). Ještě důležitější je, že sloučenina vykazuje silnější aktivitu vůči buněčné linii rakoviny tlustého střeva oproti cisplatině.<sup>62</sup> Na základě slibných cytotoxických vlastností amino-ferrocen-Pt (II) sloučeniny a ve snaze rozšířit tuto část chemie se vědci zvláště zajímali o studium schopnosti guanidinů obsahujících ferrocen jako ligandů donorů dusíku k vazbě na centra platiny (II). Vědci syntetizovali strukturně nové heterometalické komplexy 1 a 2 (Obr 37), kde je elektroaktivní ferrocenyl-guanidinový ligand kovalentně vázán k cytotoxickému platnatému centru za cílem získání synergicky biologického účinku mezi guanidinovou skupinou a aktivním kovem.<sup>62</sup>

**Tabulka č. 3:** IC<sub>50</sub> (mM) hodnoty heterometalických sloučenin (ND = není určeno)

<i>Buněčná linie</i>	<i>cisplatina</i>	<i>komplex 1</i>	<i>komplex 2</i>	<i>Trimetalický komplex</i>
<i>HBL - 100</i>	1,9 ± 0,6	1,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,5
<i>Hela</i>	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2
<i>SW1573</i>	3,0 ± 0,4	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,7
<i>T-47D</i>	15 ± 2,3	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,3	ND
<i>WiDr</i>	26 ± 5,3	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,5



Komplexy byly aktivní oproti buněčným liniím lidských nádorů HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D a WiDr. Výsledky jsou uvedené rovněž v tabulce 3. Ve srovnání s cisplatinou vykazují komplexy 1 a 2 vynikající aktivitu vůči T-47D a WiDr buněčným liniím.<sup>62</sup> To je relevantní výsledek, s přihlédnutím k tomu, že komplexy 1 a 2 jsou ve skutečnosti *trans*-Pt (II) izomery, na rozdíl od cisplatiny, což je sloučenina *cis*-Pt (II). Kromě toho jsou hodnoty GI<sub>50</sub> komplexu 1 a 2 srovnatelné s hodnotami získanými pro trimetalický komplex, který vykazuje *cis* konfiguraci. Takže geometrická konfigurace heterometalických platinových komplexů se zdá být pro biologickou aktivitu nepodstatná.<sup>62</sup>



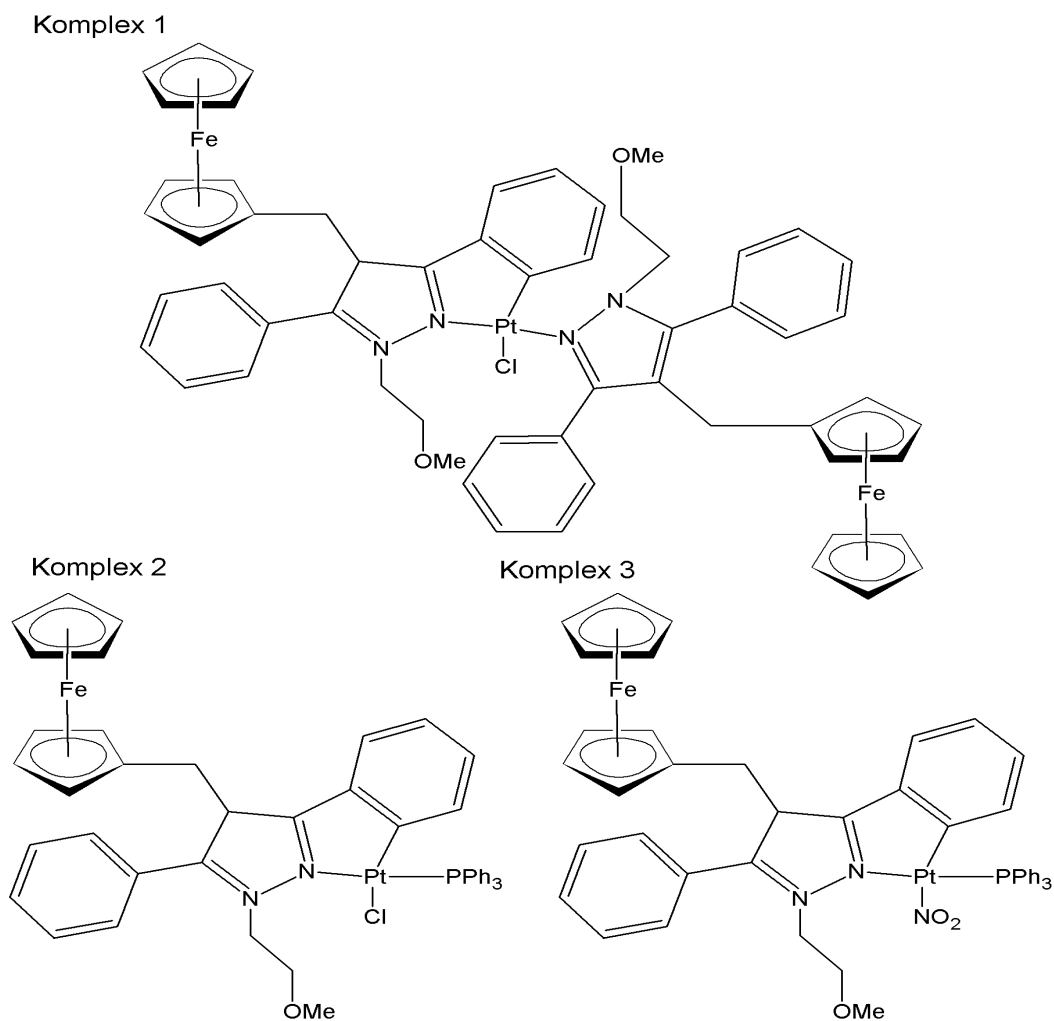
Obrázek 37: Molekuly komplexů 1 a 2

Heterometalické komplexy s N-substitovanými pyrazoly a cyklometalové komplexy platiny (II) odvozené od N-donorových ligandů vzbuzují vzrůstající zájem kvůli jejich

fotochemickým, fotofyzikálním nebo elektrochemickým vlastnostem, jejich reaktivitě a široké škále aplikací v různých polích. Je dobře známo, že tento druh sloučenin Pt (II) je cenným reakčním činidlem v organické a organokovové syntéze. Navíc cykloplatinované sloučeniny mají vynikající protinádorovou aktivitu a nižší cytotoxické účinky v normálních buňkách než cisplatina (CDDP), a dokonce projevující synergický účinek s CDDP.<sup>63</sup> Tato fakta podněcují zájem o design a vývoj dalších cykloplatinovaných sloučenin jako budoucích slibných alternativ k CDDP. Na druhé straně jsou pyrazoly pravděpodobně jednou z nejatraktivnějších skupin heterocyklických sloučenin vzhledem k jejich vlastnostem a použitelnosti v různých oblastech (v katalýze, jako agrochemikálie, jako přísady atd.).<sup>63</sup> Ze všech dosud popsaných příkladů jsou *N*-substituované pyrazoly obzvláště důležité vzhledem k jejich potenciálním protinádorovým a antivirálním nebo protizánětlivým účinkům. Již jsou známy komplexy platiny (II) s větší cytotoxickou účinností než jejich mateřský volný pyrazolový ligand, a dokonce silnější než cisplatina. Navzdory rostoucímu zájmu o vývoj nových sloučenin se dvěma nebo více "bioaktivními bloky" se zlepšenou biologickou aktivitou se vědci potýkají s problémem, že ferrocenylové jednotky jsou jako ramena vzácné a jejich cykloplatinované deriváty jsou ještě méně časté. Následkem toho je nedostatek informací o účinku vyvolaném přítomností tří "bioaktivních bloků" (*N*-substituovaný pyrazol, ferrocen a cykloplatinovaná jednotka) na jejich protinádorovou aktivitu.<sup>63</sup>

Avšak i přes tyto problémy byly navrženy tři nové cyklometalované Pt (II) sloučeniny (komplexy 1-3) (Obr. 38) odvozené od ferrocen-pyrazolového ligandu. Při měření biologické aktivity byly použity buňky rakoviny prsu (MCF-7 a MDA-MB-231) a buňky adenokarcinomu tlustého střeva (HCT-116). Výsledky (tabulka č. 4), které ukázaly, že i když je ligand u komplexu 1 silným cytotoxickým činidlem ( $IC_{50} < 6$  mM) a heterotrimetalová sloučenina 1 má právě dva tyto ligandy, platinacykl 1 nevykazuje žádnou významnou inhibiční růstovou aktivitu ve dvou buněčných liniích rakoviny prsu. Zajímavější a povzbudivější jsou výsledky získané pro dimetalické komplexy (2 a 3), které se liší pouze ligandem vázaným na platnaté centrum.<sup>63</sup> Oba komplexy vykazovaly cytotoxickou aktivitu, ale chloridový komplex 2 se ukázal být účinnější {3,1krát (v MCF-7) a 6,5krát (v MDA-MB-231)} než jeho  $NO_2$  analog, avšak inhibiční růstová aktivita byla mírně menší než aktivita cisplatiny. Také byl zkoumán účinek nových sloučenin na buněčné linie rakoviny tlustého střeva, rezistentní na cisplatinu HCT-116. Jak je znázorněno v tabulce 4, sloučenina 1 nevykázala žádnou významnou cytotoxickou aktivitu.<sup>63</sup> Hodnota  $IC_{50}$  pro sloučeninu

2 byla zřetelně menší než hodnoty získané pro komplex 3 a také pro cisplatinu za identických experimentálních podmínek. Srovnání výsledků získaných ve třech buněčných liniích ukazuje, že cytotoxický účinek nových cykloplatinovaných sloučenin se zvyšuje následovně: 1 «3 <2.



Obrázek 38: Molekuly komplexů 1-3

Tabulka č. 4: IC<sub>50</sub> (mM) hodnoty heterometalických sloučenin

<i>Buněčná linie</i>	<i>cisplatina</i>	<i>komplex 1</i>	<i>komplex 2</i>	<i>komplex 3</i>
<i>MCF-7</i>	19,4 ± 4,5	>100	23 ± 4	72 ± 6
<i>MDA-MB-231</i>	6,1 ± 4,4	>100	8,6 ± 6	56 ± 5
<i>HCT-116</i>	40 ± 4,4	>100	5,9 ± 5	38 ± 7

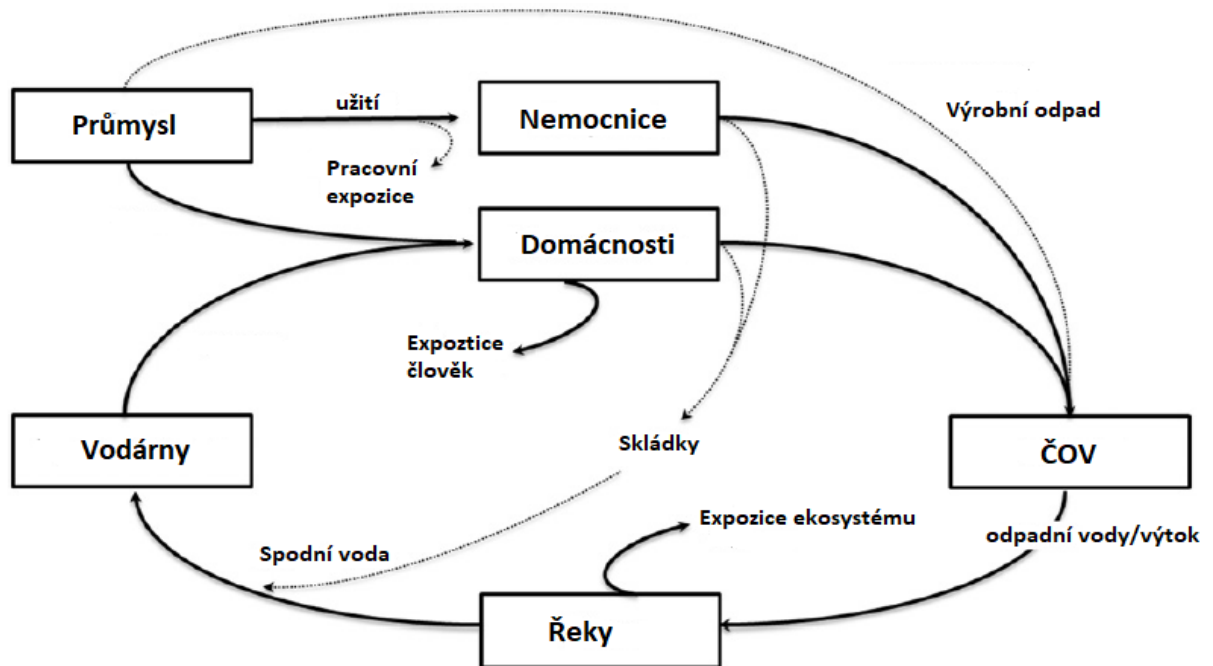
## 2 EKOTOXICITA

Ekotoxicita je jedna z hlavních skupin léčivých přípravků, která je v dnešní době přehlížena. Jde o pojem, který můžeme definovat jako toxické působení na životní prostředí. Toxickým odpadem lze nazývat vodný výluh, který vykazuje ve zkouškách akutní toxicity hodnoty  $LC_{50}$  ( $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ) menší než  $10 \text{ ml.l}^{-1}$  alespoň pro jeden z testovacích organismů (ryby, řasy nebo vyšší rostlin) při určené době působení testovaného odpadu. Avšak dostupné ekotoxikologické údaje pro protirakovinné léčivé přípravky a jejich metabolity jsou neúplné a pouze některé studie byly doprovázeny chemickou analýzou. Jedním z možných důvodů, proč se velice málo studií nezabývá tímto faktorem, může být jejich nízká koncentrace v životním prostředí, která se udává v hodnotě (g/l a nižší).<sup>63</sup>

Zbytky farmaceutických léků se nacházejí v životním prostředí od doby vzniku chemoterapie, avšak vědecké publikace týkající se nežádoucích účinků, se poprvé objevily na konci devadesátých let v Severní Americe a v Evropě. Vážnosti problematiky nepřidá ani fakt, že během posledního desetiletí se počet cytostatických léků používaných v chemoterapii rakoviny značně zvýšil. Jejich produkce se odhaduje na 5000 kg za rok. Jsou navrženy tak, aby poškozovaly DNA, inhibovaly syntézu DNA a přerušovaly buněčnou replikaci, proto existuje potenciální myšlenka, že cytostatika působí neselektivně na všechny rostoucí buňky a mají karcinogenní účinnost, což znamená, že nelze odhadnout žádné prahové hodnoty pro nejnižší koncentrace účinku. Předpokládá se, že kvůli způsobu jejich působení jsou prakticky všechny eukaryotické organismy citlivé na poškození. Příkladem může teratogenita, která je problematická již při nízkých koncentracích v období organogeneze embrya (17-90 den vývoje) způsobená převážně sedativem Thallidomidem v 50–60 letech 20. století.<sup>63</sup>

Další problém ční v reakčních mechanismech cytostatických sloučenin, a hlavně jejich nescifická povaha napadení v organizmech, která často vede k sekundárním vedlejším účinkům a zvýšeným zdravotním rizikům. Proto jsou zvláště zajímavé cytotoxické, fetotoxické, mutagenní a teratogenní vlastnosti. Tyto nebezpečné vedlejší účinky léčiv používaných v chemoterapii byly potvrzeny pokusy na zvířatech a jejich karcinogenní účinky na člověka jsou podezřelé. Vzhledem k tomu, že ve vzorcích krve a moči klinických a farmakologických pracovníků byly zjištěny stopy cytostatických látek, výrazně se zintenzivnily bezpečnostní standardy týkající se způsobu léčby těmito látkami, a tedy i nárůst zájmu ohledně ekotoxicity rakovinných léčiv.<sup>63</sup>

Dalším kritériem je exkrece pacientů, kteří jsou primárním zdrojem kontaminace. Toto kritérium nebylo dříve bráno v potaz. Většina cytostatických léků se podává intravenózně na klinice nebo v nemocnici. Jiné způsoby podání zahrnují intramuskulární, intraosyální, intralezionální, topickou nebo orální aplikaci. Celkový cyklus cytostatik nám popisuje obr 39.



Obrázek 39: Převzato: Schéma cirkulace vody v životním prostředí

Trendy v cytostatickém podávání se posunují ke zvyšujícímu se orálnímu podávání prováděnému v domácích nebo externích ambulantních infuzních pumpách (např. po dobu 7 dní), které jsou však zavedeny ve zdravotnickém zařízení. Přibližně 75 % onkologických pacientů jsou ambulantní pacienti, kterým se podává léčba na onkologických odděleních, a poté opět odcházejí domů po podání infuze nebo injekce. Tito pacienti mohou vyloučit část cytostatik v nemocnici, protože léčba trvá několik hodin a farmakokinetika některých cytostatik je relativně rychlá.<sup>64</sup> Nemocnice tedy mohou působit jako bodové zdroje cytostatického vstupu do životního prostředí. Z toho vyplývá, že se cytostatické sloučeniny mohou objevit v nemocničních čistírnách odpadních vod nebo v případě ambulantní léčby ve veřejných kanalizacích kvůli nesprávné likvidaci odpadu či nehodám. Vedle mateřských cytostatických sloučenin je třeba uvažovat také o metabolitech, které jsou cytostatickými sloučeninami, v klinických odpadních vodách. Tyto látky proto mohou přispět k biotoxickému a mutagennímu potenciálu znečištění nejen nemocničních odpadních vod,

ale i dalších. Přestože se velké množství toxických látek rozkládá na oxid uhličitý, nerozložitelné látky přecházejí v průběhu čištění vody nezměněny ve vodním systému nebo v kalu. Takové látky se pak mohou dostat do pitné vody nebo potravinového řetězce.<sup>64</sup>

Naměřené koncentrace v odpadních vodách se liší podle počtu ošetřených pacientů a spotřeby vody v nemocnici. Hrubý odhad počítaný z roční spotřeby léčiv a vody předpokládají koncentraci 1 až 10 µg/l u nemocných léčených chemoterapií ve středně velké až velké nemocnici. To však nezahrnuje lidské metabolity nebo produkty transformace životního prostředí, které pravděpodobně přispívají k celkové toxicitě odpadních vod. Cílem vědců je přezkoumat současný stav cytostatik v životním prostředí, včetně jejich přítomnosti, osudu, chování, a to vše pomocí analytických metod.<sup>64</sup>

## 2.1 Chování cytostatik v životním prostředí

Předpovědi environmentálního chování a koncentrace různých léčiv hraje důležitou roli při hodnocení rizik. Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) z roku 2006 navrhla modelovací postup k odhadu hodnot PEC (předpovídané environmentální koncentrace) pro léčivé přípravky v povrchových vodách. Kritické parametry pravidelně zapojené do těchto předpovědních modelů jsou například faktor zředění, roční spotřeba, rychlost metabolismu a vylučování, populační model pacientů aj.<sup>65</sup> Dále k pečlivým výsledkům napomáhají fyzikálně-chemické vlastnosti látek, které hrají rozhodující roli při určování jejich environmentálního chování a osudů. Po vylučování z lidského těla podléhají sloučeniny a lidské metabolity sérii fyzikální, chemické a biologické transformace v prostředí. Různé biotické či abiotické procesy obvykle způsobují nové chemické entity (nazývané také produkty transformace) s novými vlastnostmi.<sup>65</sup>

S přihlédnutím k jejich extrémně nízkému tlaku par, se většina cytostatických sloučenin bude rozdělovat v kapalných a pevných fázích, jako je aktivovaný kal, biofilm, suspendované pevné látky, půda, či sediment. Dalším příkladem může být nízký koeficient rozdělení oktanol-voda, který naznačuje, že 5-fluorouracil (5-FU) vykazuje nízkou adsorpci na suspendované pevné látky ve vodě, ale vysokou mobilitu v půdě, či sedimentu. Je tedy nepravděpodobné, že 5-FU bude citlivý na přímou fotolýzu přirozeným slunečním světlem nebo akumulovaný ve vodních organizmech. Proto se zdá, že 5-FU je v přírodních vodách spíše perzistentní (látko, která dlouhodobě setrvává v prostředí). Naopak, kyselé

oxazafosforiny jako cyklofosfamid a ifosfamid se snadno oddělují do iontových forem za normálních podmínek prostředí pH ~ 7.<sup>65</sup>

### 2.1.1 Ekotoxicita vybraných cytostatik

Při obecnějším pohledu na cytostatika nám velice pomůžou parametry určující osud a distribuci jednotlivých cytostatik do různých složek životního prostředí, které lze do určité míry předpovědět z jejich chemických struktur a fyzikálně-chemických vlastností, jako je disociační konstanta (pKa), faktor biokoncentrace (BCF), oktanol-voda rozdělovací koeficient (Kow), koeficient rozdělení organického uhlíku (Koc), rychlost atmosférického OH, rozpustnost, koeficient Henryho (KH) a tlak páry.<sup>63</sup>

Rovnovážná konstanta pKa popisuje stupeň disociace sloučeniny při určitém pH. Vzhledem k průměrnému pH prostředí 7, pak podle hodnot pKa uvedených v tabulce 5 jsou pravděpodobně disociovány pouze chlorambucil a MET. Disociace zvýší jejich vodní pohyblivost, a nakonec ovlivní jejich osud v životním prostředí. Avšak nejkličovějším faktorem, který řídí cyklování léčiv ve vodním prostředí je sorpce. Mechanismus a velikost sorpce jsou definovány chemickou strukturou sloučeniny. Pro stanovení sorpce a afinity dané látky na organickou hmotu se běžně používají dva typy koeficientů, Kow a Koc, odvozené od koeficientu distribuce n-oktanol / voda (Dow) a koeficientu distribuce tuhých vod (Kd). Dow naznačuje tendenci organické chemikálie rozdělovat mezi tuky, absorbovat částice (např. půdy, sedimenty, kal a biomasa) a distribuovat mezi složkami životního prostředí.<sup>63</sup>

**Tabulka č. 5:** Parametry vybraných cytostatických sloučenin

<i>Cytostatika</i>	<i>Biodegradace</i>	<i>pak</i>	<i>log KoW</i>	<i>Rozpustnost (mg/l)</i>
<i>Gemcitabin</i>	ano	3,6	-1,22	5,4x10 <sup>-4</sup>
<i>Cisplatina</i>	ne	-	-2,19	-
<i>Chlorambucil</i>	ano	5,75	-1,7	1,24 x10 <sup>-4</sup>
<i>MET</i>	ano	4,70	-1,85	0,26 x10 <sup>-4</sup>
<i>Vinblastin</i>	ne	5,0	3,70	0,0446

<i>Etoposid</i>	ne	9,8	0,60	58,7
<i>Karboplatina</i>	ne	6,6	-0,46	14

Srovnáme-li dvě cytostatika s rozdílnou pKa, např. MET (pKa 4,70), který má potenciál pro disociaci v karboxylových a aminoskupinách a etoposid (pKa 9.8), který není disociován při hodnotách pH prostředí. Z hodnot pKa a log Kow (tabulka 5) lze vypočítat, že velký rozdíl mezi vypočtenými hodnotami Dow a Kow pro MET, který je o řád vyšší než u etoposidu, potvrzuje, že MET se lépe disociuje při pH 7.<sup>64</sup>

Obecně platí, že hodnoty log Dow <1 naznačují nepravděpodobnost, že se chemická látka koncentruje nebo sorbuje na organické látky. Hodnota log Dow označuje, že se sloučenina může významně bioakumulovat nebo sorbovat. Vzhledem k tomu, že log Dow je přibližně stejný jako log Kow pro nedisociované sloučeniny, lze usoudit, že většina cytostatik je vysoce polární s hodnotami log Kow <1, což naznačuje, že se budou distribuovat do vodní fáze.<sup>64</sup>

Navzdory tomu může být sorpce polárních znečišťujících látek na pevné látky hydrofobní interakcí zanedbatelná, jelikož iontové interakce mohou být důležité, zejména pro organické kationty (např. Aromatické aminy (MET, melfalan a chlorambucil)). Očekává se tedy, že se silně vážou na humus nebo organickou látku v půdě kvůli vysoké reaktivitě aromatické aminoskupiny, což naznačuje, že pohyblivost může být u některých půd mnohem nižší, než naznačují fyzikálně-chemické parametry.<sup>64</sup>

### 2.1.1.1 *Cisplatina a její deriváty*

Je-li řeč se o cytostatikách, jako je cisplatina a jejích derivátech, tak většina cytostatik má nízkou biologickou rozložitelnost. Důkazem mohou být degradační experimenty Zahn-Wellens a studie, které zkoumají stav cytostatik v odpadních vodách, kde podle výsledků byly během průchodu čistou vodou znehodnoceny jen velmi málo.<sup>63</sup>

Avšak při uvolňování cytostatik do vodních toků komunálních a nemocničních odpadů mohou tyto farmaceutické sloučeniny způsobit jejich působení pro necílové vodní organismy. Byla provedena studie, která zjišťovala ekotoxikologický potenciál alkylačního činidla cisplatinu (CisPt) na *Nereis diversicolor* (nereidka různobarevná) v rozsahu různých koncentrací.<sup>67</sup> Byly vybrány koncové body pro vyhodnocení subletální odpovědi chroustavců po 14 dnech expozice ve vodním sedimentu a těmi jsou kinetické poškození,



účinky iontové pumpy (SR  $\text{Ca}^{2+}$  - TPáza), neurotoxicita, oxidační stres (aktivity SOD, CAT a GPXs), metallothioneinové proteiny (MTLP), biotransformace (GST), oxidační poškození (LPO) a genotoxicita (poškození DNA). Významné zhoršování se vyskytlo u červů vystavených nejvyšší koncentraci CisPt (100 ng/l) spolu s neurotoxickými účinky. Aktivita antioxidantních enzymů (SOD, CAT) a biotransformační enzym druhé fáze (GST) byly inhibovány, ale tyto účinky byly kompenzovány indukcí MTLP. Dále se zvýšila hladina LPO. Výsledky ukázaly, že způsob působení cisplatin může představovat riziko pro tento vodní druh dokonce i v rozmezí ng/l.<sup>67</sup>

### 2.1.2 Ekotoxikologické testy

Ekotoxicita se dá zjišťovat tzv. ekotoxikologickými testy, kdy se testovaná látka vystaví různým životním organismům. Ty můžeme rozdělit na testy akutní a chronické, které se liší délkou expozice a také velikostí koncentrace při expozici. Doplnující testy jsou také imobilizační testy, kdy se nesleduje mortalita ale imobilita (stav strnulosti) na drobných korýších. Reakce organismu na polutant i v malé koncentraci (smrt, inhibice fyziologických pochodů, pohybu, růstu atd.) je porovnávána s kontrolou, která testovanou látku neobsahuje. V poslední době se zjišťuje, že testy ekotoxicity, které se zakládají na testování vodných výluhů, nejsou dostačující z důvodu nízké vypovídací hodnoty o daném vzorku. Proto vědci přišli s metodou  $\gamma$ -H2AX, která umožňuje nepřímé měření poškození DNA. Zdá se, že tato metoda by mohla být použita při biomonitoringu a hodnocení rizik vodních systémů postižených odpadními vodami z výroby, použití a likvidace cytostatických léčiv.<sup>65</sup>

Brzy po výskytu dvouvláknového zlomu DNA (DSB) je třeba očekávat tvorbu variant  $\gamma$ -H2AX histonu. Tato metoda je zaměřena na použití testu  $\gamma$ -H2AX na stanovení genotoxicity kontaminantů životního prostředí včetně cytostatických léčiv, protože standardní metody nejsou dostatečně citlivé k detekci poškozujícího účinku nízkých koncentrací takových léčiv v prostředí. Tyto sloučeniny jsou neustále uvolňovány do životního prostředí, což potenciálně představuje ohrožení kvality vody, vodních organismů, a nakonec i lidského zdraví.<sup>66</sup>

### 2.1.2.1 Test $\gamma$ -H2AX

Dvouvláknové zlomy DNA (DSBs) jsou jednou z nejdůležitějších událostí ovlivňujících DNA, když je buňka nebo organismus vystaven ionizujícímu záření, chemickému nebo environmentálnímu stresu. Pokud nejsou DSB dostatečně opraveny, mohou mít DSB vážné důsledky na buňky, které vedou ke smrti buněk nebo indukci genomické nestability, což může následně vyvolat karcinogenezi. Brzy po vytvoření DSB komplexní mechanismus buňky iniciuje odpověď poškození DNA, která je často charakterizována změnami signalizace, transkripce a buněčného cyklu, což vede k opravě DNA. Proteiny zapojené do opravy DNA mohou být zhruba rozděleny do tří hlavních skupin: (a) proteiny, které detekují DSB a spouštějí signalizaci kvůli poškození DNA, (b) proteiny, které amplifikují signál poškození DNA, (c) bílkoviny podílející se na procesech opravy DNA.<sup>66</sup>

Varianta H2AX histonu představuje 2 až 20 procent rodiny H2A histonů a hraje roli při získávání bílkovin, remodelování chromatinu a amplifikaci signálu a transdukci, je-li genom buněk narušován DSBs. Chemoterapie spolu s radioterapií a chirurgií je jednou z nejběžnějších možností léčby rakoviny. Obvykle jsou v *in vivo* studiích populace sledovány negativní účinky činidel léčených rakovinou *in vitro* a v pozdějších stádiích vývoje léčiv, aby se vyhodnotila účinnost léčiv a jejich negativní účinky na zdravé buňky a tkáň.<sup>66</sup> Avšak stále chybí studie zabývající se toxicitou odpadních vod obsahujících léčivé přípravky. Za účelem vyhodnocení účinnosti stanovení  $\gamma$ -H2AX z hlediska farmaceutické expozice cytostatik (antimetabolity, inhibitory topoizomerázy, inhibitory mikrotubulů a inhibitory tyrosinkinázy aj.) byla cytostatika přezkoumána na základě jejich způsobů působení podle jejich výskytu v odpadních vodách v nemocnicích, v odpadních vodách či ve sladkých vodách.<sup>66</sup>

Ačkoliv tato metoda stále převážně měří radiačně indukované DSB, existuje obrovský potenciál pro použití této metody v environmentální genotoxikologii, kde by mohla být použita k detekci negativních dopadů xenobiotik. V souladu s tím bylo cílem této studie zvýraznit schopnost histonu  $\gamma$ -H2AX a reprezentovat citlivý biomarker účinku během expozice určitým sloučeninám.<sup>66</sup>

Zvláštní pozornost byla věnována také cytostatickým léčivům, neboť tyto léky jsou obvykle vysoce toxické a neustále se uvolňují do vodních ekosystémů ze zdravotnických zařízení, domovů pacientů, odpadních vod z čistíren odpadních vod, úniků skládek a farmaceutických průmyslových závodů. Jejich přítomnost proto může být zjištěna v odpadních, povrchových a podzemních vodách. Kromě jejich neustálého uvolňování do životního prostředí se jejich

stabilita ve vodních prostředcích považuje za "pseudo perzistentní znečišťující látky", které by mohly ovlivnit jak kvalitu vody, tak i necílové organismy ze všech trofických úrovní včetně lidí. Toto přezkoumání zdůrazňuje schopnost stanovení  $\gamma$ -H2AX, aby sloužila jako citlivější metoda než standardní biologické testy genotoxicity při detekci změn genomu při nízkých koncentracích expozice.<sup>66</sup>

### 2.1.3 Toxikologie cytostatických kovů

Srovnáním toxikologických údajů ukazuje, že sloučeniny palladia, platiny a zlata, často považované za těžké a toxické, ve skutečnosti nemusí být tak nebezpečné, zatímco komplexy mědi, které jsou obvykle považovány za zelené a udržitelné alternativy, mohou mít významnou toxicitu, která je také velmi ovlivněna rozpustností ve vodě a biologických tekutinách. Studie o toxicitě, biologické dostupnosti a koncentracích v biologicky relevantních médiích však ukazují, že expozice těmito kovy může skutečně představovat zdravotní riziko, zejména na chronické subklinické úrovni.<sup>68</sup>

#### 2.1.3.1 Měď

Měď je jednou ze základních mikroelementů pro prokaryoty i eukaryoty a je potřebná pro vývoj mozku. Její přebytek či nedostatek může vést k těžkým poruchám. Četné enzymy obsahující měď hrají roli v redoxních katalýzách. Měď vstupuje do lidského organismu přes trávicí systém (s jídlem a pitnou vodou), nicméně může při vdechování a dermální absorpci představovat důležité typy expozic. Absorpce a vylučování mědi závisí na faktorech, jakými jsou chemická forma a dostupnost jiných dietních prvků. Přibližně 40 % požití mědi je absorbováno v tenkém střevě. Lidský organismus asimiluje měď ve formě  $\text{Cu}^+$  a skupina metaloreduktáz exprimovaných v dvanáctníku redukuje ionty  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Speciální transportní proteiny pak pomáhají transportu  $\text{Cu}^+$  apikální membránou střevních buněk. Uvnitř buňky se měď váže na chaperonové proteiny (pomáhají ukládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání) a je dodávána do trans-Golgiho sítě. Měď může být uložena v játrech, což je hlavním cílem její chronické toxicity, která se projevuje jako cirhóza jater. V případě tyrolské infantilní cirhózy a indické dětské cirhózy, způsobené silnou kontaminací mědi v mléce krav, měď napomáhá rozvoji hepatické toxikózy. Měď se mimo jiné hromadí v ledvinách, slezině a mozku.<sup>68</sup>

Jedním ze zvláštních případů chronické expozice mědi je Wilsonova choroba. Autosomálně recesivní metabolická porucha, která je doprovázena zvýšenými hladinami mědi v játrech a mozku. U pacientů se projevuje poruchou vylučování mědi pomocí žluče a vede k hromadění přebytečné mědi v játrech, kde způsobuje oxidační poškození a následně proniká do krve. Přebytek mědi ovlivňuje lipidový profil, inhibuje proteinové sulfhydrylové skupiny a způsobuje oxidační stres vedoucí k selhání ledvin. Alergické reakce na měď jsou vzácné, avšak byl popsán případ elementární inhalace mědi, který vedl k rozvoji syndromu akutní respirační tísně. Bylo prokázáno, že nanočástice mědi vyvolávají zánět plic u krys a indukují poranění v myších játrech, slezině a ledvinách. Bylo zjištěno, že  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  koordinují b-amyloidní peptidy a podílí se na rozvoji Alzheimerovy choroby. Měď zvyšuje produkci b-amyloidu v mozku, což vedlo k oxidačnímu stresu, apoptóze neuronů a poškození paměti. Měď je rovněž nezbytná pro angiogenezi, která je důležitým faktorem vývoje nádoru. Vzhledem k vysokému oxidačnímu potenciálu může mít měď karcinogenní aktivitu a několik typů nádorů vykazuje zvýšené hladiny mědi. Podporuje také tvorbu cév, a tím prokrvení nádorů.<sup>68</sup>

### 2.1.3.2 Železo

Železo je rovněž nezbytným mikroelementem, a hlavně vstupuje do lidského organismu s jídlem, buď ve formě non-hem nebo ve formě hemu. Non-hemové železo (III) pochází z rostlinných tkání, zatímco hemové železo (II) pochází ze zvířecích tkání. Aby byl  $\text{Fe}^{3+}$  absorbován dvanácterníkem, musí být redukován na  $\text{Fe}^{2+}$ . Druhy železa se mohou podílet na redoxních reakcích, které generují škodlivé ROS (proto-onkogenní kináza) a ochrana před těmito nebezpečnými procesy je zajištěna proteinovými ligandy, jako je transferin, laktoferin a feritin, které udržují množství železa v organismu v rozpustné formě. U lidí je 68% železa vázáno na hemoglobin, 27% na tkáňový feritin a 5% na myoglobin, zatímco 0,8% je spojeno s transferinem v séru. Hlavním místem skladování železa jsou játra, kde je vázán přebytek železa feritinem.<sup>68</sup>

Železo je vylučováno intestinálním epitelem, močovinou, žlučí nebo kůží. Neexistuje žádný speciální fyziologický mechanismus pro eliminaci přebytečného železa v lidském organismu a může být vysoce toxické. Dlouhodobý příjem doplňků obsahující železo může vést k chronickému poškození železem. Pokud je vazebná kapacita transferinu pro železo zahlcena, akumulace volného železa v tkáních má za následek poškození jater, slinivky, srdce a dalších orgánů. Patologie přebytku železa je však významně méně studována než patologie nedostatku železa a často se přehlíží jeho toxicita.<sup>68</sup>

Mnohonásobné krevní transfuze tak mohou představovat významné riziko pro pacienty. Mezi příznaky intoxikace železem patří srdeční selhání, cirhóza, anémie a artritida. Železo je ve vzduchu přítomno jako znečišťující látka. Aglomeráty částic ze svařovacích výparů mohou být uloženy v plicích a železo, chrom a nikl patří mezi nejběžnější kovy v těchto částicích. Chronické působení kovových výparů může vést k významnému poranění plic (horečka svářečů). Biologicky dostupné železo bylo navrženo jako aktivní složka v uhelném prachu, která indukovala oxidační stres v lidských plicních epitelálních buňkách. Akumulace přebytečného železa v játrech vede k prasknutí mitochondrií. Možné důsledky intoxikací železem jsou také hepatocelulární nekróza a karcinom, které mohou být výsledkem volných radikálových peroxidačních reakcí. Kardiomyocyty jsou velmi citlivé na volné železo a jeho přebytek může mít za následek kongestivní kardiomyopatii a narušenou ventrikulární funkci. Přebytek železa také narušuje endokrinní orgány, jako je slinivka, štítná žláza, varlata a vaječníky. Mezi další příznaky přetížení železem patří artropatie, osteoporóza, svalové křeče a myalgie. Nadbytek železa vyvolává v mozku eurodegenerativní poruchy prostřednictvím nekrózy, apoptózy a autofagie.<sup>68</sup>

### 2.1.3.3 Zlato

Vzhledem k tomu, že neexistuje jednoznačně stanovená fyziologická úloha zlata, platiny a palladia, kromě mechanismů účinku cisplatiny a jiných léčiv na bázi platiny, údaje a transformace těchto kovů v organismu vyšších zvířat jsou spíše vzácné. Zlato se snadno vstřebává zažívacím traktem nebo kůží pouze tehdy, když je komplex s ligandy rozpustný v lipidech. Zdá se, že inhalace zlata nenarušuje dýchací cesty. Většina případů intoxikace zlatem je výsledkem předávkování lékařem, protože tento prvek obsahuje lék v medicíně  $K[Au(CN)_2]$ , který původně používal Robert Koch pro léčbu tuberkulózy. Zlato je součástí moderních léčiv, která mají protizánětlivou aktivitu a jsou používána pro léčbu revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy, bronchiálního astmatu a dalších poruch, jakož i různých druhů rakovin. Zlato se může hromadit v játrech, kostní dřeni, kostech, kůži a svalech a jeho předávkování způsobuje poškození plic a ledvin. Pětiletá léčba revmatoidní artritidy thioglukosidem zlata vedla ke kumulaci hustých zlatých mikronů v lysozomech, vbuňkách kostní dřene, alveolárních makrofágech a Kupfferových buňkách.<sup>68</sup>

Nejčastější reakcí na chryzoterapii (léčba solemi zlata) je dermatitida. Ukázalo se tedy, že soli zlata (I) používané pro léčbu revmatoidní artritidy způsobují imuno senzibilizaci a byly

hlášeny případy alergie na kontakt s klenoty a zubními přípravky. Zlaté nanočástice prokázaly subchronickou toxicitu a nepříznivé účinky v ledvinové tkáni u myší, jakož i subchronickou inhalační toxicitu u potkanů. Chronické podávání nanočástic zlata 10 a 30 nm vedlo k poškození DNA v mozkové kůře u potkanů. Přesné mechanismy působení zlata zůstávají neprozkoumané, nicméně bylo stanoveno několik hypotéz. Například v lysozomech makrofágů se oxiduje  $\text{Au}^+$  na  $\text{Au}^{3+}$ , což zase může aktivovat proliferaci lymfocytů. Redoxní systém  $\text{Au}^+/\text{Au}^{3+}$ , který odstraňuje ROS, může existovat ve fagocytech. Je zajímavé, že sloučeniny zlata (III) vykazovaly vyšší aktivitu proti buňkám rezistentním na cisplatinu než odpovídající analogy buď s palladiem (II) nebo platinou (II), zatímco některé sloučeniny obsahující zlato mohly modulovat expresi prozánětlivých cytokinů.<sup>68</sup>

#### 2.1.3.4 Platina a Palladium

Použití palladia a platiny v automobilových katalytických konvertorech vede k jejich šíření v životním prostředí a přivádí tyto vzácné prvky do kontaktu s lidským organismem. Zatímco kovová forma palladia a platiny je považována za biologicky inertní, některé soli těchto prvků jsou silnými alergeny a senzibilizátory. Ačkoliv se tyto prvky nejprve uvolňují jako kovové a oxidové částice, mohou se následně transformovat v prostředí, zažívacím traktu nebo buněčných kompartmentací a vytvářet škodlivější rozpustné látky. Zpočátku byla toxicita polétavých částic považována za primárně spojenou s velikostí částic, nicméně nahromaděné důkazy naznačují, že složení je jedním z hlavních faktorů určujících jeho zdravotní rizika. Potraviny a voda jsou považovány za důležité cesty expozice kovů skupiny platiny. Předpokládá se však, že inhalační cesta představuje větší riziko nepříznivých účinků na zdraví organismu. Kovy byly navrženy tak, aby vytvářely toxické a alergenní chloridové komplexy v dýchacích cestách. Po požití byla nalezena platina a palladium v plicích, ledvinách a kostech, po inhalaci byly akumulovány v játrech a ledvinách. Po intravenózní injekci se platina a palladium také hromadily ve slezině, plicích a kostech. Hlavní způsoby eliminace těchto kovů z organismu jsou pomocí moči a výkalů. Palladium se vyznačuje nejvyšší biologickou dostupností mezi kovy ze skupiny platinových kovů. Bylo prokázáno, že retence palladia v těle závisí na způsobu podávání. U potkanů mělo perorální podání  $\text{PdCl}_2$  za následek téměř kompletní třídní eliminaci, zatímco intratracheální nebo intravenózní podání vedlo k prodloužené retenci palladia v těle. Nicméně akutní toxicita sloučenin palladia, může způsobit poškození ledvin a plic.<sup>68</sup>

Je prokázáno, že u myši  $\text{Pd}^{2+}$  nahrazuje  $\text{Fe}^{2+}$  v aktivním centru enzymu prolylhydroxylázy.  $\text{Pd}^{2+}$  také inhibuje jiné enzymy, jakými je aldolasa, karboanhydráza, sukcinová dehydrogenáza, alkalická fosfatáza a acetylcholinesteráza. Palladium navíc potlačilo přidání thyminu k DNA v játrech, slezině a varlatech.  $\text{PdCl}_2$  interagoval s DNA většinou nekovalentní vazbou a indukoval jeho konformační změny a štěpení. Bylo prokázáno, že sloučeniny palladia ovlivňují hladiny prostaglandinů a interleukinů. Léčba palladiem vedla k perikardiálnímu edému u embryí zebrafish. Pracovníci závodů podílející se na výrobě a recyklaci automobilových katalytických konvertorů trpí astmatem z povolání a platinózou vyvolanou chlorplatnatými deriváty. Alergický potenciál solí platiny se zvyšuje s rostoucím počtem atomů chloru, zatímco nehalogenované a neutrální sloučeniny jsou navrženy jako nealergenní. Byla hlášena také alergie z povolání na platinu.<sup>68</sup>

## ZÁVĚR

Prvním a hlavním cílem mé bakalářské práce bylo provést literární rešerší biologicky aktivních vícejaderných komplexních sloučenin na bázi platiny nebo jiného přechodného kovu. V rámci této práce je prodiskutováno 38 sloučenin, přičemž jsem se zaměřil hlavně na biologickou aktivitu, jejich spektrum působení, popřípadě toxické účinky. Do této teoretické práce byly zařazeny i komplexní sloučeniny s potenciální aktivitou, které ještě používány nejsou. Ve většině případů je biologická aktivita sledována na buněčných liniích karcinomu plic, vaječníků, prsu a tlustého střeva. Výsledky *in vitro* nebo *in vivo* studií ukazují, že biologická aktivita uvedených sloučenin je ve většině případů vyšší než u komerčních přípravků. Rovněž byl popsán mechanismus účinku u některých sloučenin, včetně mateřské cisplatinu. Z mé práce vyplývá, že existuje několik možností interakce sloučenin s DNA. Jsou to tvorba aduktů, můstků, interkalace do řetězce DNA, což má za následek rozštěpení dvoušroubovice aj.

Je zřejmé, že mechanismus účinku jednojaderných a vícejaderných sloučenin vedoucí k zastavení buněčného dělení se liší. Použití léku s odlišným mechanismem účinku je vhodné v případě rezistence vůči standardně používaným cytostatikům, tedy cisplatině a jejích derivátů. Avšak to není jediný přínos vícejaderných komplexů. Kromě rozdílného mechanismu působení nám mohou poskytnout dokonce i nižší toxicitu, což umožňuje větší dávkování, delší dobu možné léčby a také znatelně lepší efektivitu léku.

Druhý, neméně důležitý úkol se týká především toxikologických vlastností cytostatik s ohledem na životní prostředí. Je důležité zmínit, že tato problematika je světovou vědou velice opomíjená a jen malý zlomek vědců se touthle problematikou zabýval. Problém tkví v tom, že existuje velké množství potenciálních léků, avšak působení na životní prostředí bylo zkoumáno a měřeno jen u několika standardně používaných. V závěru rešerše jsem tedy shrnul dosavadní výsledky studií koloběhu cytostatik v životním prostředí. Lze říci, že většina cytostatik, které se dostanou do vodního koloběhu, ať už z nemocničních budov nebo z domácností, je perzistentní v přírodních vodách, což má za následek, že můžou značně ovlivnit kvalitu vody, a také organismy všech trofických úrovní. Už jen z tohoto důvodu si myslím, že si tato problematika zasluhuje daleko větší pozornost a měla by být předmětem studií, protože jde o zdraví všech organismů včetně lidských.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] <http://www.britannica.com/biography/Alfred-Werner> (14-12-2015)
- [2] Jursík F.: *Anorganická chemie kovů*. 1. vyd. 2002
- [3] Greenwood N. N., Ernschaw A.: *Chemie prvků II*, Informatorium, Praha 1993. ISBN: 80-85427-38-9
- [4] [http://wwwchem.uwimona.edu.jm/lab\\_manuals/Werner.html](http://wwwchem.uwimona.edu.jm/lab_manuals/Werner.html) ( 3-12-2015)
- [5] Chemie 2 díl Honza J., Mareček A.: *Chemie pro čtyřletá gymnázia – 2 díl*, 2008
- [6] Březina F., Pastorek R.: *Koordináční chemie*. UP, Olomouc, 1991.
- [7] Jursík F.: *Anorganická chemie kovů*. 1. vyd. 2002 (str. 68)
- [8] Gielen M., Tiekink E. R. T.: *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents*, Eley, 2005. ISBN: 0-470-86403-6
- [9] <https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/4283/01.pdf?sequence=12> (14-12-2015)
- [10] Cooley M.E. et al.: *Cancer Nursing*, 1994, 17, 173-184
- [11] <http://www.chemistryexplained.com/Va-Z/Werner-Alfred.html> (14-12-2015)
- [12] <http://oldwww.upol.cz/aktualita/clanek/biophysicists-hope-to-reduce-side-effects-of-widely-used-chemotherapy-drug/> (15-12-2015)
- [13] Cooley M.E., et al.: *Cancer Nursing*, 1994, 17, 283-293
- [14] Barabas K., Milner R., Lurie. Etal.: *Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications*.2008, 6, 1-18
- [15] Trudu F. et al.: *Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives*, 2015 79-103
- [16] Sanjay K. Bharti, Sushil K. Singh: *Recent developments in the field of anticancer metallopharmaceuticals*, Coordination chemistry reviews, 2009
- [17] <http://www.hindawi.com/journals/chrp/2011/963159/> (28-12-2015)
- [18] ] Pasetto L. M. et al.: *Crit. Rev. Oncol. Hem.* 59-75 2006
- [19] Dabrowiak J.C.: *Metals in Medicine*. Wiley, 2009. ISBN: 978-0-470-68196-1

- [20] Gielen M., Tiekink E. R. T.: *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents*, Wiley, 2005
- [21] <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/gemcitabin-v-lecbe-nemalobunecneho-ca-plic-131152> (13-01-2016)
- [22] <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/06/08.pdf> (13-01-2016)
- [23] <http://www.onkogyn.cz/lekari/hematologicka-toxicita> (13-01-2016)
- [24] [http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&categId=36&cname=Imunologie&termId=524&tname=Idiopatick%C3%A1+trombocytopenick%C3%A1+purpura&h=empty#jump](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=36&cname=Imunologie&termId=524&tname=Idiopatick%C3%A1+trombocytopenick%C3%A1+purpura&h=empty#jump) (13-01-2016)
- [25] Krenning L., Femke M. F. et al.: *Transient Activation of p53 in G2 Phase is sufficient to induce senescence*, Cellpress, 2014
- [26] Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie*. 1. vyd., VŠCHT, Praha 2002. ISBN: 80-7080-495-5
- [27] <http://www.nurch.sk/pacienti/spektrum-diagnoz/reumatoidna-artritida/> (19-01-2016)
- [28] Wenzel M., Bigaeva E., et al.: *New heteronuclear gold(I)-platinum(II) complexes with cytotoxic properties*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014, 141, 10-16.
- [29] Berners-Price S. J., Sadler P. J.: *Coordin. Chem. Rev.* **151**, 1-40, 1996
- [30] [http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul\\_04\\_03\\_01.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_04_03_01.pdf) (20-02-2016)
- [31] Beklem R., Tansu A.: *Investigation of the pharmacological profiles of dinuclear metal complexes as novel, potent and selective cytotoxic agents against ras-transformed cells*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014
- [32] <http://www.news-medical.net/news/2008/12/08/43891.aspx> (6-3-2016)
- [33] Elsome A., Brumfitt W.: *Antimicrobial activities in vitro and in vivo of transition element complexes containing gold(I) and osmium*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996
- [34] Sadler P. J., Bruijninx C. A.: *Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design*, Advances in Inorganic Chemistry, 2009
- [35] Brewer K. J., Milkevitch M.: *Mixed-metal polymetallic platinum complexes designed to interact with DNA*, Inorganica Chimica Acta, 1997

- [36] Milkevitch M., Brauns E.: *A New Class of Supramolecular, Mixed-Metal DNA-Binding Agents: The Interaction of Ru(II),Pt(II) and Os(II),Pt(II) Bimetallic Complexes with DNA*, American Chemical Society, 1997
- [37] Gerner Ch., Berger W.: Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development, *Chemical Society Reviews*, 2016
- [38] Goethe Y., Marzo T.: *Cytotoxic activity and protein binding through an unusual oxidative mechanism by an iridium(I)–NHC complex*, The Royal Society of Chemistry, 2015
- [39] Novohradský V., Štěpánková J. et al.: *A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex*, *Metallomics*, 2014
- [40] Kalidasan M., Forbes S., et al.: *Mononuclear half-sandwich cyclic- $\pi$ -perimeter platinum group metal complexes having bithiazole ligands: Synthesis, molecular and anti-cancer studies*, *Inorganica Chimica Acta*, 2014
- [41] Dorcier A., Haan Ang W., et al.: *In Vitro Evaluation of Rhodium and Osmium RAPTA Analogues: The Case for Organometallic Anticancer Drugs Not Based on Ruthenium*, American Chemical Society, 2006
- [42] Farrel N., Kašpárková J., et al.: *DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002
- [43] Huq F., Dagheriri H., et al.: *Synthesis, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of  $[\{trans-PtCl(NH_3)_2\} \{\mu-(H_2N(CH_2)_6NH_2)\} \{trans-PdCl(NH_3)_2\}](NO_3)Cl$* , *European journal of Medicinal Chemistry*, 2004
- [44] Sava G., Gagliardi R., et al.: *Treatment of metastases of solid mouse tumours by NAMI-A: comparison with cisplatin, cyclophosphamide and dacarbazine*, *Europe PMC*, 1999
- [45] Singh V., Azad G. A., et al.: *Anti-cancer drug KP1019 induces Hog1 phosphorylation and protein ubiquitylation in *Saccharomyces cerevisiae**, *European Journal of Pharmacology*, 2014
- [46] Jakupec M., Galanski M., et al.: *Antitumour metal compounds: more than theme and variations*, Royal Society of Chemistry, 2008

- [47] Anderson C., Taylor I., et al.: *Hetero-multinuclear Ruthenium(III)/Platinum(II) Complexes That Potentially Exhibit Both Antimetastatic and Antineoplastic Properties*, American Chemical Society, 2012
- [48] Higgins S., Brewer K. J., et al.: *Metal to ligand charge transfer induced DNA photobinding in a Ru(II)–Pt(II) supramolecule using red light in the therapeutic window: a new mechanism for DNA modification*, The Royal Society of Chemistry, 2012
- [49] Alanyali F. S., Artagan E., et al.: *Investigation of Genotoxic Effects of Some Ruthenium Complexes According to Cis-platinum*, International journal of Pharmacology, 2011
- [50] Kumar A., Moody L. et al.: *Potential for Multimetal Organometallics as Anti-amyloid Agents*, ASC Chemical Neuroscience, 2008
- [51] de Hoog P., Özalp-Yaman S. et al.: *Platined Copper(3-Clip-Phen) Complexes as Effective DNA-Cleaving and Cytotoxic Agents*, Chemistry: A European Journal, 2008
- [52] de Hoog P., Boldron Ch. et al.: *New Approach for the preparation of Efficient DNA Cleaving Agents*, Journal of Medicinal Chemistry, 2007
- [53] Neuse E. W.: *Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models*, Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2005
- [54] Fouda M. F. R., Abd-Elzaher M. M. et al.: *On the medicinal chemistry of ferrocene*, Applied Organometallic Chemistry, 2007
- [55] Cortés R., Tarrado-Castellarnau M. et al.: *A novel cyclometallated Pt(II)-ferrocene complex induces nuclear FOXO3a localization and apoptosis and synergizes with cisplatin to inhibit lung cancer cell proliferation*, Metallomics, 2014
- [56] Serratrice M., Maiore L. et al.: *Cytotoxic properties of the new organometallic platinum complex and its gold heterobimetallic derivatives*, The Royal Society of Chemistry, 2016
- [57] Wenzel M., Bigaeva E., et al.: *New heteronuclear gold-platinum complexes with cytotoxic properties: Are two metals better than one*, Journal of Inorganic Biochemistry, 2014
- [58] Cheng H., Huq F., et al.: *Synthetic, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of a trinuclear complex*, European Journal of Medicinal Chemistry, 2006

- [59] Craig M. Anderson, Isabelle R. Taylor, et al.: *Hetero-multinuclear ruthenium/platinum complexes that potentially exhibit both antimetastatic and antineoplastic properties*, American Chemical Society, 2012
- [60] Ma L., Wang Z., et al.: *Heterodinuclear Pt-Ru anticancer prodrugs to combat both drug resistance and tumor metastasis*, Royal Society of Chemistry, 2016
- [61] Aranda E. E., Matias T. A., et al.: *Design, syntheses, characterization, and cytotoxicity studies of novel heterobinuclear oxindolimine copper-platinum complexes*, Journal of Inorganic Biochemistry, 2016
- [62] Nieto D., Bruna S., et al.: *Catalytically generated ferrocene-containing guanidines as efficient precursors for new redox-active heterometallic platinum complexes with anticancer activity*, American Chemical Society, 2015
- [63] Kosjek T., Heath E.: *Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment*, Trends in Analytical Chemistry, 2011
- [64] Zhang J., Giannis A., et al.: *Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review*, Science of the Total Environment, 2012
- [65] Matějů, V., Vosáhlová, S., Kyclt, R.: *Stanovení ekotoxicity*, Odpadové fórum, 2005
- [66] Geric M., Gajski G., Garaj-Vrhovac V.:  *$\gamma$ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology*, Ecotoxicology and Environment Safety, 2014
- [67] Fonseca T.G., Morais M.B., et al.: *Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete Nereis diversicolor*, Science of the Total Environment, 2017
- [68] Egorova K. S., Ananikov V. P.: *Which Metals are Green for Catalysis \_ Comparison of the Toxicities of Ni Cu Fe Pd Pt Rh and Au Salts*, Angewandte Chemie, 2016

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A2780	linie buněk rakoviny vaječníků
BBR3464	trinukleární komplex platiny
biphe	bifenyl
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HIV	Human immunodeficiency virus
ind	indazol
IR	infračervená spektrometrie
KP1019	indazolium trans-[tetrachloridobis(1H-indazol)ruthenitý komplex]
L1210	linie buněk lymfocytární leukemie u myši
MCF-7	linie buněk adenokarcinomu prsu
NAMI-A	trans-[tetrachlorid(1H-imidazol)(S-dimethylsulfoxid)ruthenitý komplex]
phen	fenantrolin
RNA	ribonukleová kyselina
UACC-62	linie nádorových buněk melanomu
PPh <sub>2</sub>	fosfino ligand
NHC	N-heterometalický karbenový
HEK-293T	linie buněk karcinomu ledvin
HT-29	linie buněk adenokarcinomu tlustého střeva
MTT	test stanovení metabolické aktivity
A549	buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic
GBM	glioblastom
Cdk	cyklin-dependentní kinázy
SOD	superoxiddismutáza
ER	estrogenní receptor
MDA-MB231	buněčná linie karcinomu prsu

---

HCT-116	buněčná linie karcinomu tlustého střeva
AH197	$[\text{Na}_2]\{[\text{RuCl}_4(\text{DMSO-S})(-\mu\text{-pyz})]_2\text{PtCl}_2\}$
Auranofin	(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glukopyranosyl)(triethylfosfin) zlatný komplex

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Struktura cisplatiny .....	13
Obrázek 2: Mechanismus přípravy cisplatiny .....	14
Obrázek 3: Mechanismus působení cisplatiny.....	16
Obrázek 4: Karboplatina .....	17
Obrázek 5: Oxaliplatina .....	18
Obrázek 6: Nedaplatina .....	19
Obrázek 7: Lobaplatina.....	19
Obrázek 8: Auranofin .....	20
Obrázek 9: Monojaderný komplex s PPh <sub>2</sub> ligandem .....	21
Obrázek 10: Struktura molekuly [Au(L1)(L2)Pt]Cl <sub>2</sub> .....	22
Obrázek 11: Struktura molekuly [(PPh <sub>3</sub> )Au(μ-pbi)Pt-(Me)(DMSO)][PF <sub>6</sub> ] .....	23
Obrázek 12: Struktura derivátu auranofinu .....	24
Obrázek 13: Převzato: Struktura molekuly [(bpy) <sub>2</sub> M(dpbb)PtCl <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> .....	26
Obrázek 14: Převzato: NHC komplex iridia.....	27
Obrázek 15: Struktura molekuly BBR3464.....	28
Obrázek 16: Struktura molekuly DHD .....	29
Obrázek 17: Struktura molekuly CH25 .....	30
Obrázek 18: Struktura molekuly [(η <sup>6</sup> -cymen) Ru(azpy)I]PF <sub>6</sub> .....	31
Obrázek 19: Struktura molekuly NAMI-A .....	32
Obrázek 20: Struktura molekuly KP1019.....	32
Obrázek 21: Molekula [Ru(L) <sub>2</sub> (B)Pt]Cl <sub>2</sub> .....	35
Obrázek 22: Molekula [(bpy) <sub>2</sub> Ru(dpp)PtCl <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> .....	36
Obrázek 23: Struktura molekuly AH197 .....	37
Obrázek 24: Ruthplatinové komplexy 1-4.....	39
Obrázek 25: Molekula trans-Cu[Pt(3-Klip-Fen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> .....	41
Obrázek 26: Struktura molekul komplexů 1 a 2 .....	43
Obrázek 27: Molekula Ferrocenu .....	45
Obrázek 28: Převzato: biologické interakce přenosu elektronu u ferrocenu .....	46
Obrázek 29: Molekula tamoxifenu .....	49
Obrázek 30: Ferrocenový derivát hydroxytamoxifenu .....	50
Obrázek 31: Ruthenocenový derivát hydroxytamoxifenu (Ruthenocifen).....	51
Obrázek 32: Molekula 1,10-dikarboxaldoxim ferrocenu .....	51
Obrázek 33: Molekula ferrochinu.....	52
Obrázek 34: Ferrocenylový derivát z triazacyklononanu .....	53



---

Obrázek 35: Molekula cykloplatinového komplexu.....	54
Obrázek 36: Molekula cis-[PtCl <sub>2</sub> { Fe(η <sup>5</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> } <sub>2</sub> ] .....	56
Obrázek 37: Molekuly komplexů 1 a 2 .....	57
Obrázek 38: Molekuly komplexů 1-3 .....	59
Obrázek 39: Převzato: Schéma cirkulace vody v životním prostředí .....	61

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka č. 1. IC <sub>50</sub> (mM) hodnoty heterodinukleárních sloučenin (ND = není určeno).....	40
Tabulka č. 2. IC <sub>50</sub> (mM) hodnoty heterometalických sloučenin.....	44
Tabulka č. 3: IC <sub>50</sub> (mM) hodnoty heterometalických sloučenin (ND = není určeno).....	56
Tabulka č. 4: IC <sub>50</sub> (mM) hodnoty heterometalických sloučenin .....	59
Tabulka č. 5: Parametry vybraných cytostatických sloučenin.....	63