

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Medicinální chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Vojtěch Štěpánek

Syntéza a studium sendvičových komplexů ruthenia a osmia s protinádorovými účinky
Synthesis and study of ruthenium and osmium sandwich complexes with antitumor effects

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D., Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10.5.2025

Vojtěch Štěpánek

Poděkování

V této části bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Jaroslavu Nislerovi, Ph.D., Ph.D., za vstřícnost a podporu při psaní této práce. Rád bych též poděkoval Olze Bakhanovich, Ph.D., za pevné nervy a důležité rady, které mi poskytla během přípravy této práce.

Mé poděkování patří též ostatním zaměstnancům izotopové laboratoře ÚEB, kteří byli vždy ochotní poradit a pomoci, zvláště pak Mgr. Sándoru Forczekovi, Ph.D. a Ing. Liboru Havlíčkovi CSc.

Abstrakt

Nádorová onemocnění pravidelně obsazují přední příčky příčin úmrtí celosvětově, proto se velká část výzkumu zabývá jejich léčbou. Od 60. let minulého století se předmětem zájmu staly organokovové sloučeniny platiny. Ty ale trpí vysokou orgánovou toxicitou, širokým spektrem vedlejších účinků a nízkou specifitou. Proto se výzkum během let zaměřil na sloučeniny jiných kovů, zvláště pak ruthenia, osmia, iridia a jiných, které vykazují slibné protinádorové účinky.

V této bakalářské práci se budu zabývat právě chemoterapeutiky na bázi koordinačních sloučenin přechodných kovů, zvláště pak ruthenia a osmia a jejich roli při léčbě nádorových onemocnění. V praktické části se pak budu věnovat sendvičovým komplexům Ruthenia a Osmia $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$ a $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$ jako potenciálním náhradám farmak na bázi platiny při léčbě specifických nádorových onemocnění. Cílem praktické části je optimalizace přípravy těchto komplexů tak, aby mohly dané komplexy být připraveny s použitím radioaktivně značené kyseliny dichloroacetové. Toto značení následně umožní pozorovat chování daných látek například v živých buněčných kulturách. Získané poznatky lze poté použít ke studiu mechanismu účinku těchto látek.

Klíčová slova: ruthenium, osmium, dichloroacetát, sendvičové komplexy, cytotoxicita

Abstract

Cancer regularly ranks among the leading causes of death worldwide, which is why a large portion of research focuses on its treatment. Since the 1960s, organometallic platinum compounds have been of particular interest. However, they suffer from high organ toxicity, a wide range of side effects, and low specificity. Therefore, over the years, research has shifted toward compounds of other metals—especially ruthenium, osmium, iridium, and others—that exhibit promising anticancer properties.

In this bachelor's thesis, I will focus specifically on chemotherapy agents based on coordination compounds of transition metals, particularly ruthenium and osmium, and their role in the treatment of cancer. In the practical section, I will concentrate on the half-sandwich complexes of ruthenium and osmium **[Ru(η^6 -p-cym)(bphen)(dca)]PF₆** and **[Os(η^6 -p-cym)(bphen)(dca)]PF₆** as potential alternatives to platinum-based drugs in the treatment of specific types of cancer. The aim of the practical part is to optimize the preparation of these complexes so that they can be synthesized using radioactively labelled dichloroacetic acid. This labelling will then allow the observation of the behaviour of these compounds, for example, in living cell cultures. The acquired findings can subsequently be used to study the mechanism of action of these substances.

Keywords: ruthenium, osmium, half-sandwich complexes, dichloroacetate, cytotoxicity

Obsah

Seznam Zkratek.....	6
1. Úvod.....	7
2. Historie	8
3. Nádorové buňky a buněčný cyklus	8
3.1 Nádorové buňky a genetika – onkogeny.....	9
3.2 Karcinogeny	10
3.3 Léčba	11
4. Chemoterapeutika na bázi kovů	12
4.1 Biochemie sloučenin platiny	14
4.2 Biochemie sloučenin mědi.....	16
4.3 Biochemie sloučenin ruthenia.....	17
4.4 Biochemie sloučenin osmia	22
4.5 Úvod k praktické části	23
5. Praktická část	25
5.1 Metody a Chemikálie	25
5.2 Příprava komplexů Os-Cl a Ru-Cl	25
5.3 Návrh experimentu.....	26
5.4 Průběh experimentu.....	27
5.4.1 Analýza pomocí TLC.....	28
5.5 Výsledky	29
5.6 Metodika pro přípravu radioaktivně značených komplexů	33
5.7 Výsledky	34
6. Diskuse.....	36
7. Závěr.....	38
8. Seznam použité literatury	40
9. Seznam obrázků	44
10. Seznam Tabulek.....	46

Seznam Zkratek

Ag(dca)	dichloroctan stříbrný
BER	base excision repaibas
CDK	cyklin dependentní kináza
CHCl ₃	chloroform
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FGF	fibroblastový růstový faktor
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
MeOH	methanol
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
Os-Cl	[Os(η^6 -p-cym)(bphen)Cl]PF ₆
Os-dca	[Os(η^6 -p-cym)(bphen)(dca)]PF ₆
PDC	pyruvát dehydrogenáza
PDK	pyruvát dependentní kináza
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
Ru-Cl	[Ru(η^6 -p-cym)(bphen)Cl]PF ₆
Ru-dca	[Ru(η^6 -p-cym)(bphen)(dca)]PF ₆
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstvá kapalinová chromatografie)
UV	ultrafialová oblast záření ($\lambda = 200\text{--}400\text{ nm}$)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

1. Úvod

Nádorová onemocnění se pravidelně umisťují na druhé příčce nejčastějších příčin úmrtí, hned za kardiovaskulárními onemocněními, a to jak v rámci České republiky, tak celosvětově. Dle WHO jsou nádorová onemocnění zodpovědná ročně za téměř 10 milionů úmrtí (dle dat z roku 2022¹). Nejčastější je pak incidence nádorových onemocnění prsu, plic, tlustého střeva a prostaty.

V ČR byla v roce 2022 incidence zhoubných novotvarů 65 676, což představuje přibližně 650 případů na 100 000 obyvatel. Nejčastějším nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním u mužů bylo nádorové onemocnění prostaty s incidencí 7 956 případů, což je přibližně 23 % ze všech diagnostikovaných nádorových onemocnění u mužů.

V případě žen byl pak nejčastější výskyt nádorových onemocnění prsu s incidencí 7 732, což u nich představuje přes 25 % všech diagnostikovaných nádorových onemocnění.

Z hlediska úmrtnosti na nádorová onemocnění byl v ČR nejčastějším důvodem zhoubný nádor dýchacího ústrojí s přibližně 5 000 úmrtími a nádorová onemocnění tlustého střeva a konečníku s přibližně 3 500 úmrtími. Tyto dva druhy nádorových onemocnění tvořili společně s onemocněními slinivky, prsu a prostaty přibližně 50 % ze všech případů úmrtí, způsobených nádorovými onemocněními.

Celkem bylo v roce 2022 zaznamenáno 28 071 úmrtí spojených výskytem nádorových onemocnění. V přepočtu na 100 000 obyvatel se pak nachází ČR na 44. místě celosvětově.^{1,2}

Vzhledem k vysoké závažnosti onemocnění je tak velká poptávka po léčebných strategiích, které by napomohly útlumu či vyléčení nádorových onemocnění.

Významným nástrojem při léčbě nádorových onemocnění je chemoterapie, tj. léčba pomocí cytostatických látek podaných do organismu. Jednou z nejdůležitějších skupin chemoterapeutických látek jsou sloučeniny na bázi platiny, jako cisplatina, karboplatina a jiné. Vzhledem k tomu, že se však nejedná o léky dokonalé, které s sebou mohou při léčbě nést vedlejší účinky, či nepůsobit dostatečně proti onemocnění, je ve světě poptávka po výzkumu nových alternativ. V posledních letech se dostávají do popředí látky, které místo platiny využívají jiné kovy, zvláště pak sloučeniny ruthenia, osmia, iridia a dalších přechodných kovů.

2. Historie

Nádorová onemocnění, někdy nazývána též rakovina jsou širokou skupinou onemocnění, pro které je typické nekontrolované buněčné dělení populací, u kterých je častá porucha oproti zdravé buňce. Tyto odchylky zahrnují poruchy cytoskeletu, abnormální počty chromozomů, či schopnosti syntetizovat zcela nové proteiny pro danou buněčnou populaci neobvyklé.

První historicky zaznamenaný případ léčby onemocnění, u kterého se předpokládá, že by mohlo jít o nádor, byl popsán řeckým historikem Herodotem z Helikarnássu. Popisuje událost, která se odehrála v 6. století př. n. l. ve starověké Persii.³

3. Nádorové buňky a buněčný cyklus

Buněčný cyklus se skládá z několika fází: G1, S, G2 a M. Během těchto čtyř fází dojde postupně k růstu mateřské buňky, syntéze DNA a rozdělení na dceřiné buňky. Jednotlivé fáze tohoto cyklu jsou podmíněny správnou odezvou na chemické signály. Podstata vzniku nádorových buněk tak leží v nesprávné odezvě právě na tyto signály. Důvodů, proč k této odezvě nedochází může být mnoho.

Mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu se nachází takzvané kontrolní body. V těch dochází k tomu, že dělicí se buňka nemůže zahájit další fázi, dokud nedojde ke splnění určitých podmínek. Například není-li plně syntetizována DNA. Proběhl-li předcházející krok v pořádku, může buňka v cyklu pokračovat. Velmi významné jsou v případě těchto kontrolních mechanismů dva typy proteinů. **Cykliny** a **Cyklin dependentní kinázy (CDK)**.

Hlavní rolí CDK je aktivace ostatních proteinů zodpovědných za buněčný cyklus pomocí fosforylace. Jejich schopnost fosforylace je však podmíněna vznikem komplexu s cykliny. Bez přítomnosti cyklinů tak není možné, aby komplex vznikl, a tak ztrácejí CDK schopnost regulovat aktivitu ostatních proteinů.

Důležitou roli v buněčném cyklu hraje tzv. START kontrolní bod. Tento bod se nachází na konci G1 fáze a hraje esenciální roli při přechodu buňky do S fáze. Je zde hlídáno,

zda je DNA plně syntetizována a případné chybné úseky byly opraveny. Významnou roli zde hrají cykliny D a E s tím, že dochází ke vzniku komplexů cyklin D/CDK4 a cyklin E/CDK2.

V případě nádorových buněk dochází k deregulaci kontrolních bodů. Ta má v případě START kontrolního bodu za následek střídavé zvyšování a snižování koncentrace komplexu cyklin D/CDK 4. Deregulace může být způsobena i jinými genetickými mutacemi či vnějšími vlivy.

Projde-li poškozená buňka START kontrolním bodem, je velká pravděpodobnost, že se stane buňkou nádorovou. Dochází ke vstupu do S fáze, a to i přesto, že v buňce se nachází poškozená, či nedokončená DNA. U takto poškozených buněk, které prošly START kontrolním bodem pak během několika generací dochází ke kumulaci mutací, které mohou vést k větší deregulaci buněčného cyklu.⁴

3.1 Nádorové buňky a genetika – onkogeny

V průběhu let bylo dokázáno, že za vznikem nádorových onemocnění stojí krom vnějších vlivů i genetické predispozice daného jedince. Některé geny a jejich produkty mají schopnost indukovat vznik nádorů. Tuto skupinu genů nazýváme onkogeny.

Důležitou roli při studování onkogenů sehráli retroviry – viry, které mají schopnost v buňce hostitele použít svojí RNA k syntéze komplementární DNA. Tato DNA je následně včleněna do chromozomů hostitelských buněk. Tato syntéza je umožněna virovou reverzní transkriptázou.

Poprvé byl virus způsobující nádorové onemocnění popsán v článku z roku 1911 Peytonem Rousem. Ten popisuje vznik sarkomu (nádoru v pojivových tkáních) u kuřat.⁵ Postupem času bylo objeveno mnoho virů zodpovědných za specifická nádorová onemocnění a postupně byly u těchto virů popsány i odpovídající onkogeny. V případě Rouseva sarkomu se jedná o gen v-src.⁴

V případě buněčných homologů se jedná o protoonkogeny. Obecně se označují jako c-onc (cell oncogen). Pro onkogen v-src, tak existuje buněčný homolog c-src. Produkty genů c-onc jsou důležité pro regulaci řady buněčných pochodů. Jejich mutace tak může způsobit narušení fungování celého systému buňky a tím zapříčinit vznik nádorové buňky. Zajímavým faktem je, že virové onkogeny v-onc indukují vznik nádorových onemocnění, zatímco jejich zdravé buněčné homology c-onc nikoliv. Nejpravděpodobnějším vysvětlením se zdá být, že součástí

virového genomu jsou geny, které při transkripci genů v-onc dokážou zvýšit produkci cílových proteinů oproti jejich buněčným protějškům. Takto zvýšená aktivita je také jedním z mnoha důvodů vzniku nádorových onemocnění. (Snustad, D. P.; Simmons, M. J., (2017), Genetika)

Důležité je zmínit, že ze všech případů nádorových onemocnění je pouze asi jedno procento způsobeno dědičnými mutacemi genů.

3.2 Karcinogeny

Příčiny vzniku nádorových onemocnění jsou velmi různorodé. Krom příčin geneticky podmíněných můžou za vznik nádorových onemocnění i příčiny vnější. Vlivy způsobující, nebo podporující nádorové bujení nazýváme karcinogeny. Dle jejich původu a povahy je možné rozlišit karcinogeny do následujících kategorií:

- Fyzikální, jako například ionizující záření. To může mít za následek několik efektů, které budou rozebrány v následujících kapitolách, jako je mutace genu RAS, či poranění způsobená volnými radikály.
- Chemické, jako alkohol, tabákové karcinogeny či azbest
- Biologické, mezi které řadíme infekce, bakterie, viry či jiné druhy patogenů.

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny IARC (International Agency for Research on Cancer) vede databázi karcinogenů na základě rozdělení do 5 skupin. Je třeba zmínit, že se nejedná pouze o chemické látky, ale také o způsob života, zaměstnání, či podmínky, kterým je jedinec v okolí vystavován.⁶

Jedinou látkou zařazenou do kategorie 4 byl kaprolaktam, který se průmyslově používá k výrobě Nylonu 6. Tato látka byla však v roce 2019 přesunuta do kategorie 3, jelikož došlo ke změně definice posuzování karcinogenů a kategorie 4 byla zrušena.^{7,8} Zároveň je však potřeba zmínit, že tento seznam je čistě orientační a je troufalé tvrdit, že například pokud bude člověk malovat pokoje, onemocní zákonitě nádorovým onemocněním.

3.3 Léčba

Při léčbě nádorových onemocnění se uplatňuje široká škála léčebných postupů, které se volí dle typu nádoru, kterým pacient trpí, stádia, ve kterém se nádor nachází, a celkovém zdravotním stavu pacienta. Na základě těchto tří kritérií lze rozdělit léčbu nádorových onemocnění do tří kategorií:

- a) Kurativní léčba – Cílem kurativní léčby je úplné vyléčení pacienta a celková eliminace nádorového onemocnění.
- b) Potenciálně kurativní léčba – Klade si za cíl vyléčení nemoci, ale není jasné, zda bude úspěšná.
- c) Paliativní – Cílem paliativní léčby je zmírnění symptomů, popřípadě zpomalení postupu, prodloužení a zlepšení kvality života pacienta.

Základní metody léčby uplatňované v léčbě nádorových onemocnění jsou chirurgická léčba, radioterapie a systémová léčba. Do systémové léčby se řadí chemoterapie, hormonální léčba, imunoterapie a obdobné léčebné směry.

Vzhledem k povaze práce se budu dále zabývat pouze chemoterapií, tj. metodou léčby založenou na podávání cytostatik – chemických sloučenin, které vykazují významné protinádorové účinky. Důležité je zmínit, že chemoterapie je neselektivní, a proto vykazuje velké množství nežádoucích vedlejších účinků. Mechanismus účinku cytostatik je proto založen na zásahu do obecných buněčných pochodů typických pro nádorová onemocnění, jako jsou změny metabolických drah (například Warburgův efekt) či zvýšená proliferace.

Typický je pro mnoho cytostatik zásah do buněčného cyklu nádorových buněk. Takové nazýváme cytostatika cyklus specifická, mohou být též fázově specifická, tj. jejich mechanismus účinku je typický pro specifickou fázi buněčného cyklu. Na základě fungování cytostatik z hlediska buněčného cyklu můžeme pozorovat několik skupin s odlišným mechanismem účinku.

Inhibice syntézy nukleových kyselin je jeden z klíčových jevů, které mají za následek cytostatický účinek. Vzhledem k tomu, že dochází k narušení syntézy nukleových kyselin, jsou

cytostatika z této skupiny nejaktivnější během S-fáze buněčného cyklu, tj. ve fázi, kdy dochází k syntéze DNA a duplikaci chromozomů. Samotná inhibice může probíhat buď blokací syntézy purinových a pyrimidinových stavebních kamenů, nebo inhibicí jejich spojování do řetězců nukleových kyselin. Typickým zástupcem první skupiny je mehotrexát (MTX), jehož mechanismus účinku spořívá v inhibici dihydrofolátreduktázu, enzym nezbytný pro syntézu thymidylátu (dTMP) a prekursoru pro purinové báze^{9,10}.

Inhibicí DNA polymerázy, hlavního enzymu nezbytného pro vznik dvoušroubovice DNA lze dosáhnout druhého zmíněného účinku. Tuto schopnost vykazuje cytarabinn (ARA-C), který po aktivaci konvertuje cytidin na deoxycytidin. Ten po zapojení do enzymu inhibuje jeho fungování.⁹

Dalším klíčovým mechanismem je poškození struktury a funkce nukleových kyselin. To probíhá mnoha způsoby, z nichž nejvýznamnější jsou: alkylace a interkalace. Alkylace je přenesení alkylové skupiny na substrát, v tomto případě nukleovou kyselinu, nebo bílkovinu s tím, že nejčastěji dojde k přenesení na N7 u guaninu. Dle stavby mohou být látky monofunkční – mají jednu funkční skupinu a způsobují substituci, která vede například k chybnému párování, nebo bifunkční – mají více funkčních skupin a mohou vytvořit kovalentní vazbu mezi dvěma a více guaniny. Tato vazba pak může bránit správné replikaci, transkripci i translaci. To způsobuje zvýšenou aktivitu reparačních systémů buňky.^{9,10} Právě do skupiny cytostatik s alkylačnými účinky nejčastěji patří chemoterapeutika na bázi kovů, o kterých bude řeč v následujících kapitolách. Krom sloučenin přechodných kovů patří do této skupiny například karmustin (BCNU)¹¹ či cyklofosfamid (CFA)¹²

4. Chemoterapeutika na bázi kovů

Chemické látky obsahující atomy kovů byly používány k léčbě širokého spektra nemocí již od období kolem 16. století před naším letopočtem, kdy se v Ebersově papyru zmiňuje použití železa k léčbě anémie a mědi k léčbě zánětů.¹³ Dalším významným zdrojem je lékopis *De Materia Medica* (O Lěčivech), z 1. století našeho letopočtu, jehož autorem je Pedanius Dioscorides. V minulosti se jednalo převážně o toxické soli, jejichž léčebné účinky byly moderní medicínou vyvráceny, nebo přinejmenším zpochybněny. Jedním z nejznámějších případů je zajisté oxid arsenitý, známý těž jako utrejch. Zatímco v kriminálních kruzích travičů

napříč kontinenty byl běžně používán k odstraňování nepohodlných osob, ve zbytku společnosti platil za všestranné tonikum a používal se k léčbě syfilitidy.¹⁴

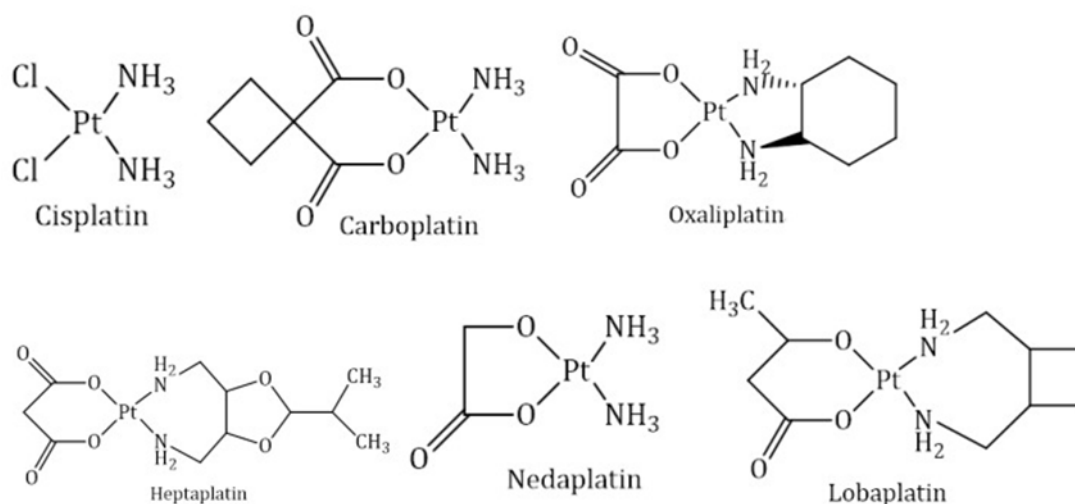
Přesto, že samotný arsen je velmi toxický a jeho sloučeniny vykazují často známky teratogenity, mutagenity a celkové toxicity, byl to právě Salvarsan, látka na bázi arsenu, který byl v roce 1907 syntetizován ve Frankfurtu nad Mohanem, jako první účinný lék na léčbu syfilitidy. Do praxe byl uveden v roce 1910.^{14,15}

Co se týče užití sloučenin kovů při léčbě nádorových onemocnění, sahá historie výzkumu až do roku 1845, kdy italský chemik Michele Peyrone syntetizoval látku, která byla nazývána Peyronova sůl. Teprve v roce 1965 přišel americký chemik Barnett Rosenberg na to, že tato látka významně zpomaluje buněčné dělení a byla pojmenována podle své struktury jako cisplatina. V roce 1969 vyšel v časopise Nature článek „*Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumor Agents*“ (Sloučeniny platiny: Nová skupina účinných protinádorových činidel) ve kterém byla zveřejněna data, prokazující protinádorové účinky cisplatiny a podobných sloučenin, které měly platinu jako centrální atom¹⁶.

Tento objev vedl k rozvoji výzkumu v oblasti kovových sloučenin. Co se sloučenin platiny týče, v USA jsou schváleny **Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv** (FDA) látky cisplatina (CDDP), oxalplatina (OXP) a karboplatina (CBDCA), jako léčiva, která smí být použita pro léčbu zhoubných novotvarů.

Ve světě jsou dále používány i jiné sloučeniny. Například v Jižní Koreji je schválena jako léčivo ještě Heptaplatina, v Číně lobaplatina a v Japonsku nedaplatina^{17,18}.

Vzhledem k vysoké toxicitě látek na bázi platiny vůči zdravým buňkám se v posledních letech přesunul výzkum kovových látek pro léčbu nádorových onemocnění směrem ke kovům, u kterých se předpokládá vyšší účinnost, nebo nižší míra toxicity. Jako nejslibnější se jeví sloučeniny mědi, zlata, zinku, ruthenia, osmia, železa a dalších přechodných kovů.



Obrázek 1 Přehled schválených cytostatik na bázi platiny používaných v různých částech světa. (Jin et al., 2021)

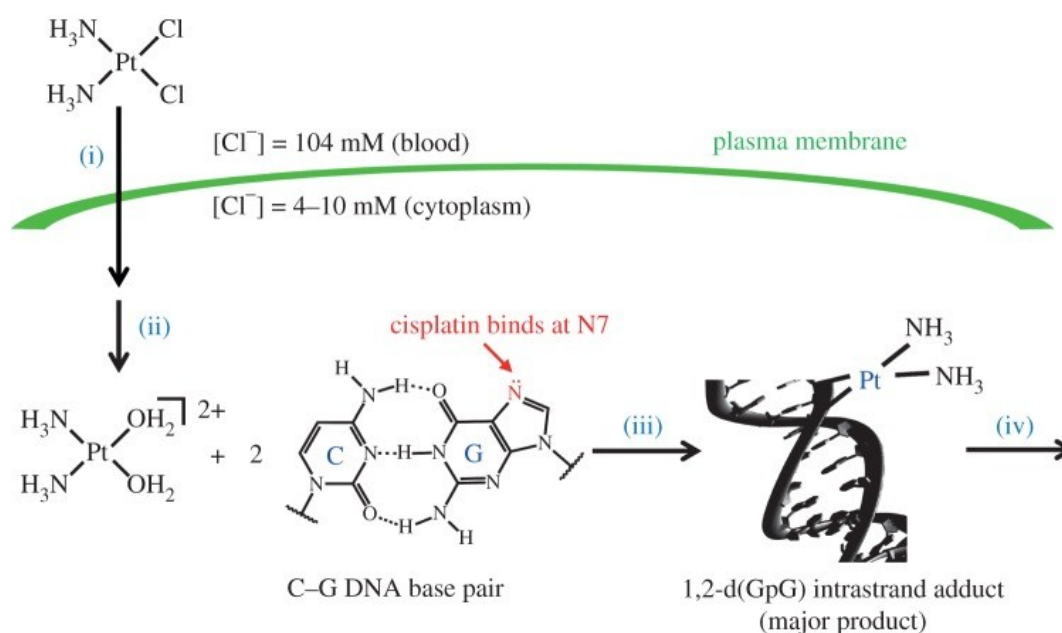
4.1 Biochemie sloučenin platiny

Sloučeniny platiny zpravidla obsahují dva druhy ligandů. Jeden jsou ligandy nesoucí aminoskupiny například 1,2 – diamincyklohexan v případě oxalplatinu. Druhou skupinou jsou snadno odstupující ligandy například chlor, nebo karboxyláty. Jakmile se dostane látka do buňky, dojde ke klíčovému kroku tzv. aquataci, kdy dojde k výměně koordinačně navázaných molekul, které snadno odstupují, za molekuly vody. V případě chloru u cisplatinu je tato výměna podpořena nízkou koncentrací chloridových iontů uvnitř buňky oproti vnějšímu prostředí. Tyto nově vzniklé sloučeniny mají vysokou afinitu vůči nukleofilním úsekům DNA, zvláště pak purinovým bázím cílových buněk. Nejčastější je vazba na N7 na guaninu. Následně dochází zpravidla ke vzniku vazby mezi platinou a jedním či dvěma guaniny, což má za následek poškození DNA. Vazba může probíhat jak mezi bázemi v rámci jednoho řetězce, tak mezi bázemi na obou řetězcích dvoušroubovice DNA. Nejčastější jsou pak vazby mezi řetězci.

Tyto vazby mají za následek lokální denaturaci DNA, která může vést k přerušení řetězce, které je zaviněno opravnými mechanismy buněk. Přesto, že je velká část takto narušených úseků zajištěna pomocí **base excision repair (BER)**, zůstávají některé poškozené úseky neopravené. Takto poškozené úseky pak způsobí během přechodu do S fáze buněčného dělení problém ve START kontrolním bodě a je zahájena buněčná apoptóza.

V případě cisplatiny je důležité při podání zabránit hydrolýze před podáním, proto je cisplatin podávána ve fyziologickém roztoku, jelikož při nízké koncentraci Cl^- by došlo k přeměně na hydratovanou formu před vstupem do buňky, takto pozměněná látka by pak nebyla schopná projít po koncentračním spádu do nádorové buňky, kde je koncentrace chloridových iontů nižší než v krevním oběhu. Dále je důležité bránit látku před podáním před světlem, jelikož v příliš vodném prostředí, nebo za přístupu světla může dojít k přeměně na neúčinný a zároveň mutagenní trans izomer.⁹

Velkým problémem těchto sloučenin je vysoká orgánová toxicita, hlavně pak nefrotoxicita u cisplatiny, hematotoxicita u karboplatiny a neurotoxicita u oxalplatiny⁹. Ta je způsobena poškozením mitochondriální DNA. Stejně jako v případě nádorových buněk dochází ke vzniku Pt-DNA aduktů. Přítomnost chybných úseků DNA pak spouští buněčnou apoptózu.¹⁹



Obrázek 2 Mechanismus působení cisplatiny v buňce (Johnstone et al. 2015)

4.2 Biochemie sloučenin mědi

Vzhledem k toxicitě sloučenin platiny se postupně výzkum posunul směrem ke sloučeninám kovů méně toxických. Měď je látka tělu vlastní, jež se vyskytuje ve velkém množství významných látek, které se nacházejí v živých organismech. V případě lidského organismu je asi nejvýznamnější, jako součást ceruloplasminu, proteinu krevní plazmy, který je zodpovědný za oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , čímž zabraňuje Fentonově reakci, při které vznikají pro tělo vysoce nebezpečné hydroxylové radikály a jiné vysoce **reaktivní formy kyslíku (ROS)**.

V okolí nádorových novotvarů dochází ke zvýšené angiogenezi, tj. zvýšené tvorbě krevních kapilár, které jsou zodpovědné za vyživování tkání. Tento proces je využíván při vývoji plodu v těle matky, nebo například při poškození a následném hojení tkáně. Za regulaci tohoto procesu je zodpovědná celá řada různých skupin proteinů. Mezi nejvýznamnější proteiny, které za angiogenezi zodpovídají **vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a fibroblastové růstové faktory (FGF)**.

Role obou skupin spočívá ve stimulaci endotelových buněk, které dále proliferují a pomáhají tvořit nové krevní kapiláry.

V případě VEGF je aktivita zvýšená při hypoxii a za jeho regulaci zodpovídá **Hypoxii indukovaný faktor (HIF)**. Některé komplexy mědi mají schopnost vázat se na receptory specifické pro VEGF jako jsou VEGFR-1 a VEGFR-2, nebo způsobit poruchy funkce HIF a jeho signálních drah, což má za následek právě sníženou produkci VEGF.^{20,21}

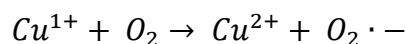
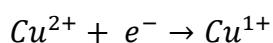
Schopnost regulace FGF mědi není přímo plně popsán, ale některé studie předpokládají, že měď je schopná se vázat přímo na receptory FGFR, se kterými tvoří FGF komplexy FGF-FGFR. Tato schopnost je zapříčiněna přítomností aminokyselin jako jsou histidin či cystein, se kterými dokáže měď vytvořit koordinační vazby. Ty způsobují konformační změny umožňující přímé interakce mezi FGF a FGFR.²²

Měď je též esenciální pro tyto signální dráhy, existují proto dvě cesty, jak s jejich fungováním interferovat. Krom již zmíněného zásahu do signálních drah pomocí vhodného komplexu, se jeví jako účinná metoda vychytávání přebytečné mědi.

Studie ukazují, že v nádorových buňkách dochází ke kumulaci mědi, což bývá spojováno se zvýšeným růstem a metastází. Proto se jeví jako rozumná strategie místo přímého zásahu

do signalačních drah snížení koncentrace mědi v nádorových buňkách pomocí vhodných chelatačních činidel jako je například tetrathiomolybdenan amonný $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$.^{23,24}

Další vlastností mědi je schopnost indukovat vznik ROS v buňkách. Výše bylo napsáno, že jako součást ceruloplasminu se podílí oxidací železa a tím oxidativnímu stresu zabraňuje. Sama má však v buňkách schopnost přecházet mezi oxidativními stavy Cu^{1+} a Cu^{2+} čímž může ROS naopak způsobit. Díky reakci s buněčnými antioxidantům jako glutathion, či askorbát může dojít k redukci měďnatého iontu na měďný. Ten následně může reagovat s kyslíkatými sloučeninami jako jsou peroxid vodíku, či molekula kyslíku za vzniku toxických kyslíkatých radikálů.^{25,26}



(1)

Mezi sloučeniny, které vykazují slibnou protinádorovou aktivitu s výše popsány účinky tj. schopností vyvolat zvýšený oxidativní stres či zamezit angiogenezi patří hlavně komplexy s fenantrolinem²⁶. Sloučeniny s thiosemikarabazony, zvláště pak Cu^{2+} – ATSM a Cu^{2+} – GTSM vykazují slibné výsledky u hypoxických tumorových buněk hlavně díky schopnosti zvýšení ROS²⁵.

4.3 Biochemie sloučenin ruthenia

Již od objevení účinků cisplatiny se zaměřovalo mnoho studií na bioaktivitu komplexů ruthenia. Jeho velkou výhodou je krom nižší toxicity oproti platině i široká škála možných oxidačních stavů. Může se vyskytovat v oxidačních stavech +II, +III a +IV. To vše za biologických podmínek s tím, že přechod mezi těmito oxidačními stupni je poměrně snadno dostupný, což umožňuje změnu oxidačního stavu v živých buňkách. Některé studie též ukazují, že Ruthenium se preferenčně akumuluje v novotvarech způsobených abnormálním růstem tkáně, což je typické právě pro zhoubné novotvary nádorového typu. Tento jev může být způsobený

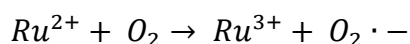
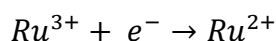
schopností Ruthenia vázat se na transferin, se kterým vytvoří komplex Ruthenium-transferin, který je následně dopraven do místa nadměrného bujení, kde je kov uvolněn.

Obecně se dá říct, že komplexy Ruthenia disponují třemi vlastnostmi, které z nich dělají ideální kandidáty pro léčbu nádorových onemocnění. Jedná se o stabilitu komplexů, širokou škálu možných oxidačních stavů a schopnost napodobovat chování železa a jeho vazbu na specifické buněčné receptory a molekuly.²⁷

„Napodobování chování železa spočívá ve schopnosti vazby na sérové proteiny albumin a transferin. Tyto proteiny krevní plazmy jsou esenciální pro transport železa. Vzhledem k náročnosti nádorových buněk na železo a živiny obecně, dochází na povrchu nádorových buněk k navýšení počtu transferinových receptorů oproti zdravým buňkám. Studie in vivo ukazují že koncentrace ruthenia v nádorových buňkách může být oproti zdravým 2krát až 12krát vyšší. (Sava G, Bergamo A (2000) Ruthenium-based compounds and tumour growth)“

Kinetika výměny ligandů se v případě komplexů ruthenia pohybuje pro malé ligandy jako například voda, pohybuje v řádu hodin. Tento časový interval odpovídá časovému intervalu buněčného dělení mnoha druhů buněk a zároveň je podobný pro komplexy Ru(II) i Pt(II). Některé studie navíc ukazují i na preferenci vazby komplexů Ru(II) na S-donorové ligandy, jako jsou například aminokyselina methionin či antioxidant glutathion, který hraje esenciální roli při obraně buněk před oxidačním stresem.^{28,29}

Tato schopnost je obzvláště zajímavá v kontextu pestré škály oxidačních stavů, které ruthenium nabízí. Kromě fungování glutathionu dokáže ruthenium interferovat i s enzymem **superoxid dismutázou** (SOD), který je zodpovědný za přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku. Samotné ruthenium je pak schopné indukovat oxidační stres přechodem mezi oxidačními stavy a tím napomoci vzniku ROS. Při inhibici hlavních antioxidantních látek v buňce tak dochází k poškození jak na úrovni DNA, tak na úrovni celé buňky.

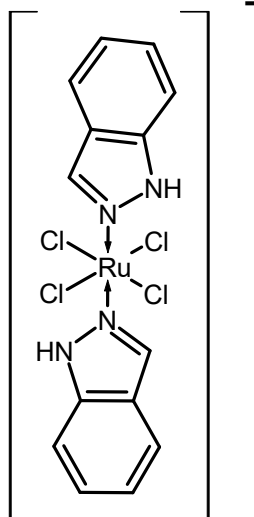


(2)

Mezi významné zástupce sloučenin ruthenia s protinádorovými účinky patří NAMI-A, KP1019 a TLD-1433 jež jsou blíže popsány v následujících podkapitolách.

4.3.1 KP1019

Asi nejslibnější zástupce alternativ za běžně používaná platinová cytostatika. Mechanismus spočívá ve vazbě na **sérový albumin** (HSA) a následné dopravě skrz transferinové receptory do buňky. Důležitým krokem je uvolnění látky z proteinu. Částečně jsou za to zodpovědné atomy Fe^{3+} , které se kompetitivně vážou na protein. Studie *in vitro* ukazují, že vlivem snížení pH například přidáním kyseliny citronové může dojít k téměř úplnému uvolnění z proteinu. Podobný vliv ukazuje i přítomnost ATP. Obě tyto látky se mohou fyziologicky nacházet v buňkách. V hypoxickém prostředí nádorových buněk by pak mělo docházet ke dvěma procesům. Prvním je substituce chloru z Ru-Cl vazby a vazba komplexu způsobující vazbu na buněčné proteiny a jiné biomolekuly. Dalším procesem je redukce Ru(III) na Ru(II). Tento jev, kdy je kov redukován v hypoxickém prostředí typickém pro nádorové buňky pomáhá k cílenému účinku³⁰. Co se týče tvorby vazeb mezi molekulami DNA jako v případě cisplatin, není vliv tak významný, a přesto že ke vzniku DNA aduktů dochází, je poškození DNA zapříčiněno spíše oxidativním stresem způsobeným generováním ROS. V první fázi klinických studií na 8 pacientech nebyly prokázány významné vedlejší účinky. Ze všech osmi pacientů u dvou nebyly výsledky prokazatelné a u pěti ze šesti zbývajících došlo k pozitivnímu ovlivnění stabilizace onemocnění po dobu až 10 týdnů.³¹

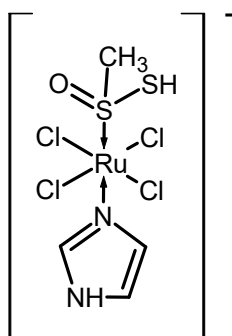


Obrázek 3 Strukturální vzorec komplexu KP1019

4.3.2 NAMI-A

NAMI-A se vyznačuje tím, že nemíří přímo na generaci oxidativních forem kyslíku. V porovnání s cisplatinou je NAMI-A prakticky netoxický vůči nádorovým buňkám.³² Jeho hlavním efektem je inhibice metastázy nádorů. To znamená, že nádor se nemůže šířit do jiných tkání a orgánů v těle. Obzvláště účinný je proti nádorům plic.³² Mechanismus účinku tohoto komplexu není zcela znám, přesto se mluví o dvou hlavních způsobech:

- a) Inhibice buněčné migrace a adheze nádorových buněk
- b) Narušení angiogeneze nádorových buněk

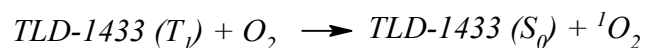
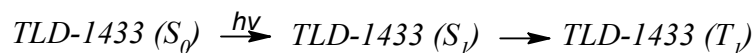


Obrázek 4 Strukturální vzorec komplexu NAMI-A

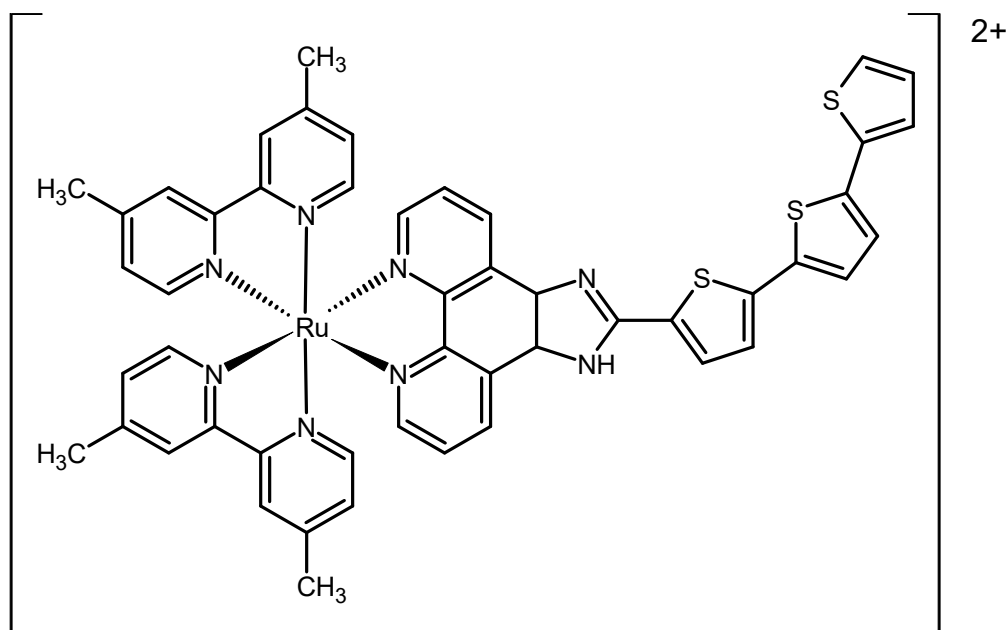
4.3.3 TLD-1433

TLD-1433 je koordinační komplex ruthenia jehož hlavní výhodou je možnost využití při fotodynamické terapii (PDT). Tento způsob léčby nádorových onemocnění spočívá v použití záření o určité vlnové délce. To umožní aktivaci naakumulované látky a její následné působení v cílové oblasti v našem případě v oblasti, kde dochází ke zvýšenému nádorovému bujení.

Komplex TLD-1433 má schopnost vázat se mimo jiné na sérový transferin. Navázán na transferin se pak skrz transferinové receptory dostane do nádorových buněk. Po doručení na místo určení dojde k ozáření cílového místa. To vede k excitaci atomu ruthenia do vyššího elektronového singletového stavu. V tom dojde k takzvanému mezisystémovému přechodu (ICS). To je izoenergetický přechod mezi dvěma elektronovými stavy o odlišné spinové multiplicitě bez emitování záření.³³ V případě ruthenia jde o přechod mezi singletovým a tripletovým stavem. Excitované TLD-1433 v tripletovém stavu následně reaguje s molekulami kyslíku v nádorové buňce, kterým předá svojí přebytečnou energii a vrátí se do základního stavu za vzniku singletového kyslíku. Ten je jednou ze základních reaktivních forem kyslíku, které nadále pomáhají zvyšovat oxidační stres v buňce.³⁴



(3)



Obrázek 5 Strukturní vzorec komplexu TLD-1433

4.4 Biochemie sloučenin osmia

Na rozdíl od ostatních prvků 8. skupiny, kterými jsou železo a ruthenium je studium sloučenin osmia v rámci výzkumu léčby nádorových onemocnění poměrně neobvyklé a množství dostupných studií malé. Přesto existují studie poukazující na cytotoxický účinek sloučenin osmia proti nádorovým buňkám *in vitro*.³⁵ Vzhledem k pomalejší kinetice výměny ligandů oproti Rutheniu se předpokládá, že by mohly být sloučeniny osmia vhodnější pro použití za fyziologických podmínek. Jednou z příčin vyšší stability sloučenin je fakt, že 5d orbital u osmia má vyšší energii než 4d orbital ruthenia. Proto je π -vazba daného komplexu silnější a komplex stabilnější. Osmiové analogy sloučenin Ruthenia vykazují vyšší potenci, která může být způsobena právě tím, že komplexy Ruthenia rychleji podléhají hydrolýze.³⁶ Tento jev je však dvousečnou zbraní. Na jednu stranu pomáhá například udržení reaktivních ligandů jako jsou halogeny, nebo v případě komplexu Os-dca kyseliny dichloroctové, na druhou stranu může

snižovat protinádorovou aktivitu, jelikož mohou být komplexy úplně odolné vůči hydrolyze a nemůže pak docházet k aktivaci aquatací. Příkladem tohoto jevu jsou analogy NAMI-A, kde byly atomy chloru substituovány za DMSO.

Tento jev lze využít při studiu bio distribuce Rutheniových komplexů a následném studiu jejich působení, jelikož mnoho komplexů Ruthenia podléhá hydrolyze.³⁷

Krom jiného je ale možné použít tuto stabilitu k dopravě ligandů, které není možné dopravovat právě kvůli riziku hydrolyzy. Příkladem mohou být komplexy M-NO. Oxid dusnatý je zajímavý svým fyziologickým účinkem. V nižších koncentracích působí uvolňování hladkého svalstva tzv. vazodilataci, naopak ve vyšších koncentracích je v těle cytotoxický, působí poškození DNA a podporuje apoptózu. V případě nádorových buněk tomu není jinak. Nízké koncentrace NO působí pozitivně na angiogenezi v oblasti nádorového bujení, naopak koncentrace vyšší inhibují proliferaci a podporují apoptózu. V buňkách dochází k nitrosylaci metalloproteinů, DNA a ostatních molekul. Zatímco v nižších koncentracích je tento proces vratný, při vyšších je tato schopnost omezena. Výsledkem těchto změn je nevratné poškození a zánik buněk. Cílené uvolnění NO by proto mohlo být také jednou z možných strategií boje proti nádorovým onemocněním.³⁸ Právě u komplexů Ru-NO se však ukazuje nižší odolnost vůči hydrolyze oproti jejich analogům, které mají Osmium jako centrální atom.³⁷

Stejně jako u ostatních přechodných kovů, i u osmia se předpokládá schopnost vazby na DNA, která způsobuje konformační změny a ovlivňuje buněčný cyklus. Dále se i u Osmia objevuje pestrá škála oxidačních stavů a schopnost vyvolávat oxidativní stres.

4.5 Úvod k praktické části

Jak bylo již dříve zmíněno, sloučeniny platiny jsou velmi účinným nástrojem při léčbě nádorových onemocnění. Jelikož je ale jejich užití spojeno s velkou mírou toxicity, bylo potřeba v průběhu let přijít s alternativními sloučeninami, aby došlo k limitaci nežádoucích účinků.

Mezi nejintenzivněji zkoumané sloučeniny patří sloučeniny Ruthenia a Osmia. Tyto sloučeniny působí jiným způsobem než sloučeniny platiny, přesto vykazují slibné cytotoxické účinky vůči nádorovým buňkám. Z velkého množství připravených komplexů se ukázaly jako slibné tzv. Half-sandwich complexes neboli sendvičové komplexy. Tyto komplexy na sobě nesou aromatický ligand navázaný pomocí η – vazby mezi centrálním atomem a ligandem.

Důvodem volby kyseliny dichloroctové jako aktivního ligandu v přípravě komplexů M-dea je její předpokládaný vliv na potlačení Warburgova efektu, který je pro buňky nádorových onemocnění typický. Předpokládaný účinek kyseliny dichloroctové spočívá v inhibici enzymu **pyruvát dehydrogenáza kinázy (PDK)**. Tento enzym hraje esenciální roli při inhibici enzymového komplexu **pyruvát dehydrogenázy (PDC)**. Samotná pyruvát dehydrogenáza je esenciální pro přeměnu pyruvátu z glykolýzy na **Acetylkoenzym A**. Ten se následně v mitochondriích zpracovává v rámci dýchacího řetězce na ATP. Při disfunkci pyruvát dehydrogenázy tak nedochází k přeměně pyruvátu na Acetylkoenzym A, ale je metabolizován anaerobně na laktát. Warburgův efekt je typický úkaz u buněk zhoubných novotvarů. Jedná se o úkaz, kdy buňka místo klasické metabolické přeměny pyruvátu na Acetylkoenzym A a následnému metabolismu v dýchacím řetězci volí dráhu, kdy je pyruvát přeměněn méně efektivní cestou na laktát.^{39,40} Dochází tak k tomu, že pacienti upadají do laktátové acidózy, která je sama o sobě život ohrožující. Tento stav je však doplněn ještě o nádorovou kachexii, tj. celkové vyčerpání organismu v důsledku onemocnění.

Možných důvodů, proč u nádorových buněk existuje Warburgův efekt je mnoho. Jako hlavní se uvádí například adaptace na nedostatek kyslíku v nádorových buňkách. Dalším významným důvodem může být fakt, že mitochondrie jsou zdrojem velkého množství protizánětlivých signalizačních molekul, které mohou spouštět apoptózu, jako jsou například cytochrom c, či proteiny z rodiny Bcl-2. Omezením funkce mitochondrií tak nádorové buňky mohou limitovat riziko sebedestrukce v důsledku spuštění apoptických procesů.

V případě dichloroctanu sodného byl prokázán vliv na léčbu laktátové acidózy. Následně i další studie prokázali, že dichloroctová kyselina je zodpovědná za inhibici PDK. Tato inhibice vede k indukci působení PDC a snížení hladiny laktátu v buňkách. V případě nádorových buněk se jedná o jakési „nastartování“ mitochondrií, kdy dojde k tomu, že mitochondrie začnou přijímat vyšší množství pyruvátu. Postupně dochází ke zvýšené oxidaci glukózy, zvýšení oxidativního stresu a zpomalení proliferace nádorových buněk. Zvýšená oxidace vede ke zvýšenému oxidativnímu stresu, ten má za následek poškození mitochondrií, které spouští apoptické dráhy nádorových buněk.⁴¹

Z tohoto důvodu je kyselina dichloroctová ideální ligand pro komplex s potenciálním protinádorovým účinkem. Tyto komplexy tak mají dvojí mechanismus účinku: Mechanismus samotného kovu v centru komplexu a mechanismus ligandu, který sám o sobě vykazuje slibné protinádorové účinky

5. Praktická část

5.1 Metody a Chemikálie

Ke změření absorbance výchozí látky a produktu a zjištění optimální vlnové délky pro měření pomocí HPLC, byl použit UV/VIS Spektrofotometr **Unicam Helios β**. Během měření pomocí HPLC byly použity dva přístroje, Přístroj **Waters Alliance e2695** s připojenými moduly pro měření absorpčního spektra, a hmotnostním spektrometrem. V tomto přístroji byla použita kolona **ZORBAX Extend-C18 Column, 2.1 x 150 mm, 5 μm p/n 773700-902**. Druhý použitý přístroj byl **Shimadzu CTO-20A/AC Prominence HPLC Column Oven**, s připojenými moduly **LC-20AB Prominence Liquid Chromatograph** a **SPD-20A Prominence UV/VIS Detector**. V tomto přístroji byla při měření použita kolona **XBridge BEH C18 Column, 130Å, 3.5 μm, 3 mm x 150 mm, 1/pk p/n 186003028**. K vážení byla použita váha **Sartorius supermicro S4 Micro Balance**.

K přípravě komplexů M-dca byly použity prekurzory M-Cl ($[M(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})(\text{dca})]\text{PF}_6$, M = Ru, Os) připravené na Univerzitě Palackého v Olomouci. Rozpouštědla pro reakci a analýzu kterými byl methanol a chloroform pocházela od firmy Lachner s.r.o., dusičnan stříbrný pocházel ze skladu Izotopové laboratoře ÚEB, stejně tak i kyselina dichloroctová.

5.2 Příprava komplexů Os-Cl a Ru-Cl

0,5 g $\text{OsCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno společně s 1 ml α -terpinenu v 5 ml methanolu. Vzniklý roztok byl ponechán k reakci v mikrovlnném reaktoru při teplotě 80 °C po dobu 8 minut. Vzniklý dimer byl následně několikrát promyt diethyletherem.

Výchozími látkami reakce byly dimery

$[M(\eta^6\text{-pcym})\text{Cl}]_2$ (0,10 mmol; M = Ru, Os ; 1 ekv.), které byly reagovány s nadbytkem (0,15 mmol; 1.5 ekv.) batofenantrolinu (bphen) v 5 ml methanolu v mikrovlnném reaktoru při teplotě 100 °C po dobu 1 minuty. Vzniklé roztoky byly ponechány k vychladnutí. Ke vzniklému

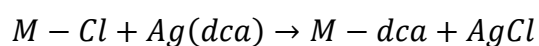
roztoku byl přidán nadbytek NH_4PF_6 (3,0 mmol; 30 ekv.) a roztok byl ponechán k odpařování za stálého míchání na topné míchačce, dokud nedošlo k vysrážení komplexů. Vzniklé komplexy $[\text{Os}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ a $[\text{Ru}(\eta^6\text{-pcym})(\text{bphen})\text{Cl}]\text{PF}_6$ byly kvantitativně přeneseny do Eppendorfových 1,5 ml zkumavek a centrifugovány. Po centrifugaci byl obsah dekantován tak, aby vzniklé komplexy zůstaly ve zkumavce. Následně byly komplexy promyty methanolem, diethyletherem (1x 0,5 ml methanolu, 3x 0,5 ml diethyletheru) a vysušeny. Na vzniklých komplexech byla provedena analýza pomocí HPLC-MS, aby bylo potvrzeno, že předpokládané komplexy byly připraveny.

EM (Ru-Cl): 602, **MS-ESI+ (Ru-Cl):** 600.3, 601.3, 602.2, 603.1, 605.1, 606.1, 608,0.

EM (Os-Cl): 693, **MS-ESI+ (Os-Cl):** 688.6, 689.6, 690.6, 691.4, 693.2, 694.1, 696.1, 697.13.

5.3 Návrh experimentu

Reakce přípravy komplexů Ru-dca a Os-dca je jednokrokovou reakcí, kdy dochází k substituci jednoho chloridového ligandu za dichloroctovou kyselinu. Tato substituovaná kyselina je značena pomocí radioaktivního uhlíku ^{14}C . Jelikož se jedná o radioaktivní látku, je optimální minimalizovat kontakt s chemikáliemi a zároveň zajistit, aby došlo k maximální konverzi M-Cl komplexů na M-dca. Jelikož ale není konverze úplná, je třeba posunout rovnováhu směrem k produktu. Toho bude dosaženo přidáním nadbytku výchozích komplexů M-Cl, aby došlo k úplné spotřebě kyseliny dichloroctové.



(4)

K separaci a analýze bude použito několik instrumentálních metod, zvláště pak TLC tenkovrstvá chromatografie, UV-VIS spektrofotometrie a HPLC průtoková chromatografie.

5.4 Průběh experimentu

Na katedře anorganické chemie Univerzity Palackého v Olomouci byly připraveny výchozí látky Os-Cl a Ru-Cl, které byly dovezeny do Prahy. Zároveň byly dodatečně zaslány i výsledné produkty Os-dca a Ru-dca, aby bylo možno provést analytická měření.

Nejdříve byly všechny vzorky změřeny na UV-VIS spektrometru, aby byla určena absorpční maxima pro následné analytické měření na HPLC. Jako optimální byla pro detekci stanovena vlnová délka 292 nm.

Vzhledem k malému množství komplexu Os-Cl byla všechna experimentální měření prováděna na komplexu Ru-Cl. Vzhledem k podobným vlastnostem látek se předpokládá, že při použití stejného postupu bude dosaženo podobných výsledků.

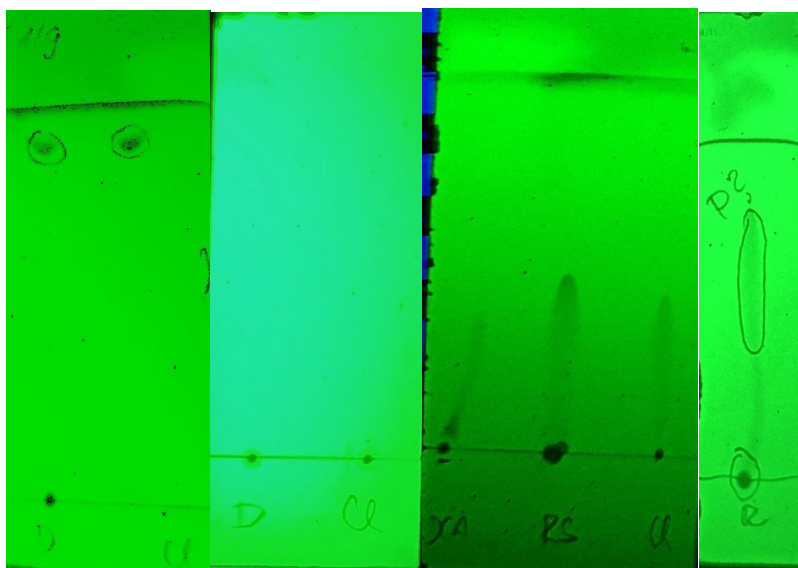
Pro první reakci bylo do 100 ml slzovité baňky přidáno Ag(dca) (5.6 mg; 0.023 mmol, $M = 236.81$; 1 mol ekv.), Ru-Cl (19.0 mg; 0.030 mmol; $M = 747.04$; 1.25 mol. ekv.) a takové množství methanolu, aby došlo k úplnému rozpuštění výchozích látek. Tato směs byla ponechána k míchání přes noc pod hliněnou folií, jelikož stříbrné soli jsou citlivé na světlo. Druhý den bylo míchání zastaveno a směs byla ponechána, aby došlo k usazení vzniklých sraženin na dně baňky. Poté byl pomocí TLC pozorován průběh reakce a bylo prokázáno, že v reakční směsi je přítomna krom výchozí látky i jiná látka. Jelikož nedošlo na TLC destičce ke vzniku tmavé skvrny způsobené redukcí stříbrných iontů na stříbro, dá se předpokládat, že veškerá Ag(dca) byla spotřebována a zbylé stříbro se vysráželo ve formě AgCl na dně baňky, čemuž odpovídal i šedivý povlak vzniknuvší na dně reakční baňky.

5.4.1 Analýza pomocí TLC

Vzhledem k problémům s HPLC přístrojem bylo potřeba přistoupit k analogovým metodám, jako optimální možnost byla zvolena tenkovrstvá chromatografie TLC. Vzhledem k povaze připravovaných látek bylo potřeba zvolit fázi která odpovídá vlastnostem připravovaných komplexů, jelikož se jedná o kationty hexafluorofosforečných solí.

Postupně byl upravován poměr mezi methanolem (MeOH) a chloroformem (CHCl₃) aby bylo dosaženo ideální pohyblivosti na TLC (Obr. 6). Postupně byly testovány roztoky MeOH/CHCl₃ v poměru 50/50, 10/90, 7,5/92,5 a 5/95. Jako ideální mobilní fáze byl stanoven roztok MeOH/CHCl₃ v poměru 5/95. Do vyvíjecí komory bylo přidáno 0,25 ml MeOH, který byl doplněn do 5 ml pomocí CHCl₃.

Následně byla připravená reakční směs ponechána k vyvíjení na TLC společně s výchozím komplexem a předem připraveným produktem pro kontrolu. Přestože se podařilo dosáhnout separace jednotlivých složek reakční směsi, nebyly touto metodou dokázány žádné důležité informace. Tato cesta se proto ukázala jako slepá. Zvláště pak proto, že předpokládaný produkt zůstal na startu a jeho pohyblivost na TLC byla zanedbatelná.

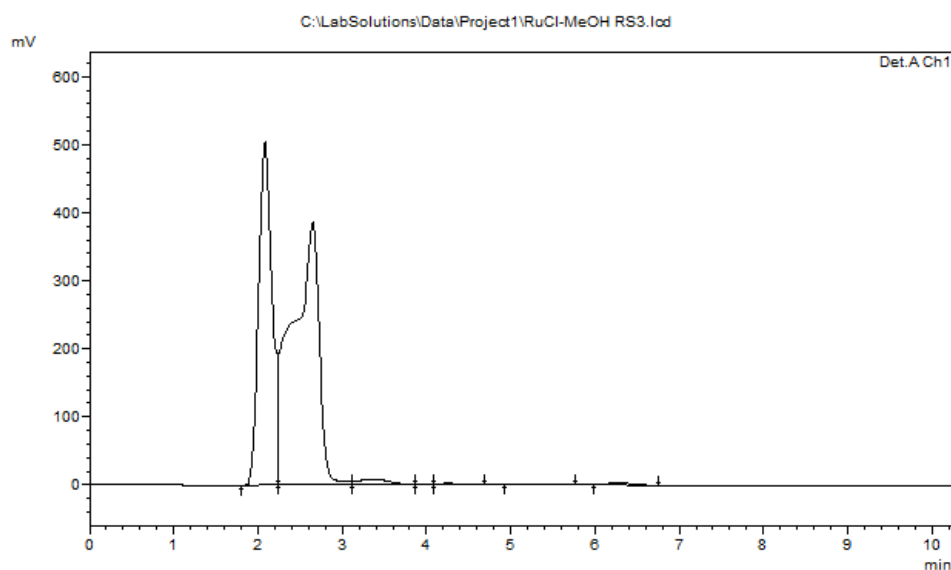


Obrázek 6 Výsledky TLC dle různých mobilních fází na silikagelových destičkách. Byla testována pohyblivost výchozí látky (Cl), Produktu (DCA či D) a reakční směsi (RS či R). Testován byl poměr methanolu a chloroformu 10/90 (A), 5/95 (B), 7,5/92,5 (C). Následně byla otestována reakční směs v systému methanol/chloroform 5/95 (D). Černé tečky na startu jsou způsobeny s největší pravděpodobností tím, že dichloroctová kyselina narušila strukturu silikagelu.

5.5 Výsledky

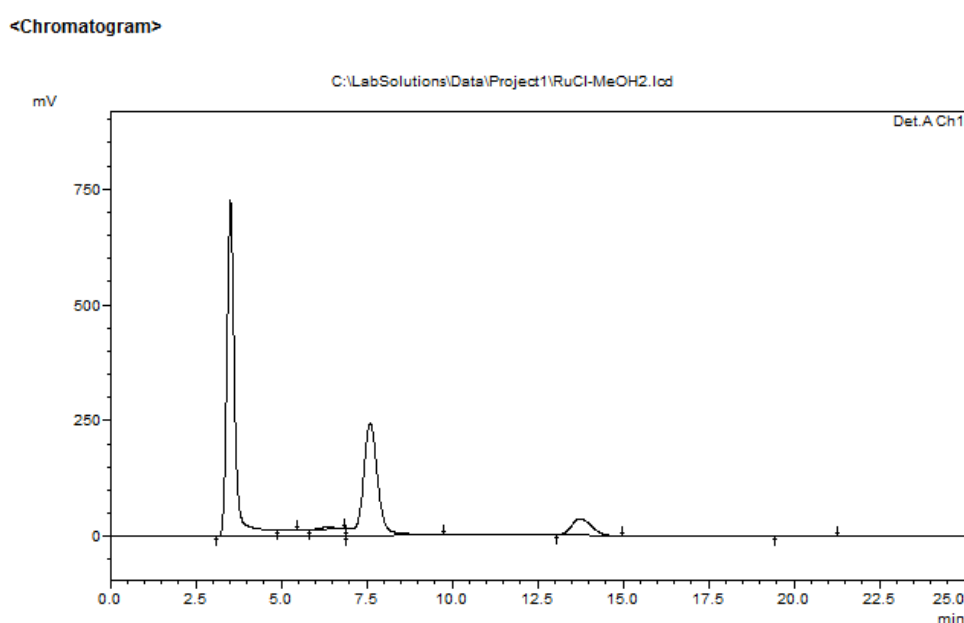
Vzhledem k tomu, že byl použit nadbytek výchozí látky, tj. komplexu Ru-dca, nebylo možné použít k separaci krystalizaci pomocí přidání nadbytku NH_4PF_6 jelikož by došlo k vysrážení jak produktu, tak výchozí látky. Proto bylo potřeba zvolit separaci reakční směsi pomocí HPLC. Vzhledem k povaze obou látek a metodě přípravy byla zvolena experimentálně mobilní fáze $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ v poměru 10/90. Pro porovnání byl krom reakční směsi proměřen i produkt a výchozí látka, aby bylo možno ztotožnit případné píky:

<Chromatogram>



Obrázek 7 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu při použití mobilní fáze $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ v poměru 10/90. Je zde vidět, že nedošlo k příliš dobré separaci jednotlivých látek.

Vzhledem k tomu, že při použití takto zvolené mobilní fáze nedošlo k uspokojivé separaci, byl při dalším měření navýšen podíl vody, takže byla výsledná mobilní fáze H₂O/MeOH v poměru 30/70. I přes neúspěch dalo však toto měření kvalitativní informaci, že se v reakční směsi nachází alespoň dvě látky, což v porovnání s měřeními výchozí látky, kdy je k vidění pouze jeden výrazný pík, naznačuje přítomnost jiné látky, o níž předpokládám, že by se mohlo jednat o produkt. Měření při použití nové mobilní fáze s větším podílem vody vedlo k mnohem přesvědčivější separaci látek:



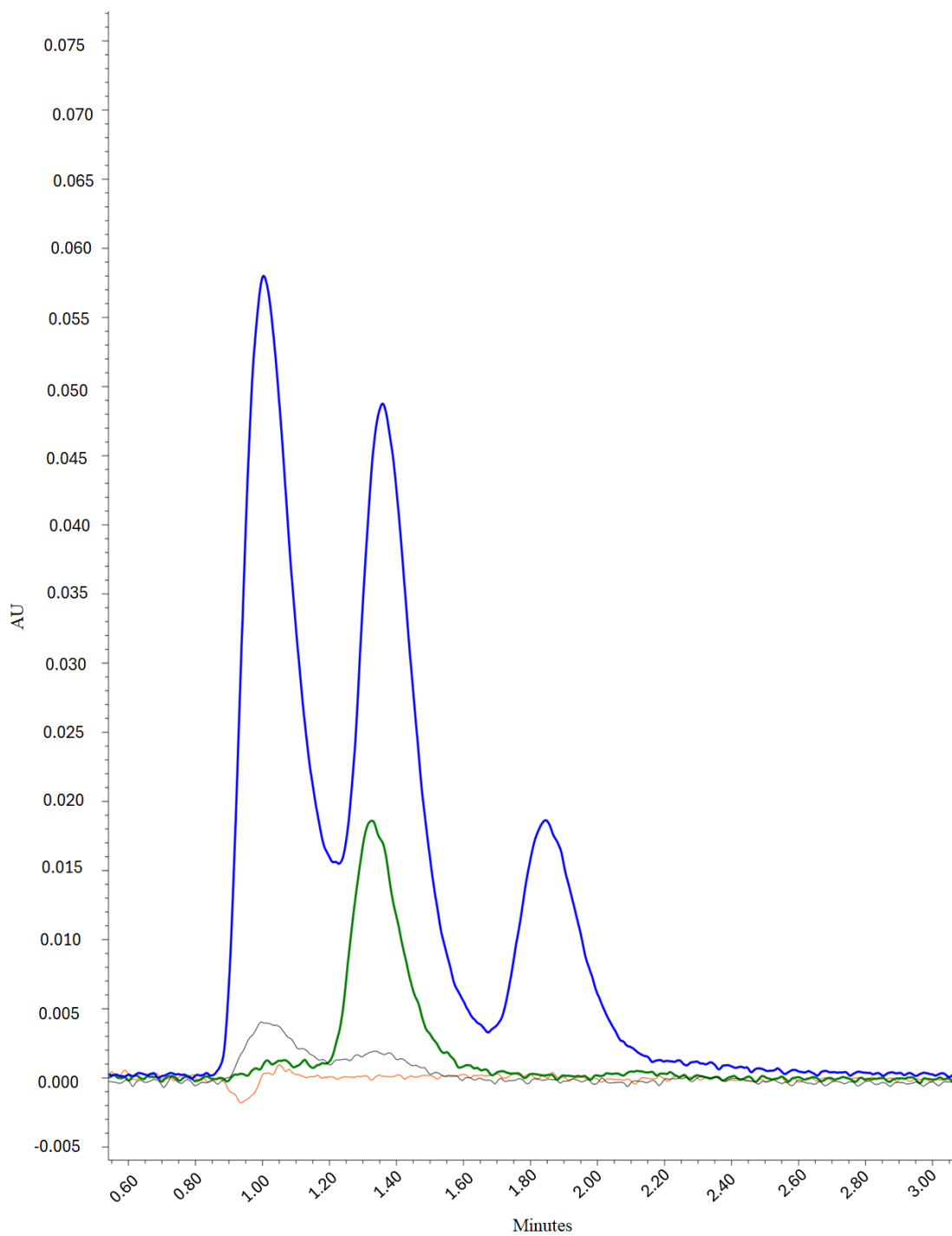
Obrázek 8 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu při použití mobilní fáze H₂O/MeOH v poměru 30/70. Je zde vidět, mnohem lepší separace jednotlivých látek a tři významné píky, které náleží Ru-dca, Ru-Cl a vedlejšího produktu, který neobsahuje ani jeden ze dvou pro tuto práci významných ligandů.

Tabulka 1 Retenční časy jednotlivých složek reakční směsi RT v minutách, maximální intenzity a plochy píků a z nich vypočtené procentuální zastoupení jednotlivých složek v reakční směsi.

	Max	RT (min)	Plocha rel.	Podíl v %
Ru-dca (přepokl.)	726513	3,5	13224000	60,1
Ru-Cl (předpokl.)	241856	7,6	7112000	32,3
Komplex bez ligandu (předpokl.)	35365	13,7	1484900	6,75
Ostatní	-	-	170359	0,775
Celkem	-	-	21991259	100

Naměřená data naznačuje přítomnost tří významných látek v reakční směsi a poměrně dobrou separaci jednotlivých složek. Předpokládám proto, že tyto píky by měli patřit výchozí látce, tj. nezreagovanému komplexu Ru-Cl, který byl přidán v nadbytku, produktu Ru-dca a organickému zbytku komplexu, který neobsahuje ani chloridový, ani dichloroctový ligand. Vzhledem k velkému zpoždění času na koloně předpokládám že právě třetí pík patří tomuto vedlejšímu produktu, jelikož oproti zbylým dvěma sloučeninám je tato látka méně polární, a proto by měla kolonou projít jako poslední.

Pro ověření, zda se jedná skutečně o výsledný produkt, případně výchozí látku bylo provedeno ještě jedno měření výchozí látky, produktu, reakční směsi a blanku, kterým byl v našem případě MeOH použitý při přípravě reakční směsi, oproti předchozím měřením však byl použit jiný chromatograf i kolona, proto je separace jednotlivých složek rozdílná oproti předchozímu měření a jedná se o kvalitativní informaci o jednotlivých složkách reakční směsi.



Obrázek 9. Výsledek HPLC-UV z přístroje Waters při použití mobilní fáze H₂O/MeOH v poměru 30/70. Modře je vyznačen záznam měření reakční směsi, zeleně záznam měření výchozí látky (Ru-Cl) a šedou barvu má záznam měření produktu (Ru-dca). Z porovnání je zřetelná shoda piků. Rozdílné intenzity jednotlivých vzorků jsou způsobeny rozdílnou koncentrací látek v jednotlivých vzorcích. Jiná míra separace oproti předchozím je pak způsobena použitím odlišné kolony. AU značí absolute units.

Z naměřených dat lze ztotožnit píky jednotlivých složek směsi s měřenými standardy. Vzhledem k výsledkům lze říct, že byl připraven komplex Ru-dca, který lze oddělit pomocí vhodného systému HPLC od výchozího komplexu Ru-Cl

Tabulka 2 Retenční časy jednotlivých píků reakční směsi a k nim přiřazené odpovídající píky čistých látek při separaci na přístroji Waters.

	RT (min.)		
	1.	2.	3.
Reakční směs	1,01	1,35	1,84
Ru-Cl	-	1,32	-
Ru-dca	1,01	-	-

5.6 Metodika pro přípravu radioaktivně značených komplexů

Vzhledem k tomu, že při práci s radioaktivním materiálem platí zvýšená bezpečnostní opatření, je žádoucí, aby celá reakce proběhla v jedné reakční nádobě, jelikož jakákoliv manipulace navíc zvyšuje riziko úniku radiace. V případě přípravy těchto komplexů je tak potřeba, aby veškeré reakční kroky proběhly v reakční nádobě, ve které byla připravena sůl Ag(dca), která je pro reakci stěžejní a jejíž aniont je radioaktivně značený na uhlíku ^{14}C .

Problém při postupu nastal v momentě, kdy příprava soli byla prováděna ve vodě, díky rozpustnosti jednotlivých látek použitých při její přípravě, zatímco samotná reakce probíhá v methanolu. Pokud by se v reakční směsi nacházelo příliš mnoho vody, hrozilo by riziko hydrolyzy komplexu. Vzhledem k tomu, že je sůl pevná látka, případnou filtrací například na fritě by opět hrozilo riziko kontaminace. Jako ideální se proto jeví dvě metody: centrifugace a lyofilizace. V našem případě byla použita lyofilizace, jelikož se jedná o metodu šetrnější a preciznější.

Do 3 ml reakční baňky bylo přidáno NaOH (0.422 mg; 0.0106 mmol; $M = 39.997$; 1.00 mol. ekv.) rozpuštěného v minimálním objemu destilované vody. Následně byla za stálého míchání

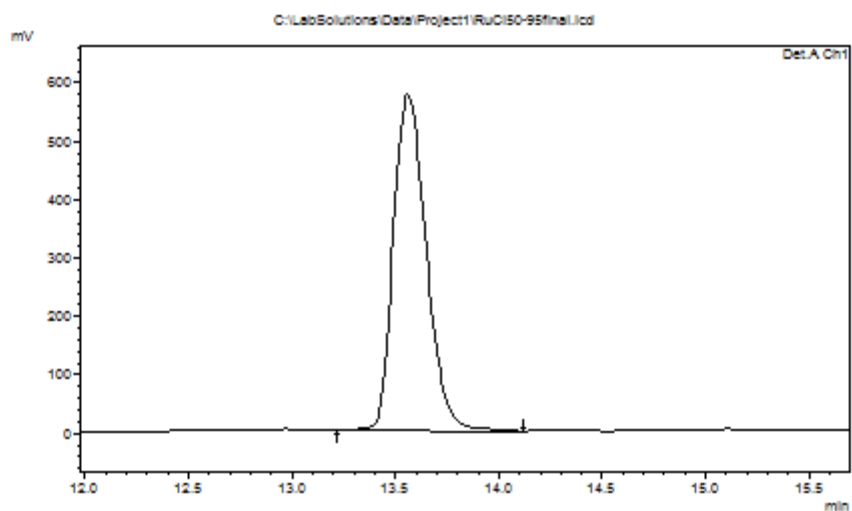
přidána kyselina dichloroctová (1.56 mg; 0.0121 mmol; $M = 128.94$; 1.14 mol ekv.). Za stálého míchání byl k reakční směsi přidán AgNO_3 (1.82 mg; 0.0107 mmol; $M = 169.87$; 1.01 mol ekv.). Došlo ke vzniku jemných částic sraženiny $\text{Ag}(\text{dca})$. Reakční baňka byla přenesena a v lyofilizační aparatuře zbavena vody. Po odstranění vody byl k směsi přidán komplex Ru-Cl (9.52 mg; 0.0127 mmol; $M = 747.04$; 1.19 mol ekv.). Směs byla rozpuštěna ve 2,5 ml MeOH a ponechána k míchání po dobu 24 hodin zakrytá hliníkovou folií, aby byla chráněna před světlem. Po uplynutí 24 hodin bylo míchání vypnuto a směs byla ponechána přes víkend. Po víkendu byl zaznamenán vznik sraženiny na dně reakční baňky. Přes filtr byla část reakční směsi přenesena do vialky, kde byl doplněn MeOH a bylo provedeno měření pomocí HPLC-UV.

5.7 Výsledky

Oproti měření reakční směsi ve větším objemu byla v tomto případě zvolena gradientová eluce namísto isokratické, aby došlo k lepší separaci látek. Výchozí poměr mobilní fáze byl 50/50 MeOH/ H_2O . Tento poměr byl postupně měněn až za 95/5 MeOH/ H_2O . Krom rozdílné metody eluce bylo těž měřeno spektrum při dvou vlnových délkách tj 254 nm a 294 nm. Vzhledem k tomu, že se jednalo o jiné nastavení, byl následně změřen i roztok výchozí látky, tj. Ru-Cl, aby bylo možné ztotožnit píky.

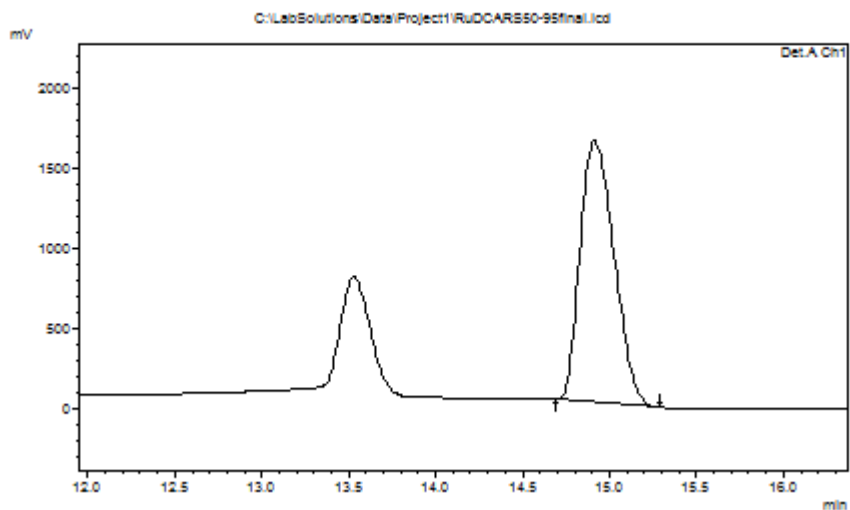
V tomto případě došlo ke vzniku pouze dvou významných píků a to v rozmezí od 12 do 16 minuty, kdy se podíl MeOH v mobilní fázi pohyboval mezi 70 až 90 procenty. Bylo vyhodnoceno, že třetí pík, který se nacházel v předchozí reakční směsi byl způsoben tím, že reakční směs kvůli technickým problémům s HPLC stála dlouhou dobu a mohlo tak dojít k degradaci produktu. V tomto případě, kdy byla měřená směs čerstvě připravena, však tento pík naprosto chybí.

<Chromatogram>



Obrázek 10 Výsledek HPLC-UV výchozí látky Ru-Cl na přístroji Shimadzu za využití gradientové eluce.

<Chromatogram>



Obrázek 11 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu za využití gradientové eluce.

Tabulka 3 Výsledné hodnoty retenčních časů a počátečních časů jednotlivých píků HPLC-UV pro reakční směs a jejich porovnání s časy čistého Ru-Cl. Součástí jsou též relativní plochy píků u reakční směsi.

	RT (min)	IT (min)	FT (min)	Plocha rel.
Ru-Cl (vz.)	13.557	13.217	14.117	-
Ru-Cl (RS)	13.526	13.310	13.892	11294771
Ru-dca (RS)	14.910	14.692	15.292	22208731

6. Diskuse

Z výsledků měření vyplývá, že v reakční směsi se nacházejí dvě významné látky. Bylo předpokládáno, že se jedná o Ru-Cl a Ru-dca. Jelikož nebylo zřejmé, který pík patří, které látce, byla proměřena čistá výchozí látka Ru-Cl. Vzhledem ke shodě retenčních časů Ru-Cl a prvního píku reakční směsi lze s velkou pravděpodobností říct, že se jedná o výchozí látku Ru-Cl, která byla do reakční směsi přidána v nadbytku. Druhý pík tak náleží cílovému komplexu Ru-dca tj. našemu cílovému produktu, jež jsme se snažili připravit. Z výsledných relativních ploch je zřejmé, že množství produktu v reakční směsi je téměř 2x vyšší než množství výchozí látky. Vzhledem k tomu, že nebyla v reakční směsi zjištěna přítomnost dichloroctové kyseliny ani zbytkového stříbra, lze předpokládat, že veškerá kyselina zreagovala a stříbrné ionty se za vzniku sraženiny AgCl sedimentovaly na dně reakční nádoby. Vzhledem k malému množství připraveného komplexu Os-Cl nebylo možné provést analogickou reakci, jelikož množství komplexu by nestačilo k provedení reakce.

Přestože nebyla reakce provedena na komplexech obou kovů, jsou výsledky získané s komplexem Ru-dca velmi přesvědčivé, lze proto říct, že tato metoda přípravy, která probíhá celou dobu v jedné reakční nádobě je dobře proveditelná a poskytuje dobrou míru konverze. Během reakce bohužel nebylo možné s jistotou stanovit výtěžek, jelikož i přes znalost množství vstupních látek se produkt nachází stále v rozpouštědle. Oproti článkům, které tyto komplexy popisují tak nebylo možné tuto metriku stanovit. Tyto články se totiž zabývají spíše samotnou přípravou a vysrážením výsledných produktů. Pro tyto účely je vhodnější měření pomocí MS.³⁶ V tomto případě bylo cílem optimalizovat reakci tak, aby došlo k úplnému zreagování kyseliny dichloroctové. Proto bylo použítí metody HPLC-UV vhodnější.



Obrázek 12 Reakční směs komplexů Ruthenia. Na dně reakční nádoby je zřejmá sraženina AgCl.

7. Závěr

V teoretické části byl shrnut obecný pohled na vznik nádorových onemocnění z hlediska buněčného cyklu, role karcinogenů ve vzniku těchto onemocnění a přehled možných přístupů k léčbě pacientů. Dále byly v této části shrnuty poznatky ohledně sloučenin ruthenia, osmia a potenciální využití sloučenin mědi. Byla shrnuta jejich role, jakožto potenciálních náhradníků za sloučeniny platiny, jelikož vykazují vyšší specifitu a nižší toxicitu. Zároveň byl diskutován jejich mechanismus účinku, možná využití a výsledky klinických studií, které se například v případě látky KP1019 jeví jako slibné. Byl shrnut mechanismus účinku platinových komplexů, jejich schopnost změny konformace DNA díky své vazbě na dusíkaté báze v molekule DNA. U sloučenin osmia a ruthenia byla naopak diskutována jejich pestrá škála oxidačních stavů a s tím související schopnost tvorby ROS. Byla též zmíněna zvýšená kumulace ruthenia v nádorových buňkách jako významná vlastnost, která se při vývoji potenciálních léčiv dá uplatnit.

V praktické části jsem optimalizoval přípravu komplexů Ru-dca a Os-dca tak, aby bylo možné tyto komplexy připravit s radioaktivně značenou kyselinou dichloroctovou, díky čemuž lze v budoucnu pozorovat pohyb kyseliny dichloroctové a komplexu v rámci buňky, což může napomoci přesnějšímu stanovení mechanismus účinku těchto komplexů. V úvodu byla shrnuta role dichloroctové kyseliny při inhibici PDK a potlačení Warburgova jevu. Během přípravy komplexu Ru-dca bylo dosaženo uspokojivé konverze z výchozího komplexu Ru-Cl a Ag(dca) a to jak ve větším měřítku, tak v menším množství, kde bylo dosaženo syntézy, která zahrnovala minimální manipulaci se vzorkem a pouze jednu reakční nádobu jak pro přípravu stříbrné soli, tak pro samotnou reakci s komplexem Ru-Cl. Zajímavým prvkem v této syntéze bylo použití lyofilizace k odstranění nežádoucí vody z reakční nádoby, aniž by došlo k narušení reakce. Tento krok se ukázal být velmi užitečným, a to díky vysoké účinnosti a šetrnosti.

Průběh obou reakcí byl měřen pomocí HPLC s UV detektorem a na základě shody retenčních časů jednotlivých píků v reakčních směsích s čistými vzorky bylo stanoveno, že se skutečně požadované komplexy ruthenia podařilo připravit. Bohužel, jak už bylo několikrát zmíněno, pro přípravu komplexu Os-dca nebylo k dispozici dostatečné množství Os-Cl jakožto prekurzoru.

Celkově si tato práce kladla za cíl pochopení významu komplexů ruthenia a osmia jakožto potenciálních alternativ sloučenin platiny v léčbě nádorových onemocnění. Provedené syntézy popsané v této reakci mohou pomoci při studiu biologické aktivity daných komplexů, zvláště pak při použití radioaktivního značení, které napomůže lepšímu pozorování daných sloučenin v buněčném prostředí.

8. Seznam použité literatury

- (1) *Cancer Today*. <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed 2025-03-22).
- (2) *Den boje proti rakovině a statistiky ÚZIS ČR - Aktuality - ÚZIS ČR*.
<https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8466> (accessed 2025-03-22).
- (3) Sandison, A. T. The First Recorded Case of Inflammatory Mastitis--Queen Atossa of Persia and the Physician Democedes. *Med. Hist.* **1959**, 3 (4), 317–322.
<https://doi.org/10.1017/s0025727300024820>.
- (4) Snustad, D. P.; Simmons, M. J. *Genetika*, Druhé, aktualizované vydání.; Relichová, J., Ed.; Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., Knoll, A., Kuglík, P., Šmarda, J., Šmardová, J., Veselská, R., Vyskot, B., Translators; Masarykova univerzita: Brno, 2017.
- (5) Rous, P. A TRANSMISSIBLE AVIAN NEOPLASM. (SARCOMA OF THE COMMON FOWL.). *J. Exp. Med.* **1910**, 12 (5), 696–705. <https://doi.org/10.1084/jem.12.5.696>.
- (6) *List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans*. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications> (accessed 2024-11-20).
- (7) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1999.
- (8) *IARC Monographs Preamble – Preamble to the IARC Monographs (amended January 2019) – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans*. <https://monographs.iarc.who.int/iarc-monographs-preamble-preamble-to-the-iarc-monographs/> (accessed 2024-11-20).
- (9) Büchler, T. *Klinická onkologie*; Maxdorf: Praha, 2023.
- (10) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Slíva, J. *Barevný atlas farmakologie*, 5. české vydání.; Grada Publishing: Praha, 2020.
- (11) *karmustin (účinná látka) » Linkos.cz*. <https://www.linkos.cz/slovnicek/karmustin-ucinna-latka/> (accessed 2024-11-20).
- (12) *cyklofosfamid (účinná látka) » Linkos.cz*.
<https://www.linkos.cz/slovnicek/cyklofosfamid-ucinna-latka/> (accessed 2024-11-20).
- (13) Ebers, G. Papyrus Ebers: Das Hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift. **1875**. <https://doi.org/10.11588/DIGLIT.22>.

- (14) Hughes, M. F.; Beck, B. D.; Chen, Y.; Lewis, A. S.; Thomas, D. J. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicol. Sci.* **2011**, *123* (2), 305–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>.
- (15) Williams, K. The Introduction of ‘Chemotherapy’ Using Arsphenamine – the First Magic Bullet. *J. R. Soc. Med.* **2009**, *102* (8), 343–348. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.09k036>.
- (16) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- (17) Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (35), 8113. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>.
- (18) Zhou, N.; Zhao, Y.; Zhai, L.; Ruan, C.; Yang, Y.; Huang, Y.; Hou, X.; Chen, L.; Zhou, T.; Zhang, L. The Efficacy and Toxicity of Lobaplatin-Contained Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *J. Cancer* **2018**, *9* (13), 2232–2236. <https://doi.org/10.7150/jca.24557>.
- (19) Elmorsy, E. A.; Saber, S.; Hamad, R. S.; Abdel-Reheim, M. A.; El-kott, A. F.; ALShehri, M. A.; Morsy, K.; Salama, S. A.; Youssef, M. E. Advances in Understanding Cisplatin-Induced Toxicity: Molecular Mechanisms and Protective Strategies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2024**, *203*, 106939. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106939>.
- (20) Grasso, G.; Santoro, A. M.; Magrì, A.; La Mendola, D.; Tomasello, M. F.; Zimbone, S.; Rizzarelli, E. The Inorganic Perspective of VEGF: Interactions of Cu²⁺ with Peptides Encompassing a Recognition Domain of the VEGF Receptor. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *159*, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.03.004>.
- (21) Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr. Rev.* **1997**, *18* (1), 4–25. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0287>.
- (22) Patstone, G.; Maher, P. Copper and Calcium Binding Motifs in the Extracellular Domains of Fibroblast Growth Factor Receptors. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (7), 3343–3346. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3343>.
- (23) Gaur, K.; Vázquez-Salgado, A. M.; Duran-Camacho, G.; Dominguez-Martinez, I.; Benjamín-Rivera, J. A.; Fernández-Vega, L.; Sarabia, L. C.; García, A. C.; Pérez-Deliz, F.; Méndez Román, J. A.; Vega-Cartagena, M.; Loza-Rosas, S. A.; Acevedo, X. R.; Tinoco, A. D. Iron and Copper Intracellular Chelation as an Anticancer Drug Strategy. *Inorganics* **2018**, *6* (4), 126. <https://doi.org/10.3390/inorganics6040126>.

- (24) Antoniadou, V.; Sioga, A.; Dietrich, E. M.; Meditskou, S.; Ekonomou, L.; Antoniadou, K. Is Copper Chelation an Effective Anti-Angiogenic Strategy for Cancer Treatment? *Med. Hypotheses* **2013**, *81* (6), 1159–1163. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.09.035>.
- (25) Milunović, M. N. M.; Palamarciuc, O.; Sirbu, A.; Shova, S.; Dumitrescu, D.; Dvoranová, D.; Rapta, P.; Petrasheuskaya, T. V.; Enyedy, E. A.; Spengler, G.; Ilic, M.; Sitte, H. H.; Lubec, G.; Arion, V. B. Insight into the Anticancer Activity of Copper(II) 5-Methylenetrithiomethylammonium-Thiosemicarbazones and Their Interaction with Organic Cation Transporters. *Biomolecules* **2020**, *10* (9), 1213. <https://doi.org/10.3390/biom10091213>.
- (26) Sîrbu, A.; Palamarciuc, O.; Babak, M. V.; Lim, J. M.; Ohui, K.; Enyedy, E. A.; Shova, S.; Darvasiová, D.; Rapta, P.; Ang, W. H.; Arion, V. B. Copper(II) Thiosemicarbazone Complexes Induce Marked ROS Accumulation and Promote Nrf2-Mediated Antioxidant Response in Highly Resistant Breast Cancer Cells. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (12), 3833–3847. <https://doi.org/10.1039/C7DT00283A>.
- (27) Sava, G.; Bergamo, A. Ruthenium-Based Compounds and Tumour Growth Control (Review). *Int. J. Oncol.* **2000**. <https://doi.org/10.3892/ijo.17.2.353>.
- (28) Reedijk, J. New Clues for Platinum Antitumor Chemistry: Kinetically Controlled Metal Binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (7), 3611–3616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737293100>.
- (29) Yamada, H.; Koike, T.; Hurst, J. K. Water Exchange Rates in the Diruthenium μ -Oxo Ion *Cis, Cis* -[(Bpy)₂Ru(OH₂)]₂O⁴⁺. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12775–12780. <https://doi.org/10.1021/ja010594l>.
- (30) Pongratz, M.; Schluga, P.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Allmaier, G.; Keppler, B. K. Transferrin Binding and Transferrin-Mediated Cellular Uptake of the Ruthenium Coordination Compound KP1019, Studied by Means of AAS, ESI-MS and CD Spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19* (1), 46. <https://doi.org/10.1039/b309160k>.
- (31) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (10), 2140–2155. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890195>.

- (32) Bergamo, A.; Sava, G. Linking the Future of Anticancer Metal-Complexes to the Therapy of Tumour Metastases. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/C5CS00134J>.
- (33) *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*, 4th ed.; Gold, V., Ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, NC, 2019. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- (34) Chen, Q.; Ramu, V.; Aydar, Y.; Groenewoud, A.; Zhou, X.-Q.; Jager, M. J.; Cole, H.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A.; Bonnet, S.; Snaar-Jagalska, B. E. TLD1433 Photosensitizer Inhibits Conjunctival Melanoma Cells in Zebrafish Ectopic and Orthotopic Tumour Models. *Cancers* **2020**, *12* (3), 587. <https://doi.org/10.3390/cancers12030587>.
- (35) Păunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Clavel, C. M.; Scopelliti, R.; Griffioen, A. W.; Dyson, P. J. Anticancer Organometallic Osmium(II)- *p* -cymene Complexes. *ChemMedChem* **2015**, *10* (9), 1539–1547. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500221>.
- (36) Pracharova, J.; Novohradsky, V.; Kostrhunova, H.; Štarha, P.; Trávníček, Z.; Kasparkova, J.; Brabec, V. Half-Sandwich Os(II) and Ru(II) Bathophenanthroline Complexes: Anticancer Drug Candidates with Unusual Potency and a Cellular Activity Profile in Highly Invasive Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (35), 12197–12208. <https://doi.org/10.1039/C8DT02236D>.
- (37) Hanif, M.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G. Development of Anticancer Agents: Wizardry with Osmium. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (10), 1640–1648. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.016>.
- (38) Stepanenko, I.; Zalibera, M.; Schaniel, D.; Telsler, J.; Arion, V. B. Ruthenium-Nitrosyl Complexes as NO-Releasing Molecules, Potential Anticancer Drugs, and Photoswitches Based on Linkage Isomerism. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (14), 5367–5393. <https://doi.org/10.1039/D2DT00290F>.
- (39) Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* **1924**, *12* (50), 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>.
- (40) Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8* (6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
- (41) Michelakis, E. D.; Webster, L.; Mackey, J. R. Dichloroacetate (DCA) as a Potential Metabolic-Targeting Therapy for Cancer. *Br. J. Cancer* **2008**, *99* (7), 989–994. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604554>.

9. Seznam obrázků

Obrázek 1 Přehled schválených cytostatik na bázi platiny používaných v různých částech světa. (Jin et al., 2021)	14
Obrázek 2 Mechanismus působení cisplatiny v buňce (Johnstone et al. 2015)	15
Obrázek 3 Strukturní vzorec komplexu KP1019	20
Obrázek 4 Strukturní vzorec komplexu NAMI-A	20
Obrázek 5 Strukturní vzorec komplexu TLD-1433	22
Obrázek 6 Výsledky TLC dle různých mobilních fází na silikagelových destičkách. Byla testována pohyblivost výchozí látky (Cl), Produktu (DCA či D) a reakční směsi (RS či R). Testován byl poměr methanolu a chloroformu 10/90 (A), 5/95 (B), 7,5/92,5 (C). Následně byla otestována reakční směs v systému methanol/chloroform 5/95 (D). Černé tečky na startu jsou způsobeny s největší pravděpodobností tím, že dichloroctová kyselina narušila strukturu silikagelu.	28
Obrázek 7 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu při použití mobilní fáze H ₂ O/MeOH v poměru 10/90. Je zde vidět, že nedošlo k příliš dobré separaci jednotlivých látek.	29
Obrázek 8 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu při použití mobilní fáze H ₂ O/MeOH v poměru 30/70. Je zde vidět, mnohem lepší separace jednotlivých látek a tři významné píky, které náleží Ru-dca, Ru-Cl a vedlejšího produktu, který neobsahuje ani jeden ze dvou pro tuto práci významných ligandů.	30
Obrázek 9. Výsledek HPLC-UV z přístroje Waters při použití mobilní fáze H ₂ O/MeOH v poměru 30/70. Modře je vyznačen záznam měření reakční směsi, zeleně záznam měření výchozí látky (Ru-Cl) a šedou barvu má záznam měření produktu (Ru-dca). Z porovnání je zřetelná shoda píků. Rozdílné intenzity jednotlivých vzorků jsou způsobeny rozdílnou koncentrací látek v jednotlivých vzorcích. Jiná míra separace oproti předchozím je pak způsobena použitím odlišné kolony. AU značí absolute units.	32
Obrázek 10 Výsledek HPLC-UV výchozí látky Ru-Cl na přístroji Shimadzu za využití gradientové eluce.....	35
Obrázek 11 Výsledek HPLC-UV reakční směsi na přístroji Shimadzu za využití gradientové eluce.	35

Obrázek 12 Reakční směs komplexů Ruthenia. Na dně reakční nádoby je zřejmá sraženina AgCl. 37

10. Seznam Tabulek

Tabulka 1 Retenční časy jednotlivých složek reakční směsi RT v minutách, maximální intenzity jednotlivých píků a plocha píků a z nich vypočtené procentuální zastoupení jednotlivých složek v reakční směsi.....	31
Tabulka 2 Retenční časy jednotlivých píků reakční směsi a k nim přiřazené odpovídající píky čistých látek při separaci na přístroji Waters.	33
Tabulka 3 Výsledné hodnoty retenčních časů a počátečních časů jednotlivých píků HPLC-UV pro reakční směs a jejich porovnání s časy čistého Ru-Cl. Součástí jsou též relativní plochy píků u reakční směsi.	36