

**Univerzita Palackého v Olomouci**



Přírodovědecká fakulta  
Katedra anorganické chemie

**Diplomová práce**

**Syntéza a studium komplexních sloučenin  
Co(III) a pentadentátních Schiffových bází a  
studium jejich protinádorové aktivity**

Vypracoval: Bc. Stanislav Kučera

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioanorganická chemie

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Stanislav Kučera
Název práce:	Syntéza a studium komplexních sloučenin Co(III) a pentadentátních Schiffových bází a studium jejich protinádorové aktivity
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.
Jazyk:	Čeština
Počet stran:	71

**Abstrakt:** Teoretická část této diplomové práce se zaměřuje na biologickou roli kobaltu v živých systémech, jeho zastoupení ve vitamínu B<sub>12</sub> a v enzymech a na úlohu kobaltu v různých onemocněních. Je zde probírána problematika kobaltitých komplexů, které vykazují zajímavé biologické vlastnosti, se zaměřením na kobaltité komplexy jakožto léčiva a hypoxicky aktivovaná léčiva.

V praktické části je popsána syntéza 20 komplexních sloučenin obecného vzorce [Co(L5)(L1)] či [Co(L5)(L1')](NO<sub>3</sub>), kdy H<sub>2</sub>L5 je Schiffova báze, L1<sup>-</sup> je halogenidový, pseudohalogenidový či karboxylátový ligand a L1' je N-donorový heterocyklický elektroneutrální ligand. Dále jsou zde popsány a interpretovány výsledky provedených analýz a studií. Připravené látky byly studovány pomocí elementární analýzy, infračervené a UV/Vis spektroskopie, monokrystalové rentgenové strukturní analýzy a také pomocí metod termické analýzy. Připravené komplexy byly zkoumány též pomocí cyklické voltametrie a u dvou vybraných komplexů bylo také provedeno stanovení *in vitro* cytotoxické aktivity na několika nádorových buněčných liniích (MCF7 - prsní karcinom; PANC-1 - karcinom slinivky břišní; HT29 - kolorektální adenokarcinom; MRC5 - plicní fibroblast; A2780 - karcinom vaječníku a A2780R - karcinom vaječníku rezistentní na cisplatinu). Výsledky těchto analýz pomohly stanovit strukturu připravených látek. Z výsledků *in vitro* testování projevil nejzajímavější výsledky jeden z komplexů, jehož IC<sub>50</sub> dosahovala hodnot 14,4±2,1 μM proti buňkám karcinomu vaječníku A2780 (IC<sub>50</sub> = 18,0±2,5 μM pro cisplatinu).

**Klíčová slova:** Kobalt, kobaltité komplexy, Schiffovy báze, hypoxie, prekurzory léčiv, cytotoxicita, syntéza, charakterizace.

## Bibliographic identification

Author's first name and surname: Bc. Stanislav Kučera

Thesis title: Synthesis and characterization of Co(III) complexes with pentadentate Schiff bases and study on their anticancer activity

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Language: Czech

Number of pages: 71

**Abstract:** Theoretical chapter of this diploma thesis is focused on biological role of cobalt in living organisms, in vitamin B<sub>12</sub> and enzymes, and its part in occurrence of various diseases. It also reports on coordination compounds of cobalt(III) with significant biological properties, with emphasis on cobalt(III) complexes as drugs and hypoxia-activated prodrugs.

Experimental part describes the synthesis of 20 coordination compounds with general formula [Co(L<sub>5</sub>)(L<sub>1</sub>)] or [Co(L<sub>5</sub>)(L<sub>1</sub>')](NO<sub>3</sub>), where H<sub>2</sub>L<sub>5</sub> is Schiff base, L<sub>1</sub><sup>-</sup> is halogenido, pseudohalogenido or carboxylate ligand. Next part describes and discusses results of physico-chemical analyses and studies. All prepared compounds were characterized by elemental analysis, infrared and UV/Vis spectroscopy. Selected compounds were studied by single-crystal X-ray diffraction and thermal analysis. Prepared complexes were also studied by cyclic voltammetry and two selected compounds were tested for their *in vitro* cytotoxic activity on several cancer cell lines (MCF7 - breast cancer; PANC-1 - pancreas carcinoma; HT29 - colorectal adenocarcinoma; MRC5 - lung fibroblast; A2780 - ovarian carcinoma and A2780R - cisplatin-resistant ovarian carcinoma). The most interesting results of *in vitro* tests exhibited one of the complexes with IC<sub>50</sub> of 14,4±2,1 μM against ovarian carcinoma cells A2780 (IC<sub>50</sub> = 18,0±2,5 μM for cisplatin).

**Keywords:** Cobalt, cobalt(III) coordination compounds, Schiff base, hypoxia, prodrug, cytotoxicity, synthesis, characterization.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci *Syntéza a studium komplexních sloučenin Co(III) a pentadentálních Schiffových bází a studium jejich protinádorové aktivity* sepsal samostatně pod odborným vedením Ing. Ivana Nemce, PhD. a použil zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Chtěl bych zde poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ivanu Nemcovi, Ph.D. za odborné rady a cenné připomínky, za trpělivost a čas vložený do řešení problémů a za vyřešení krystalových struktur připravených látek. Také bych rád poděkoval doc. Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D. za pomoc při měření spekter UV/Vis a za cenné rady při řešení problematiky protinádorového studia komplexů. Díky patří také RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D. za pomoc s měřením cyklické voltametrie a poskytnuté rady, Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za změření infračervené spektroskopie, Mgr. Peterovi Antalovi, Ph.D. za provedení termické analýzy, Mgr. Kateřině Kubešové, DiS. za provedení testování *in vitro* cytotoxické aktivity připravených komplexů, a paní Pavle Richterové za měření elementární analýzy. Rád bych také poděkoval prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky a za možnost vytvoření této práce na půdě katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Poděkování patří také projektům a grantům NPU LO1305, PrF\_2016\_007 a PrF\_2017\_018 za financování. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

# Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	8
2. Kobalt.....	10
2.1 Vlastnosti.....	10
2.2 Biologický význam.....	11
2.3 Kobalamin.....	13
2.3.1 Vitamery kobalaminu a role v organismu.....	14
2.3.2 Deficience kobalaminu.....	18
2.4 Další proteiny a enzymy obsahující kobalt.....	20
3. Biologicky zajímavé Co(III) komplexy.....	25
3.1 Co(III) komplexy jako prekurzory léčiv.....	26
3.1.1 Co(III) komplexy s dusíkatými yperity.....	27
3.1.2 Co(III) komplexy s bioaktivními ligandy.....	30
3.1.3 Co(III) komplexy s fluorofory.....	33
3.2 Další Co(III) komplexy s biologickou aktivitou.....	35
4. Praktická část.....	39
4.1. Použité chemikálie, instrumentace a podmínky.....	39
4.2 Syntéza ligandů.....	40
4.3 Syntéza komplexů.....	40
4.4 Syntéza přes tetraedrické komplexy Co(II).....	42
4.5 Další provedené syntézy.....	43
5. Výsledky a diskuze.....	44
5.1 Získaná data.....	44
5.2 Výsledky spektrálních, elektrochemických a termických analýz.....	52
5.3 Výsledky stanovení <i>in vitro</i> protinádorové aktivity.....	60

6. Závěr.....	63
7. Literatura.....	65

# 1. Úvod a cíle práce

Pole zájmu bioanorganické chemie je velmi široké a dotýká se mnoha jiných oborů či disciplín. Počátek jejího rozvoje v moderní době je spojen zřejmě s objevem cisplatiny, léčiva, které nalézá v protinádorové terapii uplatnění dodnes. Nezbytnou součástí tohoto odvětví chemie je také výzkum orientovaný na další biogenní přechodné prvky a komplexy od nich odvozené. Ty mohou vykazovat zajímavé vlastnosti a potenciálně využitelnou biologickou aktivitu, díky níž se nabízí možnost jejich uplatnění v medicíně při léčbě mnoha nemocí či jejich diagnostice.

Hlavní zastoupení chemie v lékařství leželo dlouho zejména v rukou chemie organické. S objevem možných aplikací koordinačních sloučenin a s rozvojem moderních technologií a přístrojů se však toto odvětví medicíny začalo rozrůstat o další oblasti. Důležité funkce, které plní kovové esenciální prvky v organismech, vedly k zaměření studia na tyto mikroprvky a komplexy z nich vycházející. Jako samotné ligandy se mnohdy využívají látky, které samy vykazují určitý stupeň biologické aktivity, nebo již našly uplatnění v léčbě některých chorob. Jednou z možných aplikací koordinačních sloučenin na bázi kovů je umožnění či usnadnění transportu takovýchto ligandů a léčiv na určité cílové místo v organismu nebo buňce, kde tyto látky mohou poté specificky uplatňovat své vlastnosti.<sup>1</sup>

Jedním z takových esenciálních mikroprvků je i kobalt - nalezneme jej u všech živých tvorů. Známý je především díky svému zastoupení ve vitamínu B<sub>12</sub>, kde sehrává klíčové role v mnoha funkcích organismu. Vzhledem k tomu, že se tedy jedná o kov tělu vlastní, mohly by poté jeho sloučeniny vykazovat nižší nespecifickou toxicitu ve srovnání s komplexy kovů neesenciálních.<sup>1</sup>

Jedním z cílů této diplomové práce je zpracování literární rešerše, jež se týká významu a zastoupení kobaltu v organismech, kobaltitých komplexů se zajímavou biologickou aktivitou a také použitých ligandů v takovýchto koordinačních sloučeninách.

První část této práce se tedy zabývá kobaltem, jeho vlastnostmi a biologickým významem, který dále přechází v jeho důležitost v podobě kobalaminu. Zvláštní pozornost je věnována roli kobalaminu v organismu, problémům spojeným s jeho deficiencí, a také jiným biomolekulám, ve kterých je možno nalézt atomy kobaltu.

Následující oddíl probírá kobaltité komplexy, jež vykazují zajímavé terapeutické vlastnosti. Hlavní část zde představují kobaltité komplexy vystupující jako prekurzory léčiv aktivované hypoxií, schopné doručovat různé ligandy na místo působení. Pozornost je



věnována také dalším koordinačním sloučeninám odvozeným od Co(III), jež vykazují slibné medicínské vlastnosti.

Dalším ze záměrů této práce je syntéza kobaltitých komplexů o složení  $[\text{Co}(\text{L}_5)(\text{L}_1)]$  s monodentátními halogenido/pseudohalogenido či heterocyklickými ligandy (L1) a s pentadentátními Schiffovými bázemi ( $\text{H}_2\text{L}_5$ ). Následujícím krokem je poté charakterizace takto získaných sloučenin pomocí dostupných analytických metod, provedení stanovení jejich biologické aktivity, a také následná interpretace získaných výsledků.

V dalším segmentu této práce jsou tedy popsány materiály a metody použité při syntéze a charakterizaci těchto látek. Dále je popisována syntéza ligandů, postupy použité při přípravě samotných komplexů a také jsou okomentovány další uskutečněné syntézy.

Poslední oddíl uvádí získané výsledky a data, které jsou interpretovány a komentovány. Zásadami pro vypracování této práce tedy jsou:

- Vypracování literární rešerše týkající se kobaltitých komplexů s biologickou aktivitou, významu kobaltu v organismech a použitých ligandů v biologicky zajímavých kobaltitých komplexech.
- Příprava kobaltitých komplexů složení  $[\text{Co}(\text{L}_5)(\text{L}_1)]$  s monodentátními halogenido/pseudohalogenido anebo heterocyklickými ligandy (L1) a s pentadentátními Schiffovými bázemi ( $\text{H}_2\text{L}_5$ ).
- Charakterizace připravených sloučenin dostupnými analytickými metodami a provedení stanovení jejich biologické aktivity ve spolupráci s vedoucím práce a dalšími zaměstnanci katedry anorganické chemie.
- Interpretace získaných výsledků.
- Zpracování výsledků formou diplomové práce

## 2. Kobalt

### 2.1 Vlastnosti

Kobalt je šedobílý lesklý kov s protonovým číslem 27 a patří do osmé vedlejší podskupiny periodické soustavy prvků. Spolu se železem a niklem jej řadíme do triády železa. Jedná se o tvrdý kov, který se vyznačuje feromagnetickými vlastnostmi. Uplatňuje se zejména v ocelářském průmyslu, kdy slouží jako složka nástrojových ocelí pro přístroje na obrábění kovů, u kterých jsou vyžadovány specifické mechanické vlastnosti jako pevnost, tvrdost a odolnost. Společně s wolframem je kovový kobalt hlavní složkou tvrdokovů, jež se uplatňují ve strojírenství ve výrobě součástí s vysokou tvrdostí a otěruvzdorností. Kobalt se též využívá při galvanickém pokovování, při barvení skla a keramiky a také při výrobě silných permanentních magnetů. Kobalt nalzáme ve dvou modifikacích - jako hexagonální  $\alpha$ -Co, jež se při 417 °C mění na kubický  $\beta$ -Co. V přírodě jej nacházíme převážně společně s niklem a arsenem, a to zejména ve sloučeninách jako kobaltin CoAsS, smaltin CoAs<sub>2</sub> či linnéit Co<sub>3</sub>S<sub>4</sub>. V ryzím stavu lze kobalt objevit v železných meteoritech v zastoupení 0,5-2,5%. V zemské kůře je jeho průměrný obsah přibližně 25 mg/kg, díky čemuž se řadí na 30. místo v prvkovém zastoupení na zemi. Co se týče vlastností chemických, je podobný železu. V kyselinách se rozpouští obtížněji než železo, koncentrovaná HNO<sub>3</sub> jej pasivuje podobně jako železo, zatímco ve zředěné HNO<sub>3</sub> se rozpouští. Při běžné teplotě je kobalt stálý, v jemně rozptýleném stavu projevuje pyroforické vlastnosti a při vyšší teplotě reaguje s halogeny, uhlíkem, fosforem, sírou a kyslíkem. Elektronová konfigurace kobaltu je [Ar] 3d<sup>7</sup> 4s<sup>2</sup>. Nejstabilnějšími oxidačními stupni kobaltu tedy jsou +II a +III, známy jsou však sloučeniny v oxidačních stavech od -I do +IV. Mnoho jednoduchých solí kobaltu je odvozeno od oxidačního stavu II, zatímco s Co(III) známe jen několik solí, které navíc snadno podléhají redukci.<sup>2</sup>

V tomto oxidačním stupni však vytváří mnoho komplexů, zejména pak s *N*-donorovými, ale také s *O*- a *S*-donorovými ligandy. Komplexy Co(III) jsou téměř bez výjimky diamagnetické, nízkospinové (d<sup>6</sup>) a oktaedrické. Vyznačují se také značnou stabilitou - jsou kineticky inertní. Dobře známé jsou kyanokomplexy, nitrokomplexy nebo také jedny z prvních studovaných koordinačních sloučenin, aminokomplexy Co(III).<sup>3</sup>

## 2.2 Biologický význam

Kobalt je ultrastopový kovový prvek, který je esenciální pro všechny živočichy. V proteinech se kovy jako takové vyskytují poměrně často, kdy mnohdy sehrávají důležité role v jejich funkcích - účastní se přenosu elektronů či kyslíku, regulace genů nebo stabilizují jejich strukturu. Více než 30% strukturně charakterizovaných proteinů obsahuje alespoň jeden kovový ion. V takovýchto proteinech se však kobalt vyskytuje méně často než jiné biologicky významné kovy - přibližně v 1%. To může být zapříčiněno malým zastoupením tohoto prvku v přírodě v porovnání se železem, manganem či mědí a zinkem, ale také kompeticí kobaltu se železem, mezi jehož biologicky důležité funkce spadá dýchání či fotosyntéza. V úvahu je také třeba vzít toxické vlastnosti redoxně aktivního kobaltu v živých buňkách.<sup>4</sup>

Kobalt v živých organismech je nejznámější díky svému zastoupení v tetrapyrrolové korrinoidní prostetické skupině, kde vystupuje jako aktivní centrum v této skupině koenzymů, zvaných kobalaminy. Jedná se o několik chemických podob vitamínu B<sub>12</sub>. Metaloenzymy obsahující korrinoidní skupinu se vyskytují u prokaryot i u eukaryot a jsou zodpovědné za katalýzu mnoha biologicky významných reakcí. V nekorrinoidních metaloenzymech je kobalt znám v podstatně menší míře.<sup>5</sup> V těle dospělého člověka se nachází přibližně 1 mg kobaltu, z toho 85% je v podobě vitamínu B<sub>12</sub>. Denní příjem kobaltu u lidí činí asi 5-50 µg, přičemž většina takto získaného kobaltu je v podobě anorganických solí a vitamín B<sub>12</sub> tvoří jen malou část. Orální biodostupnost poté záleží na rozpustnosti dané sloučeniny kobaltu a pohybuje se mezi 5-45%. V potravě kobalt nalezneme v největší míře v mléku a mléčných produktech, v rybách a plodech moře, ale také například v čokoládě.<sup>6</sup>

Jako všechny redoxně aktivní přechodné prvky, tak i ionty kobaltu jsou značně toxické vůči živým buňkám. U lidí je toxicita kobaltu nejčastěji spojována s chorobami jako kontaktní dermatitida, zápal plic, alergické astma nebo rakovina plic.<sup>7</sup> Redoxně aktivní ion kobaltu také katalyzuje tvorbu reaktivních kyslíkových částic (ROS), což může vést k oxidativnímu poškození proteinů, lipidů či DNA.<sup>8</sup> Toxicita kobaltu ale také výrazně vyvstává z jeho možné kompetice s jinými biologicky významnými kovy, kdy vazba atomu kobaltu s biologicky důležitou makromolekulou zabrání navázání správného atomu kovu, což vede k inhibici funkce takovéto makromolekuly. Nejčastějším případem je kompetice se železem, jelikož oba atomy mají podobný atomový poloměr a také vystupují ve stejných biologicky důležitých oxidačních stavech, tedy +II a +III, což dále usnadňuje možnost nesprávného začlenění kovu do makromolekul. Dalším problémem je také kinetická inertnost kobaltu v oxidačním stupni +III - rychlost ligandové výměny v případě Co<sup>3+</sup> je méně než 10<sup>-6</sup> s<sup>-1</sup>, zatímco u Fe<sup>3+</sup> se jedná o

hodnoty přibližně  $2 \times 10^2$ .<sup>9</sup> Takováto nízká rychlost výměny ligandů u  $\text{Co}^{3+}$  značí, že chybné začlenění kobaltu do biologicky důležité makromolekuly je téměř ireverzibilní, což dále vede k umocnění toxicity.<sup>10</sup> Další možné toxické účinky kobaltu mohou souviset s jeho značnou afinitou k thiolovým skupinám, což může způsobovat inhibici klíčových enzymů, například v procesu buněčného dýchání.<sup>6</sup> Účinky kobaltu mohou být i potenciálně prospěšné, protože například v oxidačním stupni +II aktivuje transkripční faktor indukovaný hypoxií (HIF), jež je přítomen téměř ve všech živočišných buňkách, což vede k mimetice hypoxie a stimulaci tvorby erythropoetinu. To následně podporuje tvorbu červených krvinek a zvyšuje kapacitu červených krvinek při přenosu kyslíku, a tedy napomáhá při ischemických potížích či nedostatečném okysličení tkání. Stejným mechanismem však pravděpodobně také vyvolává nadměrnou odpověď organismu na hypoxii, což v důsledku zřejmě vede k podpoře tvorby a vývoje nádorů.<sup>11</sup>

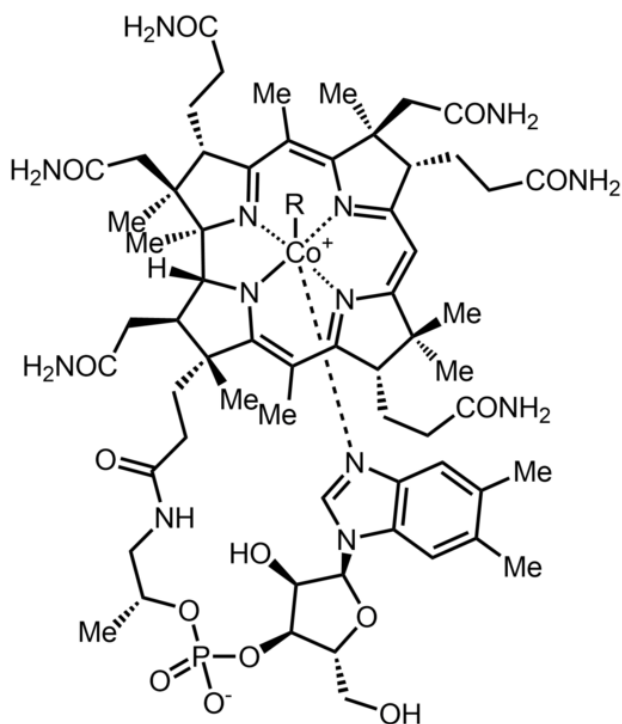
Deficience volného kobaltu v solvatované formě jako takového nebyla u člověka prokázána, jeho nezbytnost tedy zřejmě vyvstává z jeho funkce ve vitamínu  $\text{B}_{12}$ .<sup>12</sup> Zajímavostí však je, že i minimální zastoupení kobaltu v půdě výrazně zlepšuje zdraví pasoucích se zvířat. Enzymy v bakteriích, které se vyskytují v žaludcích přežvýkavců, umožňují přeměnu solí kobaltu ve vitamín  $\text{B}_{12}$ .<sup>13</sup>

Metabolismus kobaltu byl zkoumán u laboratorních zvířat i u člověka. Soli kobaltu rozpustné ve vodě jsou rychle vstřebávány z tenkého střeva, přičemž biodostupnost takto přijatého kobaltu je poté neúplná a závisí na rozpustnosti dané látky, množství a individuálních faktorech. Značné množství kobaltu je také absorbováno skrze plíce při vdechnutí. Tkáňové rozdělení kobaltu ( $\text{Co}^{2+}$ ) a jeho časová závislost bylo studováno na laboratorních zvířatech. Kobalt je akumulován zejména v játrech, ledvinách, slinivce a srdci. Obsah v kostře a kosterních svalech vzrůstá s časem uplynulým po podání kobaltu. Při dlouhodobé expozici kobaltu lze pozorovat jeho zvýšenou koncentraci v krvi, krevním séru a v moči.<sup>14</sup> V krevním séru je kobalt  $\text{Co}^{2+}$  vázán na albumin.<sup>15</sup> V lidských červených krvinkách je membránová transportní dráha pro příjem  $\text{Co}^{2+}$  pravděpodobně sdílena s vápenatými ionty. Tento příjem je prakticky ireverzibilní, protože samotný kobalt není kalciovou pumpou hnán ven. Kobalt je také vázán na globinovou složku hemoglobinu, takže koncentrace volného solvatovaného  $\text{Co}^{2+}$  v cytosolu je přibližně pouze 1% celkové koncentrace.<sup>16</sup>

## 2.3 Kobalamin

Kobalamin či vitamín B<sub>12</sub> (Obr. 1) je ve vodě rozpustná látka, která je jedním z osmi vitamínů B. Sloučeniny v této skupině sehrávají klíčové role v buněčném metabolismu. Patří sem vitamíny B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>3</sub> (niacin), B<sub>5</sub> (kyselina pantothenová), B<sub>6</sub> (pyridoxol, pyridoxal, pyridoxamin), B<sub>7</sub> (biotin), B<sub>9</sub> (kyselina listová, folát) a konečně vitamín B<sub>12</sub> (kobalaminy). Tyto látky jsou také souhrnně označovány jako B-komplex.<sup>17</sup> Kobalamin je skupinové označení pro organokovové kofaktory, v nichž je centrální atom kobaltu ekvatoriálně koordinován čtyřmi pyrrolovými ligandy korrinového systému. Jako pátý ligand vystupuje kovalentně vázaný *N*-substituovaný 5,6-dimethylbenzimidazol. Šestý ligand je pak základem pro klasifikaci těchto látek - rozlišujeme tak několik chemických

forem vitamínu B<sub>12</sub> - kyanokobalamin (CNCbl), hydroxykobalamin (HOCbl), methylkobalamin (MeCbl), a adenosylkobalamin (AdoCbl). Jako enzymaticky aktivní kofaktorové formy vitamínu B<sub>12</sub>, které se přirozeně vyskytují v lidském těle, vystupují adenosylkobalamin a methylkobalamin. Obecně slouží korrinový makrocyklus, podobně jako jiné tetrapyrroly, jako prostředník pro stabilizaci různých oxidačních stavů koordinovaného iontu kovu. Tato vlastnost poté usnadňuje průběh a organizaci složitých biochemických reakcí. Korrinový makrocyklus stabilizuje kobalt v oxidačních stavech +I, +II a +III. Kobalt se v kobalaminech normálně vyskytuje v oxidačním stupni +III, v redukujícím prostředí vznikající vitamíny s kobaltem v oxidačním stavu +II a +I se poté označují jako B<sub>12r</sub> a B<sub>12s</sub> (redukovaný a super redukovaný). Příslušné kobalaminy poté umožňují zprostředkování reakcí jako přenosy elektronů, transmethylace nebo molekulové přesmyky.<sup>10,19</sup> Toxicita kobalaminu je výrazně nižší než samotného volného iontu kobaltu. Korrinový systém, společně s axiálními ligandy, pravděpodobně zabraňuje iontu kobaltu ve vazbě do biologicky významných makromolekul.<sup>10</sup>



**Obr. 1:** Kobalamin;

R = CN, OH, Me, 5'-deoxyadenosyl<sup>18</sup>

Kobalamin sehrává v organismu řadu zásadních funkcí. Je potřebný pro krve tvorbu, vývoj a správnou funkci centrální nervové soustavy, hraje též důležitou roli při tvorbě nukleových kyselin, v metabolismu mastných kyselin a aminokyselin, vystupuje také jako kofaktor dvou enzymů v lidském organismu - methylmalonyl-CoA mutázy a methionin syntázy. Žádné rostliny, houby ani živočichové si nedokáží vitamín B<sub>12</sub> sami vytvořit, pouze bakterie a archea mají enzymy potřebné pro jeho syntézu.<sup>20</sup> Totální syntéza vitamínu B<sub>12</sub> byla provedena roku 1972 výzkumnou skupinou Roberta Burnse Woodwarda a Alberta Eschenmosera a stála za ní práce 91 postdoktorandů a 12 studentů Ph.D. z 19 států.<sup>21,22</sup> Chemická struktura kobalaminu byla určena Dorothy Crowfoot Hodgkinovou a jejím týmem roku 1956 na základě získaných krystalografických dat.<sup>23</sup>

### 2.3.1 Vitamery kobalaminu a role v organismu

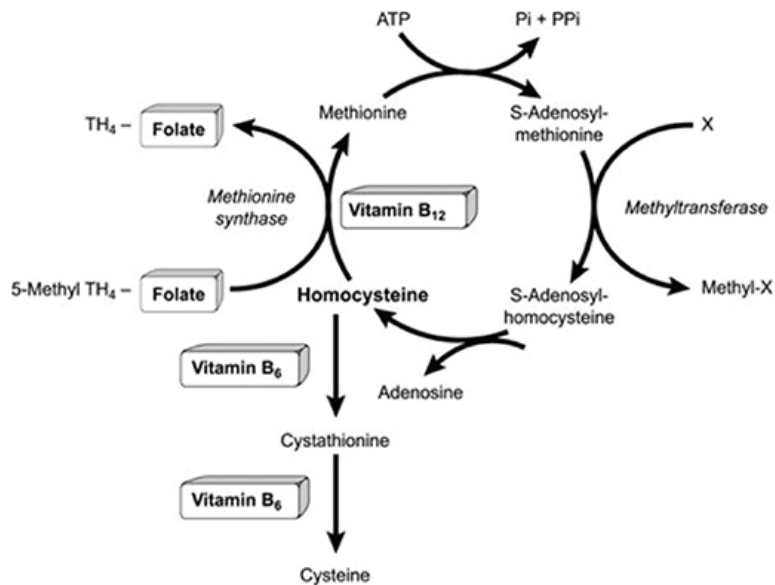
B<sub>12</sub> je největší a chemicky nejsložitější vitamín. Jak již bylo zmíněno, dle šestého axiálního ligandu kobalaminu rozlišujeme čtyři formy, neboli vitamery, vitamínu B<sub>12</sub>. Ve všech případech se jedná o tmavě červené krystalické látky, případně vodné roztoky. Toto zbarvení je způsobeno barvou komplexu kobalt-korrin.<sup>18,20</sup> Známe tedy:

**Kyanokobalamin** je syntetická forma vitamínu B<sub>12</sub>, jež se v přírodě normálně nevyskytuje, ale vzniká díky tomu, že ostatní vitamery B<sub>12</sub> ochotně váží kyanidovou (-CN) skupinu, kterou získávají v procesu purifikace aktivním uhlím po jejich syntéze bakteriemi v komerční syntéze. Protože se tato forma snadno krystalizuje a tedy následně i purifikuje, není náchylná na vzdušnou oxidaci, bývá často využívána ve výživových doplňcích stravy. Živé organismy jsou poté schopni tento vitamer přeměnit na biologicky aktivní formy B<sub>12</sub>.<sup>24</sup>

**Hydroxykobalamin**, známý také jako B<sub>12a</sub>, je formou vitamínu B<sub>12</sub>, jež je syntetizována bakteriemi, a následně je poté převáděna na kyanokobalamin během purifikace. HOCbl se ochotně váže s kyanidovými ionty a nachází tak uplatnění jako protilátka při otravě kyanidy. Předpokládá se, že hydroxykobalamin přechází na enzymaticky aktivní formy B<sub>12</sub> snáze než kyanokobalamin, proto se využívá v případech, kdy je riziko nedostatku vitamínu B<sub>12</sub> vyšší.<sup>20,24</sup>

**Methylkobalamin** je enzymaticky aktivní podoba vitamínu B<sub>12</sub>, která vystupuje jako kofaktor v biologicky důležitých procesech. Zajímavostí je, že zde nalézáme pro živé organismy poměrně vzácný případ vazby kov-alkyl (Co-C).

Tento vitamín je specifickou formou kobalaminu využívanou vitamín B<sub>12</sub>-dependentním enzymem, methionin syntázou (MTR, MS) (Obr. 2). Jedná se o methyltransferázový enzym, který katalyzuje regeneraci aminokyseliny methioninu z homocysteinu za využití 5-methyltetrahydrofolátu jakožto donoru methylové skupiny, za současné tvorby (regenerace)



**Obr. 2:** Metabolismus homocysteinu a B<sub>12</sub><sup>24</sup>

tetrahydrofolátu. Methionin je následně využíván pro syntézu S-adenosylmethioninu, který vystupuje jako donor methylové skupiny v mnoha dalších biologicky významných methylačních reakcích, jako jsou methylace DNA, RNA nebo proteinů. Nesprávná methylace DNA a proteinů je spojena se změnami ve struktuře chromatinu a v genové expresi, což může vyústit v kancerogenezi. Nesprávná funkce MTR také může vést k akumulaci homocysteinu, která je spojována s kardiovaskulárními onemocněními, slepotou či neurologickými obtížemi.<sup>25,26</sup>

**Adenosylkobalamin**, označovaný také jako kobamamid je další enzymaticky aktivní formou kobalaminu. Většina zásob vitamínu B<sub>12</sub> v organismu je skladována v játrech právě v této podobě a může být přeměňována na methylkobalamin podle potřeby. Jako kofaktor je potřebný pro funkci methylmalonyl-CoA mutázy (MCM, MUT) (Obr. 3), což je isomeráza, která katalyzuje izomerizaci L-methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA, který následně vstupuje do cyklu trikarboxylových kyselin.

Jedná se o mitochondriální enzym. Sukcinyl-CoA sehrává důležitou roli při zisku energie z lipidů a proteinů a je potřebný pro syntézu hemoglobinu.

Deficience tohoto enzymu je jednou z příčin

methylnalonicé

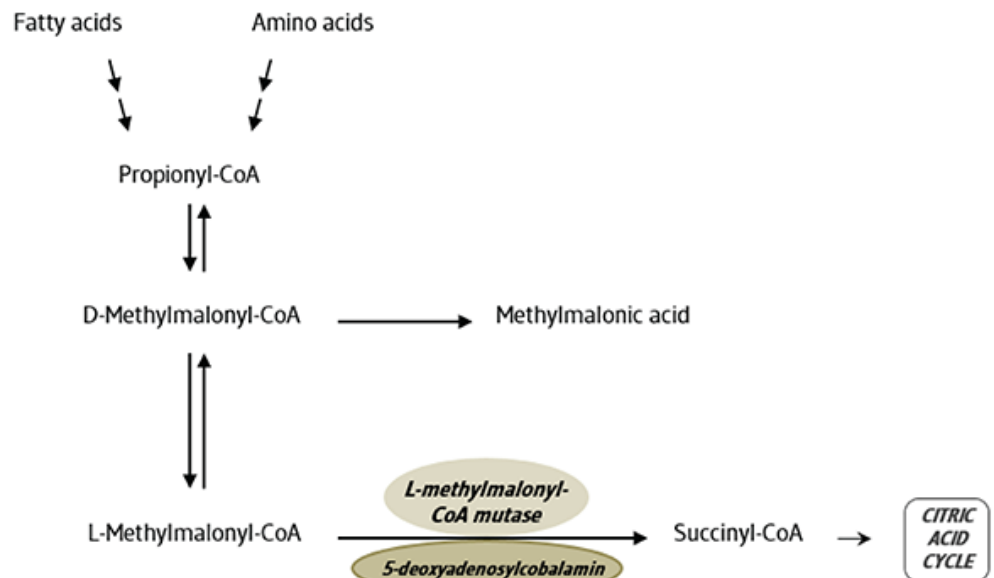
acidémie, což je **Obr. 3:** Schéma reakce katalyzované methylnalonyl-CoA mutázou<sup>24</sup> autosomální dědičné

onemocnění zodpovědné za řadu zdravotních problémů, jako jsou ketoacidózy, hyperamonémie, kardiologická onemocnění, selhání ledvin a může vést k předčasné smrti.<sup>25,27</sup>

Rozmanitá strava by měla poskytovat dostatečné množství vitamínu B<sub>12</sub>, nicméně vegetariáni a lidé starší 50 let by měli přijímat vyšší dávky kobalaminu. Doporučované denní dávky se pohybují v hodnotách přibližně 2,4 až 4 µg denně, u starších osob jsou doporučované dávky i mnohonásobně vyšší, v rozmezí 100 až 400 µg denně.<sup>28</sup> Doposud nebyly pozorovány žádné toxické či vedlejší účinky i při podání větších množství vitamínu B<sub>12</sub> - při léčbě nedostatečnosti tohoto vitamínu byly podávány suplementy i v množství 2 mg denně.<sup>29</sup>

Jako zdroje vitamínu B<sub>12</sub> mohou sloužit živočišné produkty jako maso, játra, vejce, mléko, dále ryby či měkkýši. Důležitým zdrojem pro lidi, kteří nekonzumují stravu živočišného původu, je poté potrava obohacená o B<sub>12</sub>, jako jsou cereálie, sójové produkty, ale také výživové doplňky v podobě multivitaminových tablet, kdy je zřejmě nejčastěji využívanou formou kyanokobalamin. Dále, jak již bylo zmíněno výše, vitamín B<sub>12</sub> dokáže syntetizovat pouze enzymy vyskytující se v bakteriích a archeích.<sup>20,30</sup>

Absorpce a distribuce vitamínu B<sub>12</sub> v lidském organismu je komplexní proces. Kobalamin vázaný na proteiny ve stravě je nejdříve z těchto proteinů uvolňován působením trávicích proteáz v žaludku i tenkém střevě. Žaludeční šťávy nejsou nutné pro vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub> ve volné podobě nevázané na proteiny (tablety, výživové doplňky), ale pouze k uvolnění vitamínu přijímaného ve stravě. Po uvolnění B<sub>12</sub> z proteinů je poté vitamín vázán na R-protein, zvaný také transkobalamin-I, haptokorrin či kobalofilin, který je produkován





slinnými žlázami v ústní dutině. Vazba na R-protein pak umožňuje ochranu před degradací kobalaminu v kyselém prostředí žaludku, kde by jinak rychle degradoval. Tento glykoprotein totiž vykazuje vysokou afinitu právě k vitamínu B<sub>12</sub> a vytváří komplex haptokorrin-B<sub>12</sub>, který je odolný vůči působení žaludečních šťáv.<sup>31</sup> Tento komplex poté putuje do první části tenkého střeva, dvanáctníku. V zásaditějším prostředí tenkého střeva je R-protein degradován pankreatickými enzymy, vitamín B<sub>12</sub> je uvolněn a následně navázán na další specifický glykoprotein, intrizitní (vnitřní) faktor (IF). Tento protein je produkován parietálními buňkami žaludeční sliznice v odpovědi na přítomnost potravy. Dochází tak ke vzniku dalšího komplexu, B<sub>12</sub>-IF, který umožňuje účinnou absorpci vitamínu B<sub>12</sub>, jelikož receptory na enterocytech v kyčelníku (ileum) ve spodním úseku tenkého střeva dokáží rozpoznat kobalamin pouze v této podobě. Tento specializovaný receptor v tenkém střevě se nazývá kubilin.<sup>32</sup> Vazba vitamínu B<sub>12</sub> na vnitřní faktor IF navíc také poskytuje ochranu vitamínu před katabolickým působením střevních bakterií.<sup>33,34</sup> Po rozpoznání komplexu B<sub>12</sub>-IF receptorem kubilinem je vitamín B<sub>12</sub> poté přenesen do krevního řečiště. Rozpoznání a příjem tohoto komplexu je umožněn pouze v přítomnosti vápenatých iontů, což zajišťuje správná funkce slinivky břišní. Vitamín B<sub>12</sub> může být také absorbován pasivní difuzí, tento proces je ale značně neúčinný a pouze asi 1% B<sub>12</sub> je absorbováno tímto způsobem.<sup>34</sup> Vitamín B<sub>12</sub> je zde následně navázán na transkobalamin-II za vzniku komplexu TC-II/B<sub>12</sub>, který slouží jako transportní forma v krevní plasmě. Komplex TC-II/B<sub>12</sub> se poté může navázat na specifické receptory na povrchu buněk, načež je endocytózou přenesen dovnitř buňky. Uvnitř buňky je poté tento komplex v lysosomu degradován a volný vitamín B<sub>12</sub> je uvolněn do cytoplasmy, kde již může být využit jako koenzym příslušnými enzymy.<sup>35</sup> Celkové množství vitamínu B<sub>12</sub>, které je uloženo v těle dospělého jedince se pohybuje mezi 2-5 mg, přičemž přibližně polovina z tohoto množství se nalézá v játrech. Exkrece vitamínu B<sub>12</sub> probíhá zejména skrze žluč, ale většina takto vylučovaného kobalaminu je zpětně absorbována skrze enterohepatickou cirkulaci. Díky tomuto mechanismu jsou játra schopna udržovat zásoby vitamínu B<sub>12</sub> po dobu 3 až 5 let a deficiencie jsou tedy poměrně vzácné.<sup>24,35</sup>

Vzájemnou přeměnu kyanokobalaminu a alkylových forem vitamínu B<sub>12</sub>, tedy methylkobalaminu a adenosylkobalaminu, umožňuje protein kódovaný MMACHC genem, tedy tzv. protein methylmalonické acidurie a homocysteinurie typu C. Produkty tohoto genu obstarávají dekyanaci kyanokobalaminu a dealkylace methylkobalaminu a adenosylkobalaminu.<sup>36</sup>

### 2.3.2 Deficience kobalaminu

U dospělých osob není deficience vitamínu B<sub>12</sub> častá, obzvláště díky systému zpětné absorpce a schopnosti organismu ukládat přebytečné množství tohoto vitamínu. Avšak u starších osob je nedostatečnost kobalaminu častějším problémem, zejména kvůli horší absorpci ze střev. Dostatečná absorpce vitamínu B<sub>12</sub> ze stravy vyžaduje správnou funkci žaludku, slinivky břišní a tenkého střeva.<sup>20</sup> Příznaků deficience je široká škála - nedostatek se může projevit jako snížená schopnost myšlení, poruchy emocí či chování - pozorována byla podrážděnost, psychóza, neuropatie či deprese. Byly popsány také poruchy reflexů, snížená srdeční funkce, poruchy krvetvorby, ale také nevolnost, bolesti hlavy, ztráta chuti, průjmy či dušnost. U dětí se deficience projevuje pomalým růstem a vývojem.<sup>37,38</sup>

Spíše než nedostatečným přísunem vitamínu B<sub>12</sub> ze stravy lze deficienci kobalaminu ve většině případů vysvětlit střevní malabsorpcí této látky nebo autoimunitním onemocněním zvaným zhoubná (perniciózní) anémie. Anémie (chudokrevnost) je porucha, kdy organismus nemá dostatečné množství červených krvinek či hemoglobinu, který je nezbytný pro přenos kyslíku do všech tkání.<sup>38,39</sup> Perniciózní anémie je jedním z typů deficience vitamínu B<sub>12</sub>, která vyvstává z narušené absorpce kobalaminu kvůli nedostatku vnitřního faktoru IF. Častou příčinou perniciózní anémie je ztráta parietálních žaludečních buněk, jež IF produkují. Jak již bylo zmíněno výše, tento faktor je nezbytný pro správnou absorpci vitamínu B<sub>12</sub>. Jedná se o autoimunitní chorobu, kdy imunitní systém organismu poškozují vlastní tkáně. Snížená absorpce vitamínu B<sub>12</sub> je tedy při tomto typu anémie způsobena tvorbou protilátek vůči vnitřnímu faktoru IF, jež se na něj váží a ten poté není schopen vytvářet komplex IF-B<sub>12</sub> potřebný pro správnou absorpci tohoto vitamínu. Zhoubná anémie je dále často spojena s chronickým zánětlivým onemocněním žaludku, které se označuje jako autoimunitní atrofická gastritida, jež vede k destrukci žaludečních buněk, které produkují vnitřní faktor a také žaludeční šťávy a enzymy potřebné pro uvolnění vitamínu B<sub>12</sub> vázaného v potravě.<sup>34,39</sup> Předpokládá se, že také infekce bakteriemi *Helicobacter pylori* sehrávají roli při iniciaci autoimunitní odpovědi organismu.<sup>40,41</sup> Zhoubná anémie nese svůj název díky tomu, že dříve toto onemocnění mnohdy končilo smrtí. Dnes je však možno tuto chorobu účinně léčit. Nejčastějším způsobem je přímé injekční podávání vitamínu B<sub>12</sub>, aby došlo k obejití střevní absorpce. Další možností jsou i vysoké dávky ústně podávaných výživových doplňků, protože při podání 0,5-1 mg B<sub>12</sub> denně je i málo účinná pasivní absorpce kobalaminu (asi 1% přijaté dávky) dostačující.<sup>42,43</sup>

Další poruchou, která souvisí se sníženou schopností příjmu kobalaminu, je malabsorpce vitamínu B<sub>12</sub> z jídla. Je to jeden z hlavních důvodů nedostatečnosti vitamínu B<sub>12</sub> u starší populace a obvykle je také spojena s atrofickou gastritidou, která ústí v atrofii žláz v žaludku a snížení tvorby žaludečních šťáv. Ty jsou opět potřeba pro uvolnění vitamínu B<sub>12</sub> z proteinů v potravě a dochází tak ke snížení absorpce tohoto vitamínu. Jedinci s touto poruchou však dokáží vstřebávat volnou formu kobalaminu (nevázanou na proteiny), jelikož vnitřní faktor IF je v tomto případě funkční a schopen tvořit komplex IF-B<sub>12</sub>.<sup>25,44</sup>

Dalšími možnými důvody deficiencie vitamínu B<sub>12</sub> mohou být chirurgické zákroky, resekce žaludku či tenkého střeva. Poruchy ovlivňující tenké střevo, jako jsou malabsorpční syndromy (celiakie), také mohou vyústit v deficienci B<sub>12</sub>. Enzymy a vápenaté ionty poskytované slinivkou břišní jsou pro absorpci kobalaminu kritické, proto při poruchách slinivky může docházet k deficienci tohoto vitamínu. Vzhledem k tomu, že vitamín B<sub>12</sub> se nalézá pouze v jídle živočišného původu, u přísných vegetariánů (veganů) může docházet k jeho deficienci.<sup>20,34</sup> Poměrně vzácné jsou vrozené poruchy metabolismu B<sub>12</sub>. Znám je Imerslund-Gräsbeck syndrom, což je autosomálně recesivní onemocnění způsobené poruchou receptoru v kyčelníku, jež je potřebný pro správnou absorpci vitamínu B<sub>12</sub>.<sup>45</sup> Poruchy příjmu kobalaminu nastávají také u jedinců s dědičnou deficiencí vnitřního faktoru IF (známo jako kongenitální perniciózní anémie), která vede opět k nedostatečné absorpci B<sub>12</sub>.<sup>25,46</sup>

Deficiencie vitamínu B<sub>12</sub> vede v zhoršenou aktivitu enzymů, které pro svou správnou funkci tento vitamín potřebují. Porucha funkce methionin syntázy vede ke zvýšení hladiny homocysteinu a také k inhibici regenerace tetrahydrofolátu. Folát (kyselina listová, vitamín B<sub>9</sub>) poté zůstává ve formě (5-methyltetrahydrofolát), kterou organismus nedokáže využít, což vede k symptomům deficiencie vitamínu B<sub>9</sub>. Folát se tedy následně nemůže účastnit syntézy DNA, což ovlivňuje rychle se dělící buňky kostní dřeně, a to poté ústí v tvorbu nadměrně velkých, nezralých červených krvinek, které jsou chudé na hemoglobin. Z tohoto vyvstávající chudokrevnost se označuje jako megaloblastická anémie, jejíž nejčastější formou je právě anémie perniciózní.<sup>25,26</sup> Snížená dostupnost folátu při syntéze DNA vede ke vzniku řetězců DNA náchylnějších k poškození. Nedostatek kobalaminu a vitamínu B<sub>9</sub> pak ústí ve sníženou produkci methioninu a *S*-adenosylmethioninu (donor methylových skupin), což značně snižuje schopnost methylačních reakcí. To může následně vést ve vyšší incidenci poškození DNA či ve změny methylace DNA, a tyto faktory poté mohou zvyšovat riziko rakoviny.<sup>47</sup> Taktéž methylace fosfolipidů myelinových pochev neuronů jsou potřebné pro jejich správnou funkci. *S*-adenosylmethionin se též účastní tvorby neurotransmiterů (katecholaminů) a sehrává roli v metabolických pochodech v mozku.<sup>48</sup> Deficiencie vitamínu B<sub>12</sub> se tedy projevuje také

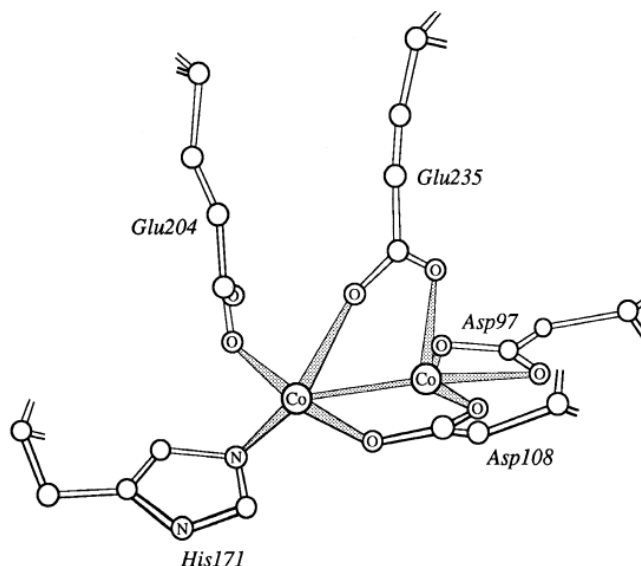
neurologickými příznaky. Mezi pozorované symptomy patří necitlivost a brnění končetin, obtíže s chůzí, desorientace, ztráty paměti, deprese nebo demence.<sup>49</sup> Další neurologické obtíže spojené s deficiencí B<sub>12</sub> vyvstávají ze snížené funkce methylmalonyl-CoA mutázy, která obstarává přeměnu methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA.<sup>27</sup> Kvůli nefunkčnosti tohoto enzymu dochází k hromadění substrátu (methylmalonyl-CoA) v centrální nervové soustavě, který následně přechází v methylmalonovou kyselinu, jejíž nadbytek vede k destabilizaci myelinu. Ten je následně příliš křehký, dochází k demyelinizaci neuronů, což vede k narušení schopnosti vedení vzruchu.<sup>50</sup> Mezi další příznaky nedostatku kobalaminu patří také potíže související s gastrointestinálním traktem. Projevují se například bolestivostí jazyka, ztrátou chuti či zácpou. Původ těchto potíží není zcela jasný, nejspíše jsou však spojeny se záněty žaludku způsobenými deficiencí vitamínu B<sub>12</sub> a ztrátou žaludečních buněk.<sup>28</sup>

## 2.4 Další proteiny a enzymy obsahující kobalt

Kobalt v podobě vitamínu B<sub>12</sub> sehrává mnoho klíčových rolí v různých biologických procesech. Je však známo i několik proteinů či enzymů, jež pro své biologické funkce využívají atom kobaltu, ale neobsahují korrinoidní makrocyklus.<sup>5</sup>

Methionin aminopeptidáza (MetAP) je ubikvitní (všudypřítomný) enzym, který katalyzuje odštěpení methioninu z N-konce u nově translatovaných polypeptidových řetězců u prokaryot i eukaryot. Všechny formy tohoto enzymu se jeví být metaloenzymy, přičemž jako aktivní ionty kovů vystupují Co<sup>2+</sup>,

Mn<sup>2+</sup> a Zn<sup>2+</sup>. MetAP pocházející z bakterie *Escherichia coli* je prvním nekorrinoidním proteinem, který obsahuje kobalt, jehož struktura byla určena (Obr.4). Struktura tohoto enzymu vykazuje dvoujaderné centrum, kdy dva atomy kobaltu jsou koordinovány His171 a Glu204, jež vystupují jako monodentátní ligandy. Bidentátně jsou pak



**Obr.4:** Katalytické centrum MetAP z *E. coli*<sup>5</sup>

vázány Asp97, Asp108 a Glu235 (čísla značí pozici aminokyselinového zbytku v polypeptidovém řetězci; počítáno od N-konce). Můstkující aqua ligand mezi dvěma atomy kobaltu vystupuje během katalýzy jako nukleofil. Známý jsou dva typy tohoto enzymu,

MetAP1, vyskytující se u bakterií, a MetAP2, znám u archeí. MetAP2 obsahuje oblast, která vytváří helikální subdoménu. U eukaryot se vyskytují oba typy methionin aminopeptidáz.<sup>51,52</sup>

Nitril hydratáza (NHáza) je enzym, který katalyzuje hydrataci aromatických a malých alifatických nitrilů na odpovídající amidy. Sestává ze dvou odlišných podjednotek ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Jedná se o enzym, který je klíčový v metabolismu toxických sloučenin.<sup>53</sup> Nitril hydratáza nachází uplatnění v průmyslu, kdy se využívá k produkci akrylamidu a nikotinamidu z příslušných nitrilů.<sup>54,55</sup> V bakterii *Rhodococcus rhodochrous* J1 jsou známy dva druhy genů pro NHázu,

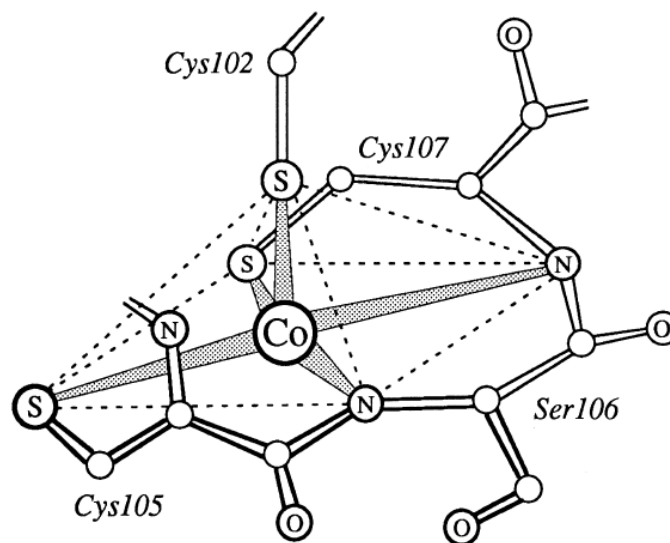
příčemž oba enzymy využívají nekorrinoidní centrum obsahující kobalt. Lépe prozkoumány jsou nitril hydratázy obsahující v aktivním centru železo, jejichž struktura byla stanovena pomocí rentgenové strukturní analýzy. Krystalová struktura NHázy obsahující kobalt z bakterie *Pseudonocardia thermopila* kmene JCM 3095

vykazuje značnou podobnost s NHázami obsahujícími železo (Obr. 5). Kobaltový ion je zde koordinován

dvěma amidovými dusíky hlavního řetězce a třemi thiolátovými skupinami cysteinu. Šesté koordinační místo je pak obsazováno oxidem dusnatým či molekulou vody.<sup>56</sup>

Prolidáza, známá také jako prolin dipeptidáza, je enzym který specificky štěpí peptidickou vazbu nacházející se vedle prolinového residua (vazba Xaa-Pro; Xaa je obecně jakákoliv aminokyselina, Pro označuje prolinový zbytek). Prolidáza je v přírodě široce rozšířena, nacházíme ji v bakteriích i tkáních savců. Prolidáza z *Pyrococcus furiosus* je homodimerní enzym a každá podjednotka obsahuje bimetalické aktivní centrum. Jedno z těchto míst je obsazeno iontem  $\text{Co}^{2+}$ , přičemž druhé místo váže opět  $\text{Co}^{2+}$  nebo  $\text{Mn}^{2+}$  (což ale vede ke snížení aktivity o 25%). Každá podjednotka tedy obsahuje kobaltnatý ion, který je pevně vázaný (není odstraněn po purifikaci či dialýze), a druhý kovový ion, potřebný pro katalytickou funkci.<sup>57</sup>

D-xyloso izomeráza je enzym katalyzující přeměnu D-xylosy na D-xylulosu a také přeměnu D-glukosy na D-fruktosu. Tento enzym vyžaduje pro svou funkci divalentní kation,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  či  $\text{Mn}^{2+}$ . Krystalová struktura D-xyloso isomerázy z *Streptomyces diastaticus*



**Obr. 5.** Struktura aktivního centra nitril hydratázy z bakterií *Rhodococcus*<sup>5</sup>

M1033 ukazuje, že se jedná o homotetramer. Dva ionty  $\text{Co}^{2+}$  v aktivním místě monomerní podjednotky poukazují, že tento enzym preferuje kobaltnaté ionty před ostatními.<sup>58</sup>

Thiokyanát hydroláza (SCNáza) katalyzuje hydrataci a následnou hydrolyzu thiokyanátu ( $\text{SCN}^-$ ) za produkce karbonylsulfidu a amoniaku ( $\text{SCN}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$ ). Výskyt SCNázy byl pozorován u bakterií *Thiobacillus thiparus* THI115 oxidujících síru. Na základě podobné sekvence aminokyselin se předpokládá, že tento enzym patří do stejné třídy proteinů jako nitril hydratázy. Krystalová struktura vykazuje přítomnost tří typů podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Čtyři  $\alpha\beta\gamma$ -heterotrimery se skládají do dodekamerní struktury a každá  $\gamma$ -podjednotka obsahuje nekorrinoidní centrum s iontem  $\text{Co}^{3+}$ . Obdobně jako je tomu u nitril hydratáz, je zde kobaltitý ion koordinován dvěma amidovými dusíky hlavního řetězce a třemi thiolátovými skupinami cysteinu. V aktivním místě však není vázána molekula vody či NO, kobaltitý ion má tedy obsazeno jen pět koordinačních míst.<sup>59</sup>

Methylmalonyl-CoA karboxytransferáza (transkarboxyláza) (MMCT) je enzym, jež obsahuje biotin (vitamín H) a vyskytující se u bakterií *Propionibacterium shermanii*. Jedná se o složitý multipodjednotkový enzym (26S) sestávající ze tří typů podjednotek (1.3S, 5S a 12S), který katalyzuje přenos karboxylové skupiny z methylmalonyl-CoA na pyruvát za tvorby propionyl-CoA a kyseliny oxaloctové. Podjednotka 5S je homodimer obsahující ionty  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  a spolu s dvěma podjednotkami 1.3S, které obsahují biotin, tvoří komplex označovaný jako 6S. Podjednotka 12S je pak hexamer sestávající z šesti identických monomerů a spolu s podjednotkami 6S vytváří aktivní enzym MMCT. Ion  $\text{Co}^{2+}$  je oktaedricky koordinován dvěma imidazolovými skupinami z His215 a His217, karboxylovými skupinami z Asp23 a Lys184 a molekulou vody.<sup>60,61</sup>

Aldehyd dekarboxyláza (AD) je enzym zodpovědný za přeměnu mastných aldehydů na uhlovodíky a oxid uhelnatý. Sehrává tak klíčovou roli v biosyntéze uhlovodíků, jež jsou nezbytné pro všechny živé organismy. AD ze zelené řasy *Botryococcus braunii* sestává z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek. V každém páru podjednotek  $\alpha\beta$  je obsažen sytém vázající atom kobaltu v porfyrinovém makrocyklu. Jedná se tak o první popsany případ u rostlin, kdy dochází k využití kobaltu v nekorrinoidním makrocyklu.<sup>62</sup>

Bromoperoxidáza-esteráza je enzym zodpovědný za katalýzu tvorby vazby uhlík-brom za přítomnosti peroxidů. Bromoperoxidáza získaná z *Pseudomonas putida* je aktivována inkubací s ionty kobaltu  $\text{Co}^{2+}$ . Enzym vykazuje dimerní strukturu. Krystalová struktura tohoto enzymu nebyla dosud určena.<sup>63</sup>

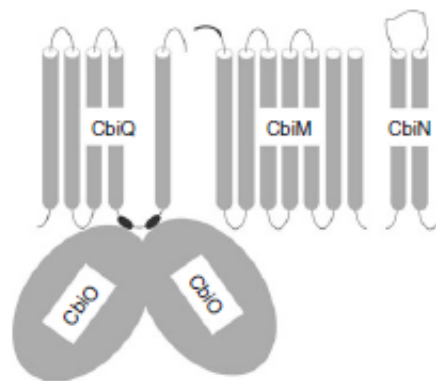
## Přenašeče kobaltu

Přechodné kovy, které sehrávají klíčové role jakožto kofaktory mnoha biologicky důležitých procesů musí být aktivně transportovány do buněk. Přenašečové systémy pro kobalt se dají rozdělit na primární a sekundární aktivní transportní systémy (Tab. 1) <sup>64,65</sup>

Přenašečový systém	Typ	Výskyt
CbiMNQO	Primární, typ ECF	Prokaryota
NiCoT	Sekundární	Prokaryota, Houby
HupE/UreJ	Sekundární	Prokaryota
CorA	Kanálový	Prokaryota, eukaryotní bakterie
TBDT	TonB-dependentní přenašeč na vnější membráně	Gram-negativní bakterie

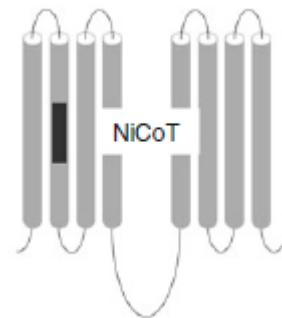
**Tabulka 1:** Klasifikace a výskyt přenašečových systémů kobaltu

CbiMNQO (Obr. 6) jsou poměrně nově známým typem systému pro import mikronutrientů u prokaryot. Nazývají se také transportéry ECF (energy-coupling factor, energetický spojovací faktor).<sup>67</sup> Předpokládá se, že cbiMNQO funguje jako ABC přenašeč pro  $\text{Co}^{2+}$  ionty (ABC transportér, ATP Binding Cassette, transmembránové proteiny schopné aktivního přenosu látek dovnitř či ven skrze membránu za využití energie z ATP). Energetický spojovací faktor přenašečů ECF sestává z transmembránového proteinu (cbiQ) a páru typických ABC ATPáz (2x cbiO). Substrátovou specifitu poté zajišťuje jeden či více membránových proteinů, v případě  $\text{Co}^{2+}$  přenašečů se jedná o proteinový systém cbiMN.<sup>68</sup>



**Obr. 6:** Přenašeč kobaltu cbiMNQO<sup>66</sup>

Přenašeče NiCoT (Obr. 7) byly jako transportéry pro  $\text{Co}^{2+}$  identifikovány během sekvenční analýzy genového klastru pro nitril hydratázu u bakterií *Rhodococcus rhodochrous* J1. Přenašeč označovaný jako NhlF je schopen transportu  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Co}^{2+}$  iontů, přičemž preferuje ionty kobaltnaté.<sup>69</sup>

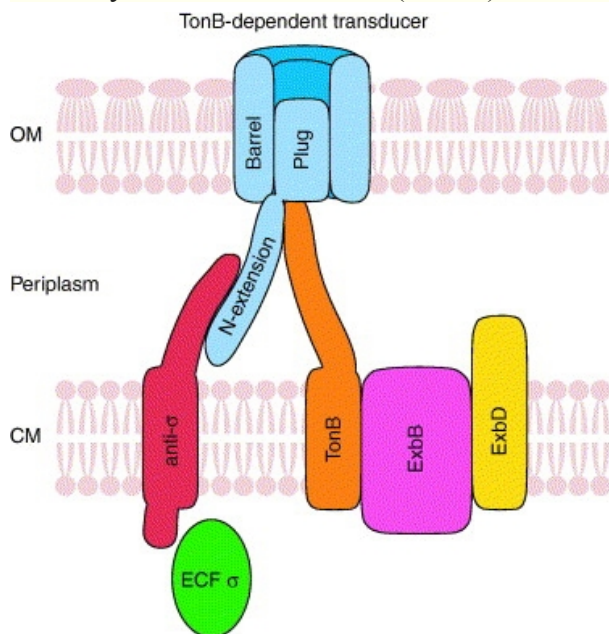


**Obr. 7:** Přenašeč NiCoT<sup>66</sup>

Proteiny HupE/UreJ patří do skupiny přenašečů spojených s geny kódujícími NiFe hydrogenázu (hup, **h**ydrogen **u**ptake) či ureázu (ure). Na základě bioinformatických analýz se předpokládá, že tyto proteiny sehraávají roli v transportu  $\text{Co}^{2+}$  iontů zejména u kyanobakterií při biosyntéze kobalaminu.<sup>70</sup>

Přenašeče CorA slouží jako hlavní transportní systém pro ionty  $\text{Mg}^{2+}$  u prokaryot, známa jsou také funkční homologa u eukaryot.<sup>72</sup> U hypertermofilních bakterií *Thermotoga maritima* tento přenašeč fungoval při transportu kobaltnatých iontů, které silně preferoval před ionty hořečnatými. U *Thermotoga m.* se tento protein vyskytuje v podobě homopentameru a vytváří membránové póry či nálevkovitou strukturu v cytoplasmě.<sup>73</sup>

TonB-dependentní přenašeče na vnější membráně (TBDT) jsou přenašečové systémy sestávající z domény tvořené  $\beta$ -soudkem a zátkovou (plug) doménou, které váží své příslušné substráty se značnou afinitou (Obr. 8). Jsou závislé na komplexu proteinů ExbB-ExbD-TonB,



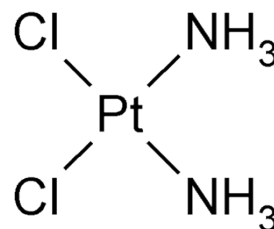
**Obr. 8:** TonB-dependentní přenašeč<sup>71</sup>

jež se nachází v cytoplasmatické membráně. TonB obsahuje rozsáhlou periplasmatickou oblast, která interaguje s receptory na vnější membráně. Geny pro přenašeče na vnější membráně a klastry exbBD-tonB byly identifikovány v proteobakteriích. Na základě provedených analýz a bioinformatických dat se předpokládá, že  $\text{Co}^{2+}$  ionty mohou procházet přes vnější membránu gram-negativních bakterií pomocí aktivního TonB-dependentního mechanismu transportu.<sup>65,74</sup>



### 3. Biologicky zajímavé Co(III) komplexy

Objev protinádorového působení cisplatiny  $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$  (Obr. 9) započal moderní rozvoj chemoterapeutik na bázi kovu.<sup>75</sup> Léčiva odvozená od platiny jsou běžně používána samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivy pro léčbu různých typů nádorů. Jejich využití je však limitované, ať už kvůli získaným či dědičným rezistencím nádorových buněk proti těmto léčivům, tak i kvůli toxickým vedlejším účinkům, které vyvstávají z nespecifického působení těchto látek. Tyto limitace vedly poté k zaměření vývoje protinádorových léčiv na bázi kovu i jiným směrem, zvláštnímu zájmu se přitom těší kovy biogenní (tělu vlastní), které mohou vykazovat nižší toxicitu vůči normálním buňkám zdravého organismu.<sup>76</sup>



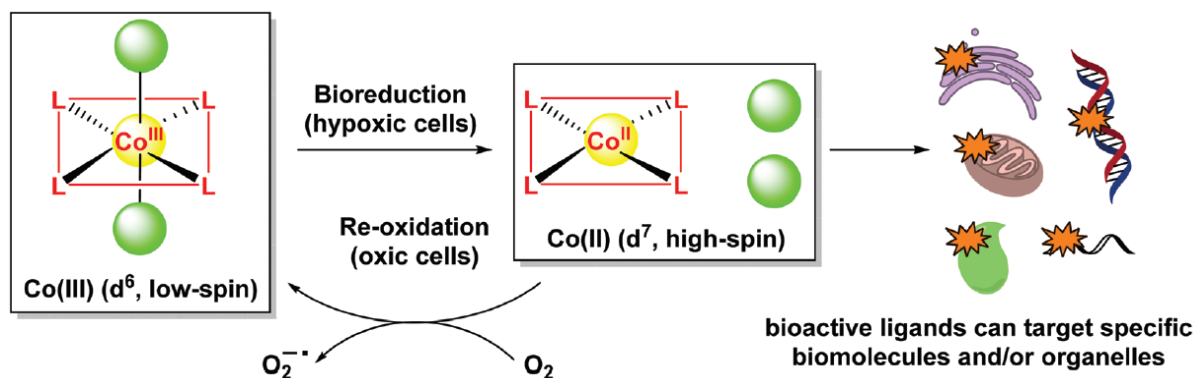
**Obr. 9:** Cisplatina  
 $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$

Koordinální sloučeniny kobaltu v oxidačním stupni +III mohou nalézt potenciální uplatnění v medicíně. Mezi možné aplikace kobaltitých komplexů patří jejich využití jakožto chaperonů pro bioaktivní ligandy a systémů pro selektivní zacílení nádorů skrze bioreduktivní aktivaci prekurzorových komplexů. Jiné komplexy Co(III) vykazují i širší spektrum účinků - známy jsou komplexy vykazující antivirotické, antibakteriální či antiparazitické účinky. Klinicky nejvýznamnějším pokrokem v oblasti léčiv odvozených od Co(III) je registrace CTC-96, Doxoviru, jako topického mikrobicidu pro léčbu viru herpes simplex typu 1 (HSV-1) firmou Redox Pharmaceutical Corporation.<sup>77,78</sup> První biologickou studii zabývající se kobaltitými komplexy provedl Dwyer *et al.* roku 1952, kdy byla zkoumána toxicita optických izomerů  $[Co(en)_3](NO_3)_3$ . Dávka potřebná k usmrcení myši byla stanovena po intraperitoneálním podání (do břišní dutiny) - pro všechny testované komplexy se pohybovala od 75 mg/kg do 165 mg/kg.<sup>79</sup> Některé z takových komplexů také vykazovaly bakteriostatické či baktericidní účinky proti *E. coli* a *S. haemolyticus* v mikromolárních hodnotách. Protinádorové vlastnosti těchto látek nebyly dále studovány, ale Dwyer a spolupracovníci dále připravili sérii kationických, anionických a neutrálních komplexů s amoniakem, dusitanem, ethylendiaminem, bipyridinem, fenantrolinem a terpyridinovými ligandy, u kterých byla studována jejich schopnost inhibice přenosu neuromuskulárních signálů na nervových spojích (kurareformní aktivita).<sup>80</sup> Komplexy vykazovaly rozličné stupně aktivity a bylo zjištěno, že jejich účinek byl dosažen kompeticí s acetylcholinem v oblasti spojů. Komplexy s fenantrolinem vykazovaly antibakteriální účinky.<sup>81</sup> I přes tyto slibné výsledky byl další vývoj farmaceutik odvozených od kobaltu značně limitovaný.

### 3.1 Co(III) komplexy jako prekurzory léčiv

Prekurzory léčiv jsou inertní sloučeniny, které mohou být aktivovány vnějšími podněty, jakými jsou světlo, ionizující záření nebo redukující prostředí.<sup>82</sup> Redukující prostředí se sníženou hladinou kyslíku (hypoxické) je typickým znakem mnoha pevných tumorů. Je to také jeden z faktorů, který sehrává roli v chemorezistenci a radiorezistenci nádorů a také ovlivňuje angiogenezi, vaskulogenezi, invazivitu a schopnost metastázování. Vede také k rezistenci nádorových buněk vůči buněčné smrti, ústí v jejich pozměněný metabolismus a genomovou nestabilitu.<sup>83</sup> Vzhledem k roli hypoxie ve vývoji nádorů a odolnosti proti terapiím ji lze považovat za jeden z nejzajímavějších cílů pro onkologii. Hypoxie v tkáních pevných tumorů vyvstává z omezení difuze kyslíku v avaskulárních primárních tumorech či v jejich metastázách. Odráží prostorovou neorganizovanost vaskulárního systému tumorů, což vede k interkapilárním vzdálenostem, které jsou často mimo dosah difuze kyslíku (přibližně 200  $\mu\text{m}$ ).<sup>84,85</sup> Hypoxií aktivovaná léčiva mohou být tedy slibnými prostředky v léčbě nádorů.

Rozdílná reaktivita komplexů kobaltu v oxidačních stupních II a III vedla k vývoji kobaltitých prekurzorů, jež mohou aktivovány bioredukci v hypoxickém prostředí pevných tumorů. Jedná se o proces, kdy inertní látka podstoupí redukcí po vstupu do buňky za současného uvolnění jedné či více biologicky aktivních látek. (Obr. 10).<sup>77</sup>



**Obr. 10:** Předpokládaný mechanismus účinku prekurzorů Co(III)<sup>86</sup>

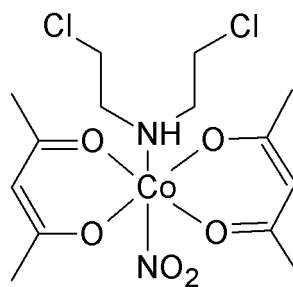
Komplexy kobaltu v oxidačním stupni III vykazují většinou oktaedrické uspořádání a jsou poměrně inertní díky vysoké stabilizační energii krystalového pole (d<sup>6</sup>, nízkospinové). Komplexy Co(II) (d<sup>7</sup>, vysokospinové) vykazují větší labilitu (rychlost výměny ligandů u Co(II) komplexů je přibližně 10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup>) a jsou náchylnější k substituci ligandů. Prekurzor tedy musí vykazovat neaktivní formu, jež je následně aktivována redukcí na částici (jednoelektronový

adukt), která může být poté reverzibilně reoxidována. V normálním oxickém prostředí je prekurzor redukován a aktivován, ale vzápětí znovu reoxidován zpět na prekurzor. V hypoxickém prostředí je však reoxidace pomalá a aktivované léčivo je tak uvolněno.<sup>77</sup> Přesný mechanismus této aktivace však není doposud spolehlivě znám. Redukce kobaltitého prekurzoru uvnitř buňky pravděpodobně probíhá prostřednictvím endogenních vnitrobuněčných reduktáz jako jsou xantinoxidáza, NADPH nebo cytochrom P450.<sup>87</sup> Bioredukce může nastat pouze za předpokladu, že redoxní potenciál původního Co(III) komplexu je srovnatelný s redoxním potenciálem uvnitř cytosolu buňky (-200mV až -400mV).<sup>88</sup> V centru zájmu hypoxicky aktivovaných léčiv leží také selektivita aktivace - tedy v nádorových buňkách. Tyto prekurzory tedy často vycházejí z předpokladu reoxidace aktivní formy v normálních buňkách zpět na formu inertní.<sup>84</sup> Za určitých podmínek však může být hypoxická i zdravá tkáň - pro eliminaci toxických vedlejších účinků je tedy potřeba, aby prekurzory měly dostatečně vysoký aktivační práh.<sup>89</sup> Redoxní potenciál Co(III) prekurzorů může být optimalizován za využití různých ligandů, aby co nejlépe odpovídal prostředí v cytoplasmě nádorových buněk. Takto upravené prekurzory mohou poté vést ke značné selektivitě vůči hypoxickým tkáním pevných tumorů.

### 3.1.1 Co(III) komplexy s dusíkatými yperity

Výzkum provedený Teicherem *et al.* zjistil, že Co(III) komplexy s amino a nitro ligandy mohou sloužit jako účinné radiosenzibilizátory (látky které zvyšují citlivitu nádorových buněk vůči radioterapii) vůči hypoxickým buňkám rakoviny prsu EMT6.<sup>90</sup> Další studium obdobných komplexů vedlo k zjištění, že komplexy obsahující acetylacetonát (acac) a dusíkaté yperity

vykazují účinek proti kultivovaným rakovinným buňkám z myši.<sup>91</sup> Dusíkaté yperity jsou klinicky schválená protinádorová léčiva, která působí prostřednictvím alkylace purinových bází DNA.<sup>92</sup> Jedním z takto využitých ligandů je bis(2-chloroethyl)amin

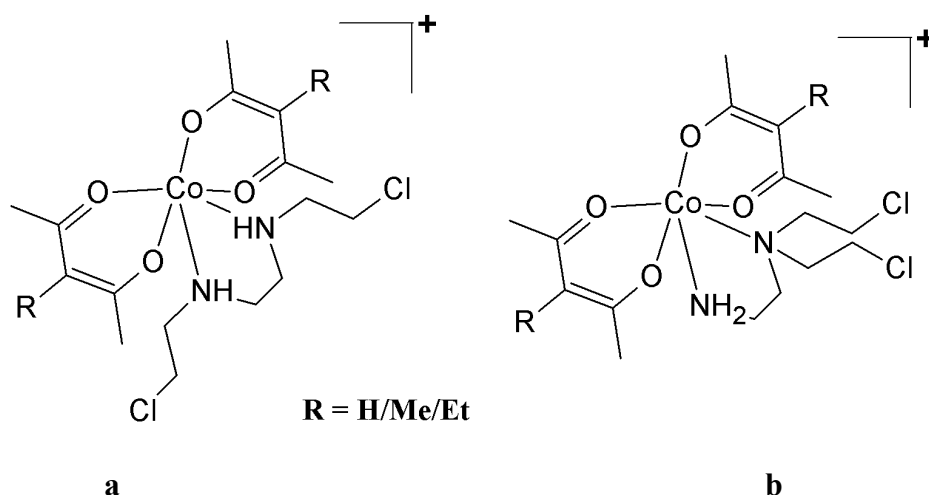


**Obr. 11:** Komplex **1** [Co(acac)<sub>2</sub>(BCA)(NO<sub>2</sub>)] [Co(acac)<sub>2</sub>(BCA)(NO<sub>2</sub>)] (**1**) (Obr. 11) vykazoval inertní chování, jelikož volný elektronový pár na atomu dusíku BCA byl využit při koordinaci atomu kobaltu.

Po redukcí byl BCA uvolněn, což umožnilo cytotoxický účinek za vytvoření aziridiniového iontu potřebného pro alkylation purinových bází DNA. Studium cytotoxicity odhalilo, že komplex **1** vykazoval vyšší toxicitu vůči buňkám s normální hladinou kyslíku, než

proti buňkám hypoxickým. Prokázal se také jako silný radiosenzibilizátor vůči hypoxickým buňkám rakoviny prsu EMT6. I přes toxicitu vůči zdravým buňkám však komplex **1** dokázal překonat rezistenci vůči léčivům odvozeným od yperitů u karcinomu skvamózních buněk (SCC-25/HN2), vyvolal více než 60 denní prodloužení života u myši nesoucích leukemické buňky (L1210) a také zpomalil růst tumoru u myši s fibrosarkomem (FSalIC).<sup>91</sup>

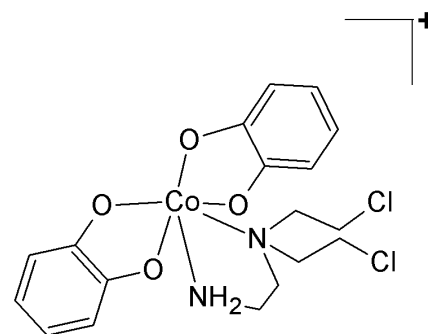
Další skupina (Ware *et al.*) použila podobný přístup jako u **1** a pokusila se o přípravu Co(III) komplexů s alkylujícími aziridinovými skupinami. Využili bidentátních dusíkatých



**Obr. 12:** Komplexy **2**  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{BCE})]^+$  a **3**  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{DCE})]^+$

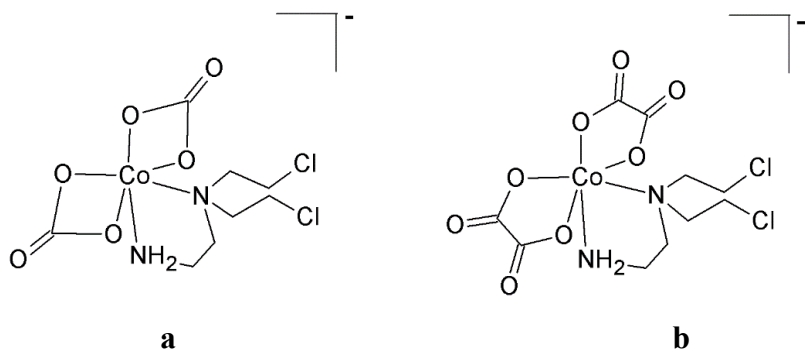
yperitů *N,N'*-bis(2-chloroethyl)ethylenediaminu (BCE) a *N,N'*-bis(2-chloroethyl)ethylenediaminu (DCE) a získali sérii Co(III) komplexů s různými substituenty na ligandu acac<sup>-</sup>. Komplexy typu  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{BCE})]^+$  (**2**) (Obr. 12a) a  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{DCE})]^+$  (**3**) (Obr. 12b) prokázaly schopnost selektivní likvidace hypoxických buněk. Nejvyšší účinnost prokázal komplex **3**, kdy jako substituent na ligandu acac vystupovala methylová skupina. Cytotoxicita vůči fibroblastickým nádorovým buňkám vaječníku (AA8 a UV4) byla šestinásobně vyšší v případě buněk kultivovaných v hypoxickém prostředí oproti buňkám z aerobních podmínek. U tohoto komplexu byla provedena studie pomocí pulsní radiolýzy za účelem pochopení mechanismu hypoxické selektivity. Na základě získaných výsledků se předpokládá, že hypoxická selektivita nevystává z redoxního cyklování (reverzibilní reoxidace aktivní formy Co(II) kyslíkem v oxických buňkách, ale ne v hypoxických). Ukázalo se, že po redukci centra Co(III) byl alkylující ligand uvolněn bez ohledu na hladinu kyslíku. Předpokladem tedy pak je,

že hypoxická selektivita vyvstává z kompetice o vnitrobuněčné redukanty mezi aktivovanou formou Co(II) komplexu a kyslíkem.<sup>93</sup> Údaje vyplývající ze studia vztahu struktury a aktivity naznačují, že vlastnosti ligandu také sehrávají klíčovou roli při hypoxické selektivitě - komplexy s nesubstituovaným acac vykazovaly selektivitu až o jeden řád nižší.<sup>94,95</sup>



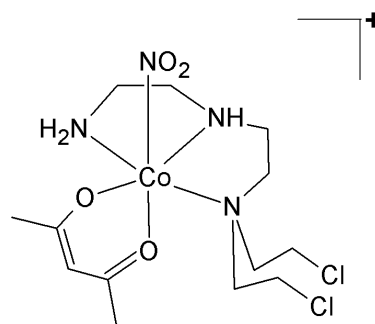
**Obr. 13:** Komplex 4  
[Co(trop)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>+</sup>

V případě použití bis-tropolonátu namísto acetylacetonátu byly získány komplexy typu [Co(trop)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>+</sup> (4) (Obr. 13), které však snadno podléhaly redukcii za oxických i hypoxických podmínek, zřejmě následkem jejich vysokých redoxních potenciálů. Nesubstituovaný bis-tropolonát se tedy nejeví jako vhodný pomocný ligand pro tento typ prekurzorových komplexů Co(III).<sup>96</sup>



**Obr. 14:** Komplexy 5 [Co(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>-</sup> a 6 [Co(oxaláto)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>-</sup>

U komplexů podobného typu byly využity také karbonáto a oxaláto ligandy za vzniku [Co(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>-</sup> (5) (Obr. 14a) a [Co(oxaláto)<sub>2</sub>(DCE)]<sup>-</sup> (6) (Obr. 14b), které dosahovaly 2-4 násobné selektivity vůči hypoxickým buňkám karcinomu vaječníku UV4 ve srovnání s buňkami oxickými.<sup>97</sup>

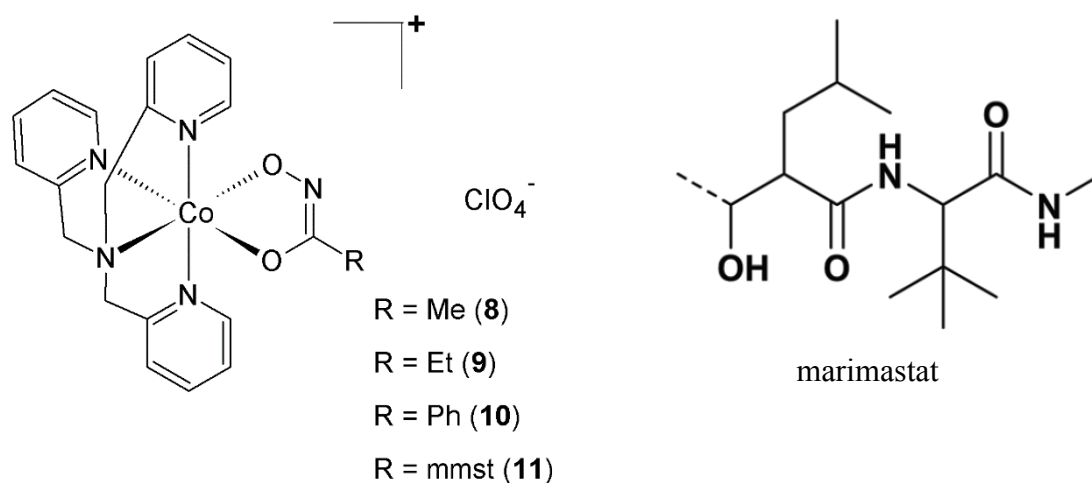


Proběhla také příprava Co(III) prekurzoru s pokusem o zvýšení stability za fyziologických podmínek za využití tridentátních dusíkatých yperitů. Kobaltité acetylacetonáto komplexy obsahující *N,N*-bis(2-chloroethyl)diethylenetriamin (DCD) o složení [Co(acac)(DCD)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (7) (Obr. 15) vykazovaly však poměrně nízkou hypoxickou selektivitu (5 násobnou) proti nádorovým buněčným liniím AA8 a UV4.<sup>95</sup>

**Obr. 15:** Komplex 7 [Co(acac)(DCD)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>

### 3.1.2 Co(III) komplexy s bioaktivními ligandy

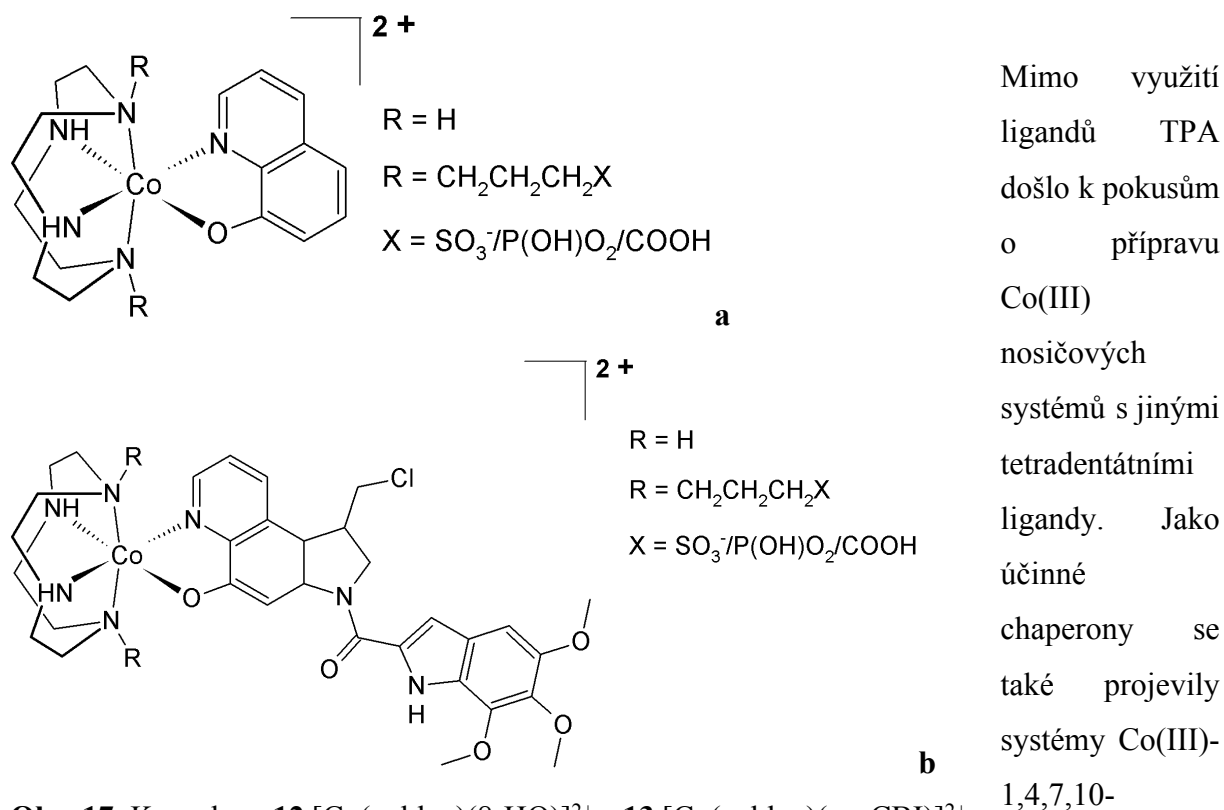
Elektrochemických vlastností kobaltitých komplexů se dále pokusila využít výzkumná skupina Hambley *et al.* ve snaze selektivně doručit inhibitory matrixových metaloproteináz (MMP) do hypoxických buněk.<sup>98</sup> Matrixové metaloproteinázy jsou endopeptidázy, které ke své funkci vyžadují zinek.<sup>99</sup> Předpokládá se, že sehrávají roli v šíření rakoviny a jiných chorob. Jsou totiž schopné rozkládat proteiny extracelulární matrix, což v případě nádorových buněk primárních tumorů usnadňuje migraci nádorových buněk a následné metastázování.<sup>100</sup> Bylo vyvinuto několik exogenních inhibitorů MMP za účelem omezení metastázování u pacientů trpících rakovinou, žádný však nebyl klinicky schválen.<sup>101</sup> Hlavní nevýhodou některých těchto látek je přítomnost volné hydroxamové skupiny, což může vést k nespecifickým reakcím mezi touto skupinou a biomolekulami. Ty pak mohou mít za následek špatnou orální biodostupnost, kterou tyto látky vykazovaly v klinických testech.<sup>102</sup> Pokus o vyřešení tohoto problému proběhl pomocí navázání inhibitorů MMP prostřednictvím hydroxamové skupiny na komplex Co(III) a tris(2-methylpyridyl)aminu (TPA).<sup>98</sup> To umožnilo MMP inhibitoru zůstat v neaktivní podobě v oblastech s dostatkem kyslíku a následně - po redukcí inertního Co(III) komplexu - selektivní uvolnění na hypoxických místech. Nejdříve bylo provedeno studium elektrochemických vlastností na systémech obsahujících jednoduché alkyl a aryl hydroxamové ligandy. V rámci



**Obr. 16:** Komplexy **8**, **9**, **10** a **11** odvozené od systému Co(III)-TPA

tohoto studia byly tedy připraveny komplexy [Co(TPA)(H-aha)]ClO<sub>4</sub>, (aha = acetohydroxamová kyselina) (**8**), [Co(TPA)(H-pha)]ClO<sub>4</sub> (pha = propionhydroxamová kyselina) (**9**) a [Co(TPA)(H-bha)]ClO<sub>4</sub> (bha = benzohydroxamová kyselina) (**10**) (Obr. 16). Bylo zjištěno, že systém Co(III)-TPA může sloužit jako vhodný přenašeč pro sloučeniny

odvozené od hydroxamových kyselin na místo určení - hypoxické oblasti.<sup>103</sup> Následně proběhla příprava komplexu obsahujícího inhibitor MMP, marimastat, za vzniku  $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{mmst})]\text{ClO}_4$  ( $\text{H}_2\text{-mmst}$  = marimastat) (**11**) (Obr. 13). Tento komplex potlačil růst buněk nádorové linie 4T1.2 (karcinom prsu) u myši lépe než samotný marimastat.<sup>98</sup>

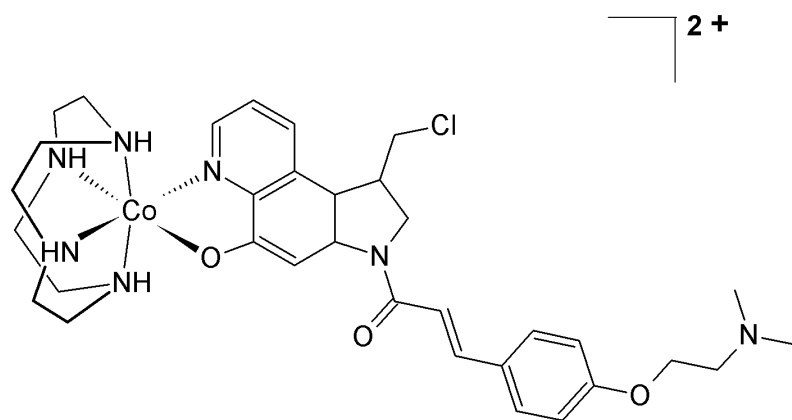


**Obr. 17:** Komplexy **12**  $[\text{Co}(\text{cyklen})(8\text{-HQ})]^{2+}$  a **13**  $[\text{Co}(\text{cyklen})(\text{azaCBI})]^{2+}$

tetraazacyklododekan (cyklen). Tyto látky byly využity pro transport cytotoxických ligandů jako jsou 8-hydrochinolin (8-HQ) nebo také azachloromethylbenzindolin (azaCBI). Byly získány série komplexů s nesubstituovanými i různě substituovanými cyklenovými ligandy a zmíněnými cytotoxickými činidly. Komplexy typu  $[\text{Co}(\text{cyklen})(8\text{-HQ})]^{2+}$  (**12**) (Obr. 17a) a  $[\text{Co}(\text{cyklen})(\text{azaCBI})]^{2+}$  (**13**) (Obr.17b) byly účinně redukovány za uvolnění cytotoxinu, přičemž komplex **13** vykazoval hypoxickou selektivitu (20 násobnou) vůči buňkám kolorektálního adenokarcinomu HT29.<sup>104,105,106</sup> Substituce cyklen ligandu na pozici 1 a 7 pomocí sulfonáto, fosfonáto či karboxyláto skupin si kladla za cíl zlepšení rozpustnosti a stability. Podařilo se dosáhnout zvýšení rozpustnosti, stabilita a hypoxická selektivita však zůstala srovnatelná s výchozími sloučeninami.<sup>107</sup>

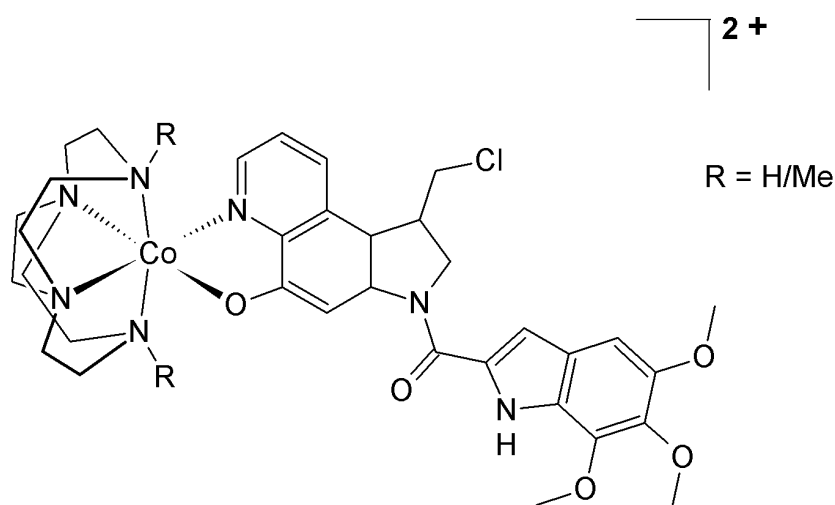
Modifikace řetězce azaCBI dala vzniknout sloučeninám s vyšší selektivitou. Začleněním dimethylaminoethanolové skupiny (dmae) do pyrrolochinolinového systému v azaCBI byl získán komplex  $[\text{Co}(\text{cyklen})(\text{azaCBI-dmae})]^{2+}$  (**14**) (Obr. 18), který vykazoval

slibnou hypoxickou selektivitu vůči buňkám karcinomu plic A549 (31 násobnou) a buňkám karcinomu vaječníku SKOV3 (41 násobnou).<sup>108</sup>



**Obr. 18:** Komplex 14

Jako chaperony pro přenos ligandu azaCBI byly využity i prekurzorové sloučeniny využívající makrocyclické ligandy typu 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyklam). Ze vzniklých komplexů typu  $[\text{Co}(\text{cyklam})(\text{azaCBI})]^{2+}$  (**15**) (Obr. 19) prokázal největší hypoxickou



**Obr.19:** Komplex 15

selektivitu v této sérii komplex s nesubstituovaným cyklam-ligandem ( $\text{R} = \text{H}$ ) - dosáhl 81-212 násobné toxicity vůči hypoxickým buňkám značného spektra nádorových linií - A375 (kožní melanom), A-549 (plicní karcinom), C-33A (rakovina děložního hrdla), H1299 (plicní karcinom), H460 (plicní karcinom), HCT116 (kolorektální karcinom), PC3 (karcinom prostaty) či SiHa (rakovina děložního hrdla).<sup>109</sup> Za zmínku stojí, že cytotoxicita tohoto komplexu se nezvýšila v buněčných liniích, které nadměrně exprimovaly jedoelektronovou reduktázu - NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktázu, která je považována za iniciátora aktivace jiných hypoxických činidel. Vzhledem k těmto výsledkům je totožnost reduktázy či neenzymatického



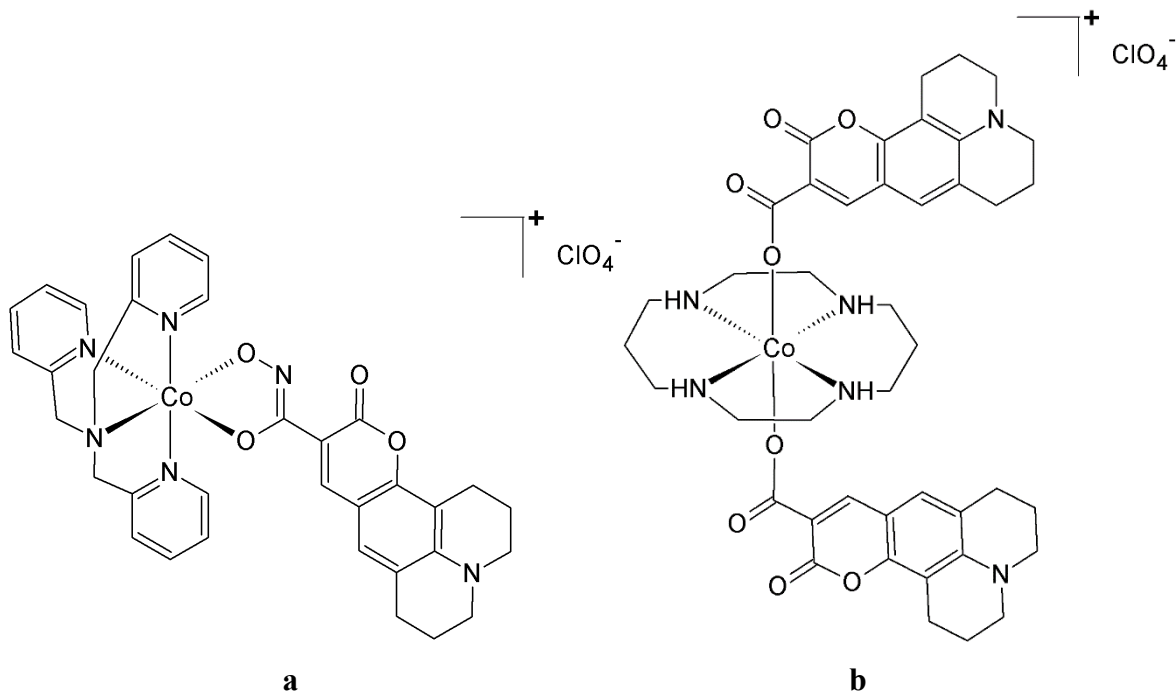
redukčního činidla, které jsou zodpovědné za redukci těchto komplexů, stále neznámá.<sup>110</sup> Byla zformulována teorie, že díky značné lipofilitě těchto komplexů dochází k akumulaci mitochondrií, což následně vede k redukci prostřednictvím mitochondriálního elektronového transportního řetězce. K této teorii však neexistuje žádný experimentální důkaz.<sup>106</sup>

### 3.1.3 Co(III) komplexy s fluorofory

Jak již bylo zmíněno výše, přesný mechanismus bioredukce prekurzorových komplexů Co(III) za uvolnění labilnějších Co(II) komplexů a biologicky aktivních ligandů není dosud spolehlivě znám. Bylo tedy provedeno několik studií za využití fluoroforů jakožto ligandů, které samy vykazují biologickou funkci a jejichž fluorescence je potlačena koordinací na kovové centrum kobaltu. Předpokladem je, že po redukci by prekurzorové komplexy měly uvolnit tyto fluorofory, čímž by mělo dojít ke spuštění fluorescence těchto ligandů.<sup>77</sup>

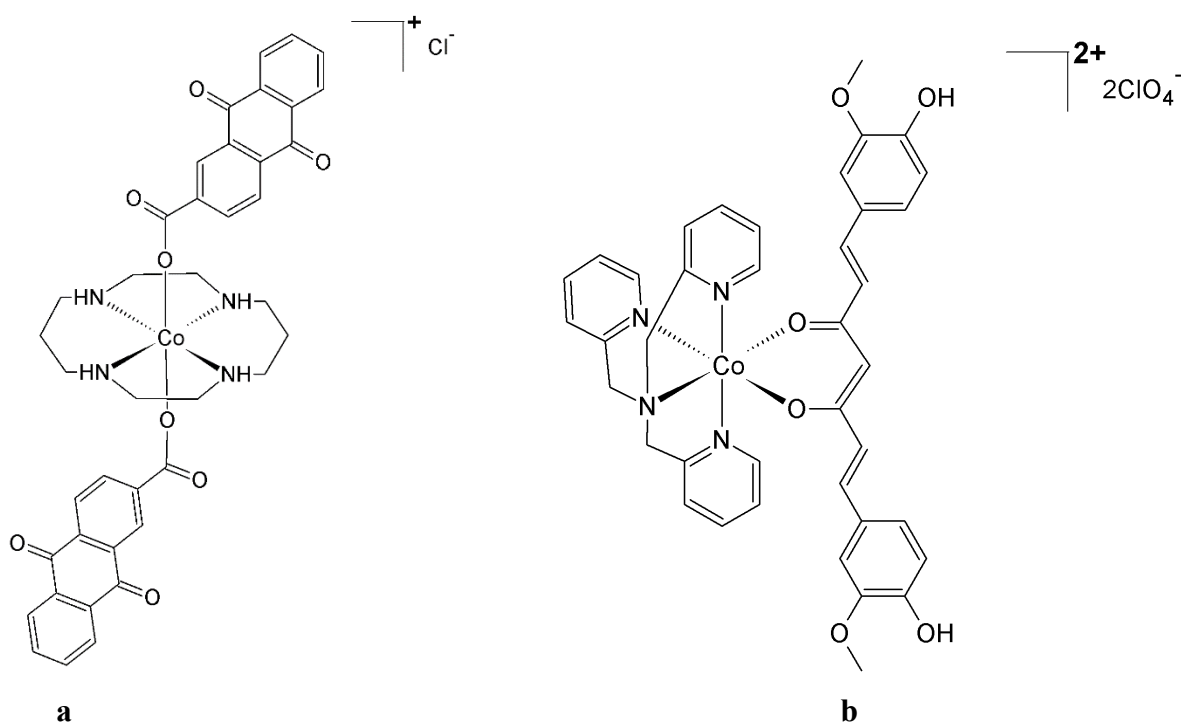
Jako systémy pro doručení těchto ligandů byly použity již zmiňované komplexy Co(III)-TPA a Co(III)-cyklam. Fluorescenčními ligandy se staly kumarin-343 (H-c343) a jeho hydroxamový derivát (H<sub>2</sub>ha-c343). Byly tak připraveny komplexy o složení [Co(TPA)(H<sub>2</sub>ha-c343)]ClO<sub>4</sub> (**16**) (Obr. 20a) a [Co(cyklam)(H-c343)]ClO<sub>4</sub> (**17**) (Obr. 20b). Dle předpokladu byla fluorescence kumarinových ligandů koordinovaných na Co(III) centrum neaktivní. Po přidání biologických reductantů, kyseliny askorbové a glutathionu, došlo k částečné aktivaci fluorescence, z čehož lze usuzovat, že fluorofory byly uvolněny prostřednictvím ligandové výměny a nikoliv redukcí Co(III) centra. Cytotoxicita komplexů byla testována *in vitro* na nádorové buněčné linii A2780 (karcinom vaječnicků), komplex **17** prokázal aktivitu v mikromolárním rozsahu.<sup>111</sup>

Bryce *et al.* dále připravili sérii komplexů odvozených opět od Co(III)-cyklamového jádra. Komplex **18** s nejvyšší selektivitou o složení [Co(cyklam)(AQ2CH)]Cl (Obr. 21a) obsahoval dva axiálně vázané anthrachinon-2-karboxylátové ligandy (AQ2CH). Na rozdíl od předchozího obdobného komplexu **17** intenzita fluorescence za hypoxických podmínek u **18** vzrůstala pouze za přítomnosti askorbátu, což vede k předpokladu, že uvolnění ligandu je hypoxicky selektivní a závislé na bioredukci. Studium mnohobuněčného sféroidového modelu sestávajícího z buněk DLD-1 (karcinom tlustého střeva) pomocí konfokální mikroskopie ukázalo, že komplex **18** proniká hluboko do sféroidu a za hypoxických podmínek selektivně



**Obr. 20:** Komplexy **16**  $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{H}_2\text{ha-c343})]\text{ClO}_4$  a **17**  $[\text{Co}(\text{cyklam})(\text{H-c343})]\text{ClO}_4$

uvolňuje ligandy AQ2CH.<sup>112</sup> Získané látky prokázaly pH-dependentní akumulaci v nádorových buňkách a dobrou schopnost průniku do pevných tumorů, což značí, že vysoká hypoxická i pH selektivita může být dosažena optimalizací redoxních potenciálů chaperonových komplexů.<sup>113</sup>



**Obr. 21:** Komplexy **18** a **19**

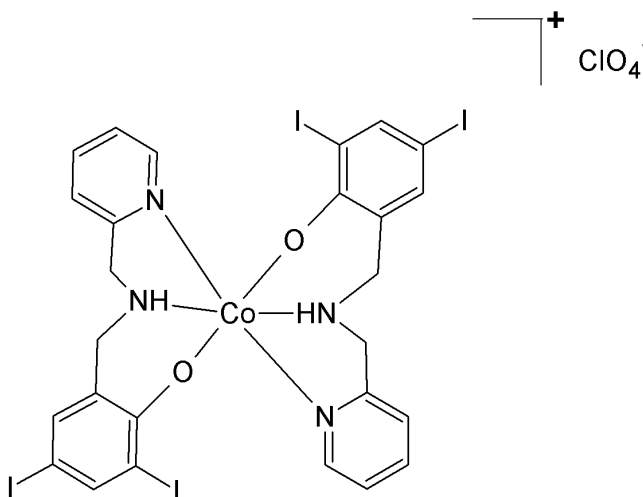
Byla připravena také série komplexů Co(III)-TPA s fluorescenčními ligandy odvozenými od kurkuminů, kdy se jako nejvhodnější systém pro dopravu látek na této bázi jeví komplex  $[\text{Co}(\text{TPA})(\text{kurkumin})](\text{ClO}_4)_2$  (**19**) (Obr. 21b), který vykazoval dobrou stabilitu a rozpustnost, zvyšoval schopnost pronikat do tumoru, kde byl následně bioredukční aktivací uvolněn ligand.<sup>114</sup>

### 3.2 Další Co(III) komplexy s biologickou aktivitou

Kobaltité komplexy se také projeví jako samostatná léčiva vykazující široké spektrum účinků. Některé komplexy vystupují jako antibakteriální, antiprotozoální či antivirotická léčiva.

Komplexy schopné inhibice proteazomu skrze ligandovou výměnu s aminokyselinovými zbytky v aktivním místě studoval Tomco *et al.* Nejzajímavější účinky vykazoval komplex  $[\text{Co}(\text{L}^{\text{NNO}})_2]\text{ClO}_4$  (**20**) (Obr. 22), kdy jako ligand  $\text{HL}^{\text{NNO}}$  vystupoval 2,4-diiodo-6-((pyridin-2-ylmethylamino)methyl)fenol, který díky stabilitě oxidačního stavu Co(III) umožnil lepší biodostupnost.<sup>115</sup>

Další zajímavé vlastnosti projeví kobaltité komplexy v kombinaci s antimalariky jako quinakrin (QNC), amodiaquin (AQ), trimethoprim (TMP) či chloroquin (CQ).

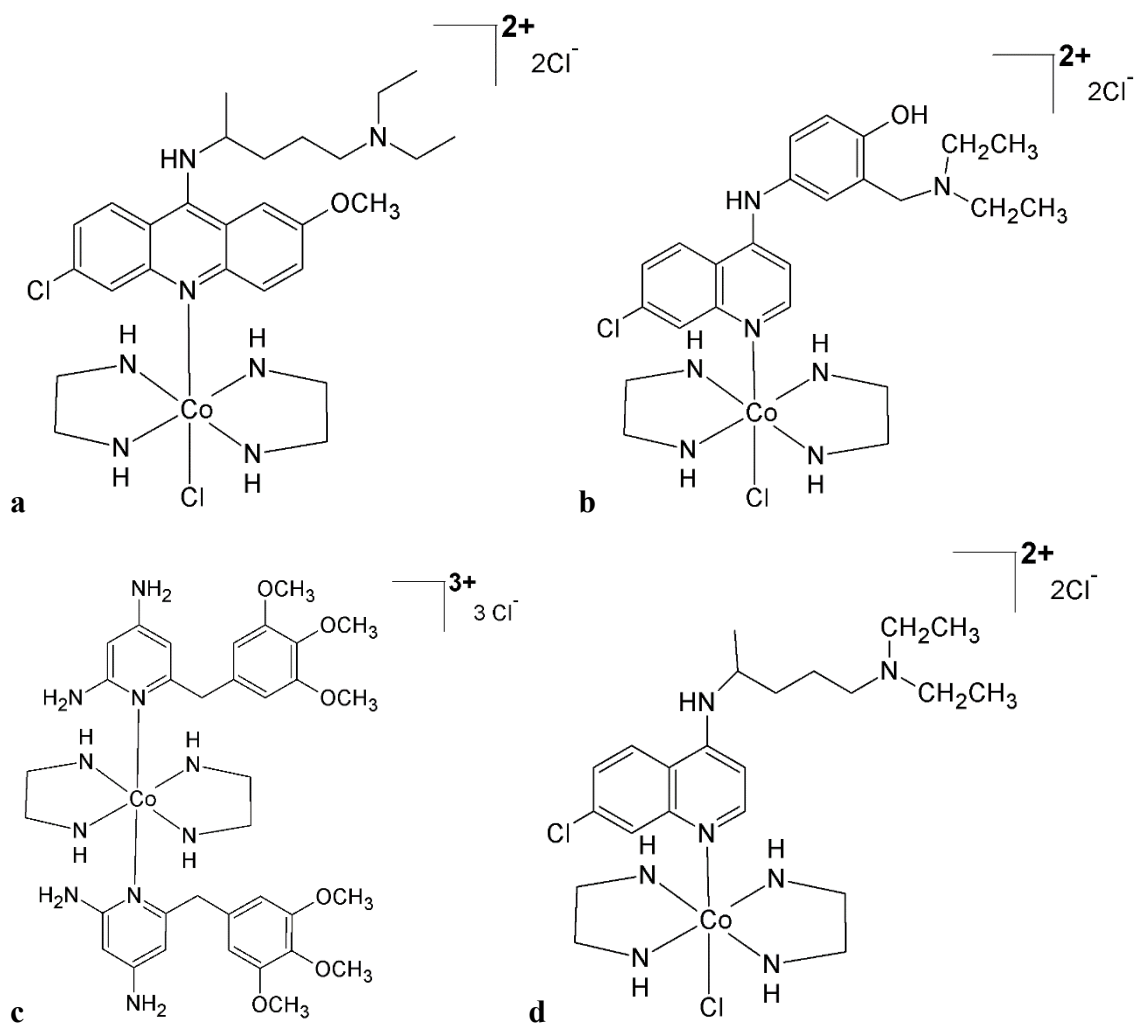


Obr. 22: Komplex **20**  $[\text{Co}(\text{L}^{\text{NNO}})_2]\text{ClO}_4$

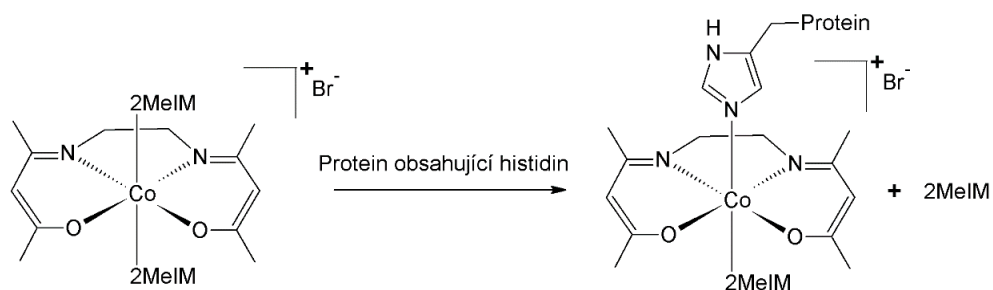
Získané komplexy  $[\text{Co}(\text{QNC})(\text{en})_2\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**21**) (Obr. 23a),  $[\text{Co}(\text{AQ})(\text{en})_2\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**22**) (Obr. 23b)  $[\text{Co}(\text{TMP})_2(\text{en})_2]\text{Cl}_3$  (**23**) (Obr. 23c) a  $[\text{Co}(\text{CQ})(\text{en})_2\text{Cl}]\text{Cl}_2$  (**24**) (Obr. 23d) vykazovaly zajímavé hodnoty toxicity (0,01-30  $\mu\text{M}$ ) vůči prvokům rodu *Plasmodia* a *Trypanosoma*.<sup>116</sup>

Zřejmě nejznámější a také klinicky nejvýznamnější jsou Co(III) komplexy s antibakteriální a antivirotickou aktivitou. Nejslibnější skupinou je série CTC komplexů obsahující N a O donorové ligandy odvozená od chelatujících Schiffových bází. Jako ligandy zde byly použity deriváty imidazolu. Nejvýznamnější látkou z této série, a možná vůbec ze všech biologicky zajímavých komplexů Co(III), je již v úvodu této kapitoly zmiňovaný CTC-96, registrovaný jako **Doxovir** firmou Redox Pharmaceutical Corporation<sup>117</sup>. Jedná se o komplex bis(acetylaceton)ethylendiiminu, který axiálně váže dvě molekuly 2-methylimidazolu -  $[\text{Co}(\text{acacen})(2\text{MeIM})]\text{Br}$  (**25**) (Obr. 24). Již roku 1998 provedl Epstein *et al.* studium, kde se prokázalo, že CTC-96 je účinný při léčbě herpetické keratitidy, způsobované virem *Herpes*

*Simplex* typu 1 (HSV-1) (také *Herpes labialis*).<sup>118</sup> Přesný mechanismus účinku této třídy komplexů není dosud znám, ale předpokládá se, že svého účinku dosahují kovalentní vazbou na histidinové residua v aktivním centru enzymu, jež je klíčový pro replikaci viru.<sup>119</sup> Byla hlášena také aktivita CTC-96 proti adenoviru a keratokonjunktivitidě způsobené adenovirem.<sup>120</sup>



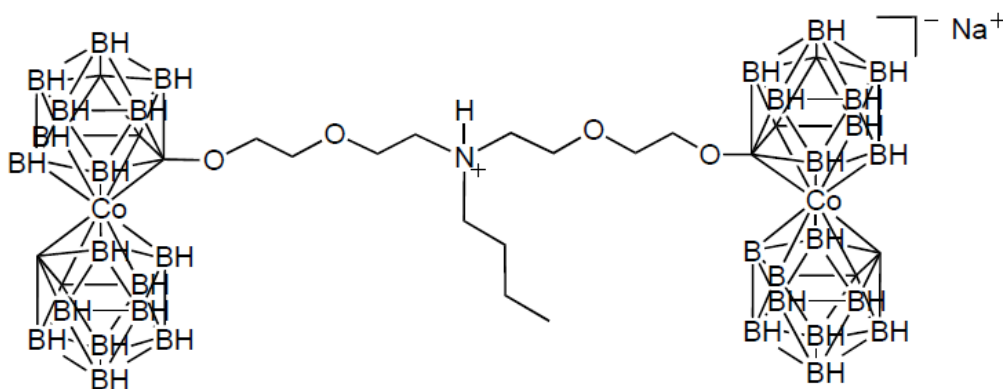
**Obr. 23:** Komplexy 21-24



**Obr. 24:** CTC-96 Doxovir (25) a předpokládaný mechanismus účinku

Typický Wernerovský komplex  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  „Cohex“, je dlouho známý a snadno připravitelný. Roku 2008 byla provedena studie Delehantym *et al.*, ve které bylo pozorováno, že Cohex značně inhibuje replikaci *Sindbis* viru s hodnotami  $\text{IC}_{50}$  kolem 0,1 mM.<sup>121</sup>

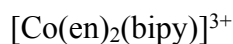
Zajímavá je také studie karboranů (zvané také dikarbolidy), které sendvičově váží kovové ionty jako je Co(III). Karborany jsou klastry obsahující uhlík a bor. Bylo popsáno využití systémů obsahujících kobalt-bis(1,2-karbolid) jakožto antivirotik, působících zejména jako inhibitory HIV proteázy, což umožňuje narušení maturace viru. Nejvýraznější aktivitu vykazovala sloučenina **26** (Obr. 25), jež vykazovala inhibici HIV-1 kmene již v 250 nM koncentraci.<sup>122</sup>



**Obr. 25:** Karboranový klastr obsahující Co(III) **26**

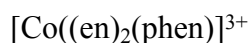
Dále bylo studováno množství kationtových komplexů typu  $[\text{Co}(\text{en})_2\text{L}]^{3+}$ , kdy jako ligand L vystupovalo množství elektroneutrálních sloučenin. Nejvýraznější antibakteriální působení proti *E. coli* vykazovaly

sloučeniny, kdy se jako ligand L uplatnily bidentátní chelatující ligandy bipyridin

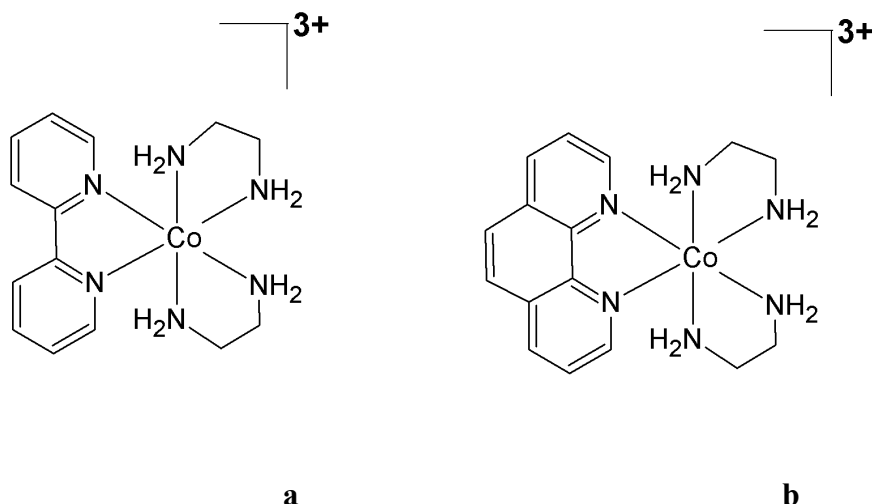


**(27)** (Obr. 26a) a

1,10-fenantrolin

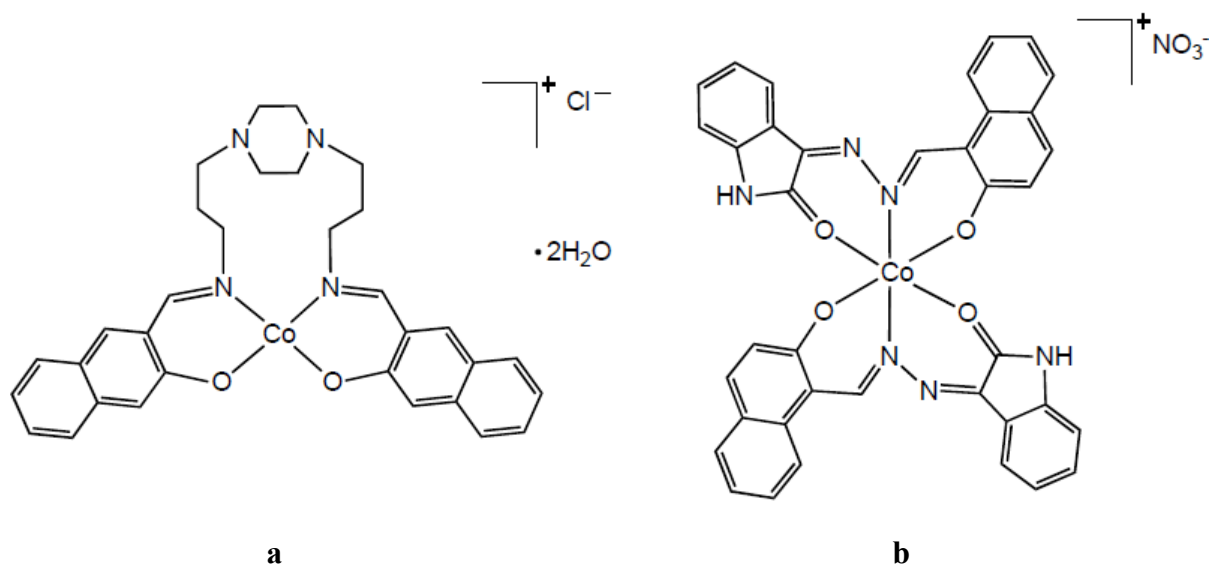


**(28)** (Obr. 26b).<sup>123</sup>



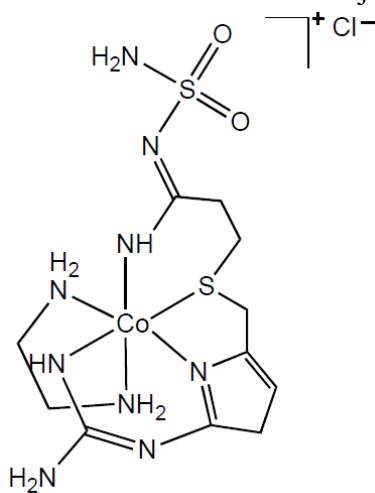
**Obr. 26:** Komplexy **27** a **28**

Zajímavým případem je tetraedrický Co(III) komplex využívající jako ligand Schiffovu bázi 1,4-bis[3-(2-hydroxy-1-naftaldimin)propyl]piperazin (bappnaf), [Co(bappnaf)]Cl·2H<sub>2</sub>O (**29**) (Obr. 27a).<sup>124</sup> Obdobný komplex s ligandem [(2-hydroxy-1-naftaldehyd)-3-isatin]-bishydrazon (HNIB) o složení [Co(NIB)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**30**) (Obr. 27b) spolu s **29** vykazoval široké spektrum antibakteriální aktivity, kdy oba komplexy projevily lepší aktivitu než samotný ligand.<sup>125</sup>



**Obr. 27:** Komplexy **29** a **30**

Komplexy kobaltité, které obsahují mezi svými donorovými atomy síru představují zajímavou třídu Co(III) komplexů s antibakteriálními vlastnostmi.<sup>126,127</sup> Zajímavé vlastnosti projevil komplex Co(III) obsahující famotidin - tetradentátní N, N, N, S ligand, který našel uplatnění při léčbě žaludečních vředů, refluxní ezofagitidy, Zollinger-Ellisonova syndromu, ale také Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby (H<sub>2</sub>famotidin). Komplex o složení [Co(en)(famotidin)]Cl (**31**) (Obr. 28) prokázal aktivitu lepší než samotný famotidin proti bakteriím *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*. Byla testována i antimykotická aktivita proti *Aspergillus niger* a *Candida albicans*, kdy se komplex opět projevil jako účinnější než samostatný ligand.<sup>128</sup>



**Obr. 28:** Komplex **31** [Co(en)(famotidin)]Cl

## 4. Praktická část

Experimentální část této práce je založena na přípravě a charakterizaci komplexních sloučenin Co(III) s pentadentátními Schiffovými bázemi, kdy šesté koordinační místo obsazuje halogenido/pseudohalogenidový či potenciálně biologicky aktivní ligand. Připravená série komplexů o složení  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1})]$  či  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1}')](\text{NO}_3)$  ( $\text{H}_2\text{L5}$  je Schiffova báze,  $\text{L1}^-$  je halogenidový, pseudohalogenidový či karboxylátový ligand a  $\text{L1}'$  je *N*-donorový heterocyklický elektroneutrální ligand) byla poté charakterizována analytickými metodami. Proběhlo větší množství syntéz, než je uvedeno v této práci, ale sloučeninu se ne vždy podařilo izolovat jako chemické individuum.

Komplexy Co(III) se Schiffovými bázemi byly zvoleny kvůli své podobnosti s výše zmiňovanými komplexy typu Doxovir, jež prokázaly svou účinnost jako samostatná léčiva. Cílem je také zjistit, zda koordinační sloučeniny se Schiffovými bázemi mohou sloužit jako systémy vhodné pro doručování bioaktivních ligandů a jako prekurzory pro hypoxicky aktivované látky s potenciálním terapeutickým účinkem.

### 4.1. Použité chemikálie, instrumentace a podmínky

Chlorid kobaltnatý, chlorid kobaltnatý hexahydrát, dusičnan kobaltnatý, dusičnan kobaltnatý hexahydrát, octan kobaltnatý hexahydrát, 3,5-dibromosalicylaldehyd, 3,5-diiodosalicylaldehyd, 3,5-dichlorosalicylaldehyd, 4-hydroxysalicylaldehyd, 2-hydroxynaftaldehyd, *N,N*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propandiamin (pet), diamino-*N*-methyl-dipropylamin (dptm), azid sodný, adenin (ade), benzimidazol (BeIM), 1-methylimidazol (1-MeIM), 2-methylimidazol (2-MeIM), imidazol (IM), 4-pikolin, kyanatan draselný, thiokyanatan draselný, kyselina dichloroctová, dichloracetát stříbrný (AgdiClac), dusičnan stříbrný, triethylamin, methanol (MeOH, p.a.), ethanol (EtOH, p.a.), dichlormethan (DCM, p.a.), *N,N*-dimethylformamid (DMF, p.a.), tetrabutylamonium perchlorát (TBAP, p.a.). Použité chemikálie byly získány z komerčních zdrojů (Fischer Scientific, Sigma-Aldrich, Lachema) a vyjma 2-hydroxynaftaldehydu byly použity bez purifikace.

Elementární analýza (C, H, N, S) byla stanovena na analyzáru *Flash 2000 CHNS-O* (ThermoScientific). FTIR spektra byla získána za pomoci spektrometru *Nexus 670 FT-IR* (ThermoNicolet) (v rozsahu 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Měření UV/Vis absorpčních spekter bylo provedeno na spektrometru *Perkin-Elmer Lambda40* (v rozsahu 250-1000 nm pro roztoky komplexů v DMF o koncentraci  $10^{-3}$  M a v rozsahu 450-900 nm pro nujolové suspenze). Cyklická voltametrie byla naměřena na potenciostatu *CHI600C* (CH Instruments) (1mM

roztoky komplexů v MeCN a 0,1M TBAP, rozmezí od -1 do 1,2 V, 25°C, rychlost skenování 0,2 V/s; pracovní elektroda z leštěného grafitu, pomocná platinová elektroda, referenční elektroda (RE) Ag/AgNO<sub>3</sub>). Krystalová struktura několika komplexů byla stanovena na základě údajů získaných na monokrystalovém difraktometru *D8 QUEST (Bruker)* s *PHOTON 100 CMOS* detektorem. Termogravimetrická analýza (TG) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) byly provedeny na TG/DSC termickém analyzátoru *STA449 F1 (Netzsch)* s nízkoteplotní a vysokoteplotní pecí a autosamplerem (do 300°C).

U dvou vybraných komplexů bylo také provedeno stanovení protinádorové aktivity na buněčných liniích (MCF7 - prsní karcinom; PANC-1 - karcinom slinivky břišní; HT29 - kolorektální adenokarcinom; MRC5 - plicní fibroblast; A2780 - karcinom vaječníku a A2780R - karcinom vaječníku rezistentní na cisplatinu) za pomoci MTT testu.

## 4.2 Syntéza ligandů

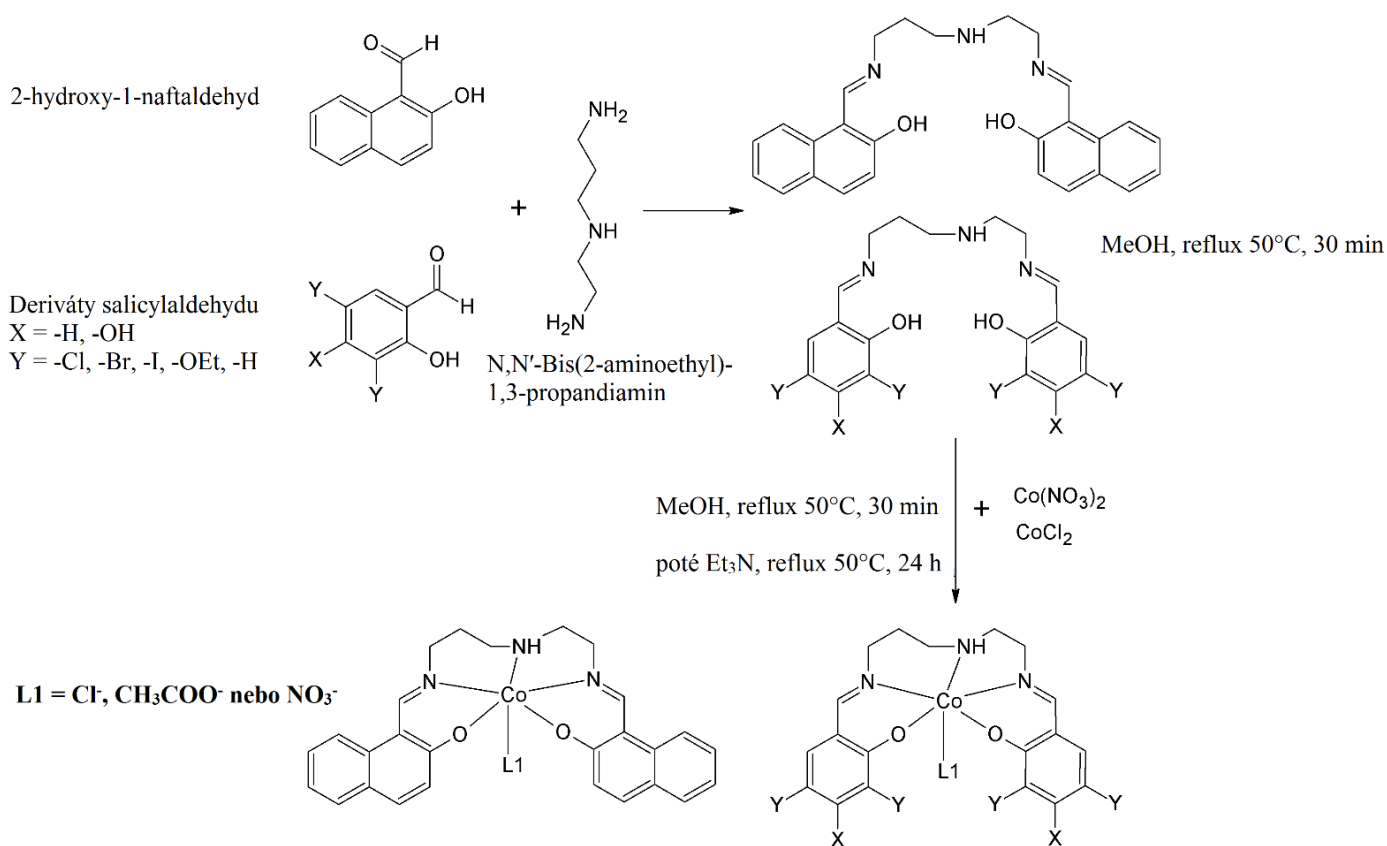
Příprava samotných pentadentátních Schiffových bází probíhala reakcí příslušného aldehydu se stechiometrickým množstvím alifatického aminu. 5 mmol 3,5-dichlorosalicylaldehydu nebo 2-hydroxynaftaldehydu bylo rozpuštěno za pomoci ultrazvukové lázně v 15-20 ml methanolu. Následně bylo k roztoku přidáno 2,5 mmol alifatického aminu *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propandiaminu (pet), směs byla poté 30 minut míchána a zahřívána při 50°C pod zpětným chladičem. Směs byla poté ochlazena a následně byla izolována žlutá či tmavě žlutá látka práškového charakteru (Obr. 29). Tímto způsobem proběhla příprava dvou ligandů **H<sub>2</sub>L5** - *N,N'*-bis(3,5-dichloro-2-hydroxybenzyliden)-1,6-diamino-3-azahexanu (**H<sub>2</sub>3,5Cl-salpet**) a *N,N'*-bis(2-hydroxynaftyliden)-1,6-diamino-3-azahexanu (**H<sub>2</sub>napet**).

## 4.3 Syntéza komplexů

Příprava výchozích kobaltitých komplexů probíhala v prvním kroku obdobně jako syntéza ligandů a byla provedena s úpravami podle publikovaného postupu přípravy analogických sloučenin.<sup>129</sup> 5 mmol vybraného aldehydu (3,5-dibromosalicylaldehydu, 3,5-diiodosalicylaldehydu, 3,5-dichlorosalicylaldehydu, 4-hydroxysalicylaldehydu nebo 2-hydroxynaftaldehydu) bylo rozpuštěno v 15-20 ml methanolu. K roztoku bylo poté přidáno 2,5 mmol zvoleného alifatického aminu - *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propandiaminu (pet) nebo diamino-*N*-methyl-dipropylaminu (dptm), směs byla 30 minut zahřívána na 50°C, míchána, a po 30 minutách byl přidán roztok 2,5 mmol vybrané kobaltnaté soli (chlorid kobaltnatý, chlorid kobaltnatý hexahydrát, dusičnan kobaltnatý, dusičnan kobaltnatý hexahydrát, octan kobaltnatý hydrát) v 10 ml MeOH. Tato směs byla pod zpětným chladičem zahřívána dalších 30 minut ma



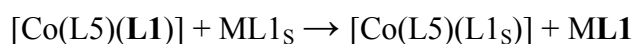
50°C, načež bylo přidáno 5 mmol triethylaminu (2,5 mmol v případě použití hydrátu octanu kobaltnatého). Reakční směs byla poté dále míchána, zahřívána na 50°C do následujícího dne (24 h) (Obr. 29, analogicky také s dptm). Po ochlazení byla směs ponechána volně se odpařovat, poté byl komplex separován, promyt methanolem a vysušen na vzduchu. Byly získány černé, hnědé či tmavě zelené práškovité látky obecného složení  $[\text{Co}(\text{L}5)(\text{L}1)]$ . Ligandy obecně značíme dle použitého aldehydu a aminu jako **H<sub>2</sub>3,5Br-saldptm** (3,5-dibromosalicylaldehyd a dptm), **H<sub>2</sub>3,5I-saldptm** (3,5-diiodosalicylaldehyd a dptm), **H<sub>2</sub>3,5Cl-salpet/H<sub>2</sub>3,5Cl-saldptm** (3,5-dichlorosalicylaldehyd a pet/dptm), **H<sub>2</sub>4OH-salpet** (4-hydroxysalicylaldehyd a pet) a **H<sub>2</sub>napet** (2-hydroxynaftaldehyd a pet).



**Obr. 29:** Schema přípravy Co(III) komplexů typu  $[\text{Co}(\text{L}5)(\text{L}1)]$ .

## Substituce ligandu L1

Dalším krokem byla substituce ligandu L1 ve výchozím komplexu typu  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1})]$ . Bylo využito dichloracetátu stříbrného nebo pseudohalogenidových solí (azid sodný, kyanatan draselný, thiokyanatan draselný) ( $\text{ML}_s$ ). Tyto soli následně reagovaly s ekvimolárním množstvím výchozího komplexu po dobu 24 hodin dle schématu:



Nevýhodou této substituce bylo v případě využití sodných či draselných solí znečištění komplexu vedlejšími produkty a délka reakce. Výsledný komplex byl poté promyt methanolem a vodou a vysušen na vzduchu. Získané látky byly většinou hnědé či černé.

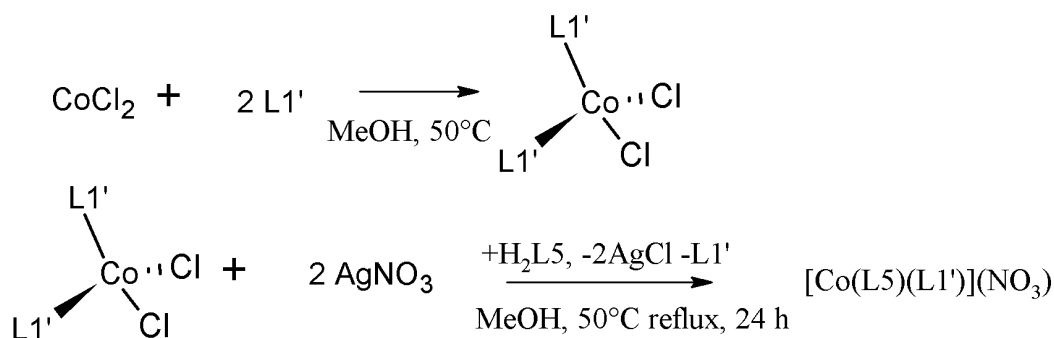
## 4.4 Syntéza přes tetraedrické komplexy Co(II)

Při přípravě komplexů typu  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1}')](\text{NO}_3)$ , kdy jako ligand L1' vystupoval *N*-donorový heterocyklický elektroneutrální ligand, se vycházelo z tetraedrických komplexů Co(II) s příslušnými ligandy L1' (adenin, benzimidazol, 1-methylimidazol, 2-methylimidazol, imidazol, 4-pikolin). Při tomto typu syntézy byly využity také dříve připravené Schiffovy báze - ligandy  $\text{H}_2\text{L5}$ . Výchozí látkou při syntéze tetraedrických Co(II) komplexů byl chlorid kobaltnatý. 1g (7,7 mmol) bezvodého chloridu kobaltnatého byl rozpuštěn v 15 ml MeOH. K tomuto roztoku byl následně přidán roztok dvojnásobného látkového množství požadovaného ligandu L1' v 10 ml MeOH. Tato směs byla 10 minut míchána a zahřívána na 50°C a poté zbavena rozpouštědla pomocí proudu dusíku. Následně byly produkty promyty methanolem a eterem a poté byly izolovány produkty o složení  $[\text{Co}(\text{L1}')_2\text{Cl}_2]$ , jež byly modře zbarveny a vykazovaly práškovitý či krystalický charakter.

V dalším kroku bylo 100 mg připraveného Co(II) komplexu rozpuštěno ve 20 ml MeOH a poté bylo přidáno dvojnásobné látkové množství dusičnanu stříbrného rozpuštěné v 15 ml MeOH. Směs byla krátce míchána a následně z ní byl odfiltrován vznikající chlorid stříbrný. Poté byla k filtrátu přidána Schiffova báze  $\text{H}_2\text{L5}$  (množství ekvimolární s Co(II) komplexem) a tato směs byla pak míchána a zahřívána na 50°C do následujícího dne (4 h). Izolované komplexy obecného složení  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1}')](\text{NO}_3)$  byly většinou černého zbarvení a práškovitého charakteru (Obr. 30). Nevýhodou tohoto typu syntézy je potřeba pracovního kroku navíc a také nutnost nadbytečného množství *N*-donorového ligandu L1'. Oproti předchozímu typu syntézy však odpadá problém se znečištěním produktu, jelikož chlorid stříbrný je ihned odfiltrován.

Takto bylo získáno 5 tetraedrických kobaltnatých komplexů  $[\text{Co}(\text{BeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**1t**),  $[\text{Co}(1\text{-MeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**2t**),  $[\text{Co}(\text{IM})_2\text{Cl}_2]$  (**3t**),  $[\text{Co}(2\text{-MeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**4t**) a  $[\text{Co}(4\text{-pikolin})_2\text{Cl}_2]$  (**5t**).

Přestože kinetika těchto reakcí nebyla studována, vycházeli jsme z předpokladu, že probíhají výrazně rychleji, než kdybychom se pokoušeli o substituci výchozích inertních Co(III) komplexů s chlorido či nitrato ligandem na šestém koordinačním místě. Dochází zde totiž k oxidaci Co(II) komplexu s již navázanými heterocyklickými ligandy a současně také k vytěsnění jednoho heterocyklického ligandu díky chelatačnímu efektu použité pentadentátní Schiffovy báze.



**Obr. 30:** Schema syntézy komplexů typu  $[\text{Co}(\text{L5})(\text{L1}')](\text{NO}_3)$  přes Co(II) tetraedrické komplexy

## 4.5 Další provedené syntézy

Celkově bylo provedeno větší množství syntéz s různými typy Schiffových bází ( $\text{H}_2\text{L5}$ ), šestým ligandem L1 a různými typy tetraedrických Co(II) komplexů. Jako aldehydy pro přípravu Schiffových bází byly využity také 3-ethoxysalicylaldehyd, salicylaldehyd, 5-chlorosalicylaldehyd s různými kombinacemi alifatických aminů pet i dptm. Ligand L1 jsme se pokusili substituovat pomocí kyanidu draselného, fenylbutyrátu stříbrného, ale také pomocí levamizolu, pyrazinu, pyrazolu, pyridazinu, 3-pikolinu, 4-(dimethylamino)pyridinu, 6-amino-3-pikolinu, 2-aminopyridinu, 1-benzyl-2-methylimidazolu či 5-aminotetrazolu, v kombinaci s různými  $\text{H}_2\text{L5}$  Schiffovými bázemi. Látky získané z těchto reakcí se většinou nepodařilo separovat, jednalo se o olejovité či amorfnní substance. V jiných případech byly izolovány černé, hnědé či tmavě zelené práškovité látky, jejichž výsledky elementárních analýz však neodpovídaly teoretickému vypočtenému předpokládanému složení a tyto sloučeniny nebyly tedy považovány za chemická individua.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Získaná data

Bylo získáno 20 komplexů o složení  $[\text{Co}(3,5\text{Br-saldptm})(\text{ac})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**1p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-saldptm})\text{Cl}]\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  (**2p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(\text{N}_3)]$  (**3p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})\text{Cl}]$  (**4p**),  $[\text{Co}_2(3,5\text{Cl-salpet})_2(\text{Ade})](\text{NO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (**5p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})(\text{BeIM})](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**6p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})(1-\text{MeIM})](\text{NO}_3)$  (**7p**),  $[\text{Co}(\text{napet})\text{Cl}]$  (**8p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})(\text{IM})](\text{NO}_3)\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  (**9p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-saldptm})(\text{ac})]$  (**10p**),  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})(2-\text{MeIM})](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**11p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(\text{NO}_3)]$  (**12p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(2-\text{MeIM})](\text{NO}_3)\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  (**13p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(4\text{-pikolin})](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**14p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(\text{NCS})]$  (**15p**),  $[\text{Co}(3,5\text{I-saldptm})(\text{ac})]\cdot\text{H}_2\text{O}$  (**16p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(\text{diClac})]$  (**17p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(1-\text{MeIM})](\text{NO}_3)$  (**18p**),  $[\text{Co}(\text{napet})(\text{NCO})]$  (**19p**) a  $[\text{Co}(4\text{OH-salpet})(\text{NO}_3)]$  (**20p**).

**H<sub>2</sub>3,5Cl-salpet:** Světle žlutý prášek. Výtěžek: 79%. Elementární složení  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{Cl}_4\text{N}_3\text{O}_2$  ( $M_r = 463,2$ ) - vypočtené C(49,27); H(4,13); N(9,07); nalezené: C(48,94); H(4,27); N(8,86) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3066w v(N-H); 2927w, 2828m v( $\text{CH}_2$ ); 1623s v(C=N); 1433s v(Ar-OH).

**H<sub>2</sub>napet:** Tmavě žlutý prášek. Výtěžek: 71%. Elementární složení  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$  ( $M_r = 425,5$ ) - vypočtené C(76,21); H(6,40); N(9,87); nalezené: C(76,45); H(6,21); N(10,00) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3276w v(N-H); 2928m v( $\text{CH}_2$ ); 1623s v(C=N); 1541s, 1491m, 1440m v(C=C).

$[\text{Co}(\text{BeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**1t**): Tmavě modré krystalky. Výtěžek: 65%. Elementární složení  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{CoN}_4$  ( $M_r = 364,1$ ) - vypočtené C(46,18); H(2,77); N(15,39); nalezené: C(46,48); H(2,89); N(15,13) %.

$[\text{Co}(1-\text{MeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**2t**): Modré krystalky. Výtěžek: 72%. Elementární složení  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{CoN}_4$  ( $M_r = 294,0$ ) - vypočtené C(32,68); H(4,11); N(19,05); nalezené: C(32,76); H(4,14); N(18,91) %.

$[\text{Co}(\text{IM})_2\text{Cl}_2]$  (**3t**): Modré krystalky. Výtěžek: 56%. Elementární složení  $\text{C}_6\text{H}_8\text{Cl}_2\text{CoN}_4$  ( $M_r = 266,0$ ) - vypočtené C(27,09); H(3,03); N(21,06); nalezené: C(27,07); H(2,99); N(20,79) %.

$[\text{Co}(2-\text{MeIM})_2\text{Cl}_2]$  (**4t**): Modré krystalky. Výtěžek: 76%. Elementární složení  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{CoN}_4$  ( $M_r = 294,0$ ) - vypočtené C(32,68); H(4,11); N(19,05); nalezené: C(32,62); H(4,26); N(19,08) %.

[Co(4-pikolin)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (**5t**): Tmavě modré krystalky. Výtěžek: 43%. Elementární složení C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>CoN<sub>2</sub> (Mr = 316,1) - vypočtené C(45,60); H(4,46); N(8,86); nalezené: C(45,46); H(4,52); N(9,00) %.

[Co(3,5Br-saldptm)(ac)]·H<sub>2</sub>O (**1p**): Tmavě zelený prášek. Výtěžek: 74%. Elementární složení C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>Br<sub>4</sub>CoN<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (Mr = 803,0) - vypočtené: C(34,40); H(3,26); N(5,35); nalezené: C(34,58); H(3,13); N(5,19) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3626m ν(OH)<sub>H<sub>2</sub>O</sub>; 2928m, 2864m ν(CH<sub>2</sub>); 1625s ν(C=N); 1576m, 1514w, 1429m ν(C=C). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 668/289 (*d-d*). Výsledky cyklické voltametrie (CV) (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -339/-115; ΔE = 224.

[Co(3,5Cl-saldptm)Cl]·0,5H<sub>2</sub>O (**2p**): Tmavě hnědý prášek. Výtěžek: 68%. Elementární složení C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>5</sub>CoN<sub>3</sub>O<sub>2,5</sub> (Mr = 592,6) - vypočtené: C(41,92); H(3,85); N(6,98); nalezené: C(42,03); H(3,79); N(7,13) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3314m, br ν(OH)<sub>H<sub>2</sub>O</sub>; 2924m, 2864m ν(CH<sub>2</sub>); 1629s ν(C=N); 1527w, 1443s ν(C=C). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 652/313 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -315/-110; ΔE = 205.

[Co(napet)(N<sub>3</sub>)] (**3p**): Hnědý prášek. Výtěžek: 36%. Elementární složení C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (Mr = 524,5) - vypočtené C(61,83); H(4,80); N(16,02); nalezené: C(61,66); H(4,99); N(15,89) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3226m ν(N-H); 2019s ν(N<sub>3</sub><sup>-</sup>); 1604s ν(C=N); 1539m, 1503m ν(C=C); 822m ν(Ar-H). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 648/148 (*d-d*); λ<sub>max</sub> (nujol; nm): 589. CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -687/675; ΔE = 1362.

[Co(3,5Cl-salpet)Cl] (**4p**): Černý prášek. Výtěžek: 62%. Elementární složení C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>5</sub>CoN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (Mr = 555,6) - vypočtené C(41,08); H(3,08); N(7,56); nalezené: C(41,02); H(3,12); N(7,33) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3232m ν(N-H); 2939m, 2917m ν(CH<sub>2</sub>); 1656s, 1623s ν(C=N); 1587w, 1451s ν(C=C). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 599/173 (*d-d*); λ<sub>max</sub> (nujol; nm): 570. CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = 170/544; ΔE = 374.

[Co<sub>2</sub>(3,5Cl-salpet)<sub>2</sub>(Ade)](NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O (**5p**): Černé krystalky. Výtěžek: <10% Elementární složení C<sub>43</sub>H<sub>46</sub>Cl<sub>8</sub>Co<sub>2</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub> (Mr = 1308,4) - vypočtené C(39,47); H(3,54); N(12,85); nalezené: C(39,61); H(3,49); N(13,00) %. λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 631/95 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -767/-318; ΔE = 449.

[Co(3,5Cl-salpet)(BeIM)](NO<sub>3</sub>)·H<sub>2</sub>O (**6p**): Černý prášek. Výtěžek: 52%. Elementární složení C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>4</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>6</sub> (Mr = 718,3) - vypočtené C(43,48); H(3,51); N(11,70); nalezené: C(43,82); H(3,46); N(12,23) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3426m, br ν(OH)<sub>H<sub>2</sub>O</sub>; 3110s ν(N-H); 2965m ν(CH<sub>2</sub>);

1624s  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1434s  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ; 1363s  $\nu(\text{NO}_3^-)$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 612/131 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -597/821$ ;  $\Delta E = 1418$ .

[Co(3,5Cl-salpet)(1-MeIM)](NO<sub>3</sub>) (**7p**): Černé krystalky. Výtěžek: 48%. Elementární složení C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>4</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (Mr = 664,2) - vypočtené C(41,59); H(3,49); N(12,65); nalezené: C(42,12); H(3,39); N(12,48) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3120s  $\nu(\text{N-H})$ ; 3054m  $\nu(\text{CH})$ ; 2933m, 2873w  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1647s, 1620s  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1590w, 1542w, 1445s  $\nu(\text{C}=\text{C})$ , 1371s  $\nu(\text{NO}_3^-)$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 603/121 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -492/-306$ ;  $\Delta E = 186$ .

[Co(napet)Cl] (**8p**): Hnědý prášek. Výtěžek: 61%. Elementární složení C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>ClCoN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (Mr = 517,9) - vypočtené C(62,62); H(4,87); N(8,11); nalezené: C(62,32); H(4,79); N(7,98) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3225m  $\nu(\text{N-H})$ ; 3039w  $\nu(\text{CH})$ ; 2928w  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1623s  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1540m, 1504w, 1437m  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ; 824m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 641/160 (*d-d*);  $\lambda_{\text{max}}$  (nujol; nm): 635. CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -794/713$ ;  $\Delta E = 1507$ .

[Co(3,5Cl-salpet)(IM)](NO<sub>3</sub>)·0,5H<sub>2</sub>O (**9p**): Černý prášek. Výtěžek: 39%. Elementární složení C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>4</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>5,5</sub> (Mr = 659,2) - vypočtené C(39,54); H(3,47); N(12,58); nalezené: C(39,84); H(3,36); N(13,06) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3518m, br  $\nu(\text{OH})_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 3159s  $\nu(\text{N-H})$ ; 2924s, 2853s  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1647m, 1623s  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1587w, 1452s, 1434m  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ; 1323s  $\nu(\text{NO}_3^-)$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 602/229 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -717/453$ ;  $\Delta E = 1170$ .

[Co(3,5Cl-saldptm)(ac)] (**10p**): Černý prášek. Výtěžek: 70%. Elementární složení C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>4</sub>CoN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Mr = 607,2) - vypočtené C(45,50); H(3,98); N(6,92); nalezené: C(45,19); H(3,99); N(6,69) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 2925m  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1636s, 1615s (C=N); 1445s, 1415w  $\nu(\text{C}=\text{C})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 639/418 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -564/-319$ ;  $\Delta E = 245$ .

[Co(3,5Cl-salpet)(2-MeIM)](NO<sub>3</sub>)·H<sub>2</sub>O (**11p**): Tmavě hnědý prášek. Výtěžek: 61%. Elementární složení C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>4</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>6</sub> (Mr = 681,2) - vypočtené C(40,55); H(3,55); N(12,34); nalezené: C(40,74); H(3,48); N(12,54) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3406s, br  $\nu(\text{OH})_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 3114s  $\nu(\text{N-H})$ ; 2925s  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1617s  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ; 1587m, 1520w, 1429s  $\nu(\text{C}=\text{C})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 606/308 (*d-d*);  $\lambda_{\text{max}}$  (nujol; nm): 584. CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -517/369$ ;  $\Delta E = 886$ .

[Co(napet)(NO<sub>3</sub>)] (**12p**): Tmavě hnědý prášek. Výtěžek: 66%. Elementární složení C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>CoN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (Mr = 544,4) - vypočtené C(59,56); H(4,63); N(10,29); nalezené: C(59,98);

H(4,91); N(10,12) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3245m  $\nu(\text{N-H})$ ; 1635s, 1607s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1541s, 1503m, 1437m  $\nu(\text{C=C})$ ; 1368m  $\nu(\text{NO}_3^-)$ ; 821m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 629/201 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -442/681$ ;  $\Delta E = 1123$ .

[Co(napet)(2-MeIM)]( $\text{NO}_3$ ) $\cdot$ 0,5 $\text{H}_2\text{O}$  (**13p**): Černý prášek. Výtěžek: 21%. Elementární složení  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{CoN}_6\text{O}_{5,5}$  ( $M_r = 635,5$ ) - vypočtené C(57,86); H(5,26); N(13,18); nalezené: C(58,02); H(5,09); N(13,22) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3468m, br  $\nu(\text{OH})_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 3211m  $\nu(\text{N-H})$ ; 2928m  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1619s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1540w, 1504m, 1435m  $\nu(\text{C=C})$ , 1338m  $\nu(\text{NO}_3^-)$ ; 833m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 638/189 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -385/649$ ;  $\Delta E = 1034$ .

[Co(napet)(4-pikolin)]( $\text{NO}_3$ ) $\cdot$ 0,5 $\text{H}_2\text{O}$  (**14p**): Černý prášek. Výtěžek: 27%. Elementární složení  $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{CoN}_5\text{O}_{5,5}$  ( $M_r = 646,6$ ) - vypočtené C(60,66); H(5,16); N(10,78); nalezené: C(60,45); H(5,22); N(10,71) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411m, br  $\nu(\text{OH})_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 3226m  $\nu(\text{N-H})$ ; 3051m  $\nu(\text{CH})$ ; 2934m  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1616s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1540m, 1505w, 1435m  $\nu(\text{C=C})$ ; 1336s  $\nu(\text{NO}_3^-)$ ; 826m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 631/103 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -552/256$ ;  $\Delta E = 808$ .

[Co(napet)(NCS)] (**15p**): Hnědý prášek. Výtěžek: 36%. Elementární složení  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{CoN}_4\text{O}_2\text{S}$  ( $M_r = 540,5$ ) - vypočtené C(62,22); H(4,66); N(10,37); nalezené: C(61,89); H(4,54); N(10,16) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3157m  $\nu(\text{N-H})$ ; 2932w, 2854w  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 2086s  $\nu(\text{NCS}^-)$ ; 1635s, 1617s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1539s, 1503m, 1434s  $\nu(\text{C=C})$ ; 828m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 590/209 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -448/512$ ;  $\Delta E = 960$ .

[Co(3,5I-saldptm)(ac)] $\cdot$  $\text{H}_2\text{O}$  (**16p**): Tmavě zelený prášek. Výtěžek: 76%. Elementární složení  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{CoI}_4\text{N}_3\text{O}_5$  ( $M_r = 991,0$ ) - vypočtené C(27,87); H(2,64); N(4,24); nalezené: C(28,02); H(2,48); N(4,12) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3320s, br  $\nu(\text{OH})_{\text{H}_2\text{O}}$ ; 2923s  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1624s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1564s, 1426s  $\nu(\text{C=C})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 643/301 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -269/-119$ ;  $\Delta E = 150$ .

[Co(napet)(diClac)] (**17p**): Tmavě hnědý prášek. Výtěžek: 20%. Elementární složení  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{CoN}_3\text{O}_4$  ( $M_r = 610,4$ ) - vypočtené C(57,07); H(4,29); N(6,88); nalezené: C(57,49); H(4,61); N(6,65) %. FTIR (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3217m  $\nu(\text{N-H})$ ; 3055m  $\nu(\text{CH})$ ; 2926w  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1618s  $\nu(\text{C=N})$ ; 1539m, 1506m, 1455m  $\nu(\text{C=C})$ ; 831m  $\nu(\text{Ar-H})$ .  $\lambda_{\text{max}}$  (roztok; nm)/ $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 609/287 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV):  $E_{\text{red}}/E_{\text{ox}} = -752/579$ ;  $\Delta E = 1331$ .

[Co(napet)(1-MeIM)](NO<sub>3</sub>) (**18p**): Tmavě hnědý prášek. Výtěžek: 38%. Elementární složení C<sub>31</sub>H<sub>31</sub>CoN<sub>6</sub>O<sub>5</sub> (Mr = 626,5) - vypočtené C(59,43); H(4,99); N(13,41); nalezené: C(59,66); H(5,28); N(13,30) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3129m v(N-H); 2929m v(CH<sub>2</sub>); 1616s v(C=N); 1540m, 1506m, 1436m v(C=C), 1337s v(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 826m v(Ar-H). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 600/117 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -765/242; ΔE = 1007.

[Co(napet)(NCO)] (**19p**): Hnědý prášek. Výtěžek: 28%. Elementární složení C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>CoN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (Mr = 524,5) - vypočtené C(64,12); H(4,80); N(10,68); nalezené: C(64,26); H(4,83); N(10,28) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3202m v(N-H); 3051w v(CH); 2980w, 2929w v(CH<sub>2</sub>); 2209s v(NCO<sup>-</sup>); 1635s, 1608s v(C=N); 1540s, 1503m, 1451s v(C=C); 827m v(Ar-H). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 620/216 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -737/516; ΔE = 1253.

[Co(4OH-salpet)(NO<sub>3</sub>)] (**20p**): Hnědý prášek. Výtěžek: 19%. Elementární složení C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>CoN<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (Mr = 476,3) - vypočtené C(47,91); H(4,44); N(11,76); nalezené: C(48,27); H(4,83); N(11,28) %. FTIR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3212s, br v(N-H); 2931s v(CH<sub>2</sub>); 1603s v(C=N); 1536s, 1450m v(C=C). λ<sub>max</sub> (roztok; nm)/ε (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 589/177 (*d-d*). CV (-1 do 1,2 V, 0,2 V/s; proti RE, mV): E<sub>red</sub>/E<sub>ox</sub> = -639/480; ΔE = 1119.

Připravené látky jsou málo rozpustné v methanolu, ethanolu, etheru a acetonu, lepší rozpustnost vykazují v dichlormethanu, *N,N*-dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu. Jejich zbarvení se pohybovalo od tmavě zelené, hnědé až po černou, v případě tetraedrických prekurzorů byly komplexy modré. Výsledky měření elementární analýzy pomohly stanovit složení komplexů. Odchytky nalezených hodnot od vypočtených byly menší než 0,5%.

## Rentgenová strukturní analýza

Podarilo se připravit 4 monokrystaly, na jejichž základě byla pomocí rentgenové monokrystalové analýzy určena struktura těchto komplexů. Takto byla stanovena struktura dimerního komplexu **5p** [Co<sub>2</sub>(3,5Cl-salpet)<sub>2</sub>(Ade)](NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O (Obr. 31a), komplexu **7p** [Co(3,5Cl-salpet)(1-MeIM)](NO<sub>3</sub>) (Obr. 31b), komplexu **8p** [Co(napet)Cl] (Obr. 31c) a komplexu **10p** [Co(3,5Cl-saldptm)(ac)] (Obr. 31d). Hodnoty délek vazeb u těchto komplexů korespondují se známými vazebnými délkami u analogických nízkospinových kobaltitých komplexů (Tab. 2) (Analog 1 = [Co(L<sup>1</sup>)Cl], Analog 2 = [Co(L<sup>2</sup>)Cl], Analog 3 = [Co(L<sup>3</sup>)Cl]; H<sub>2</sub>L<sup>1</sup> = *N,N'*-bis(2-hydroxybenzyliden)-1,6-diamino-3-azahexan; H<sub>2</sub>L<sup>2</sup> = *N,N'*-bis(2-hydroxy-3-methoxy-benzyliden)-1,6-diamino-3-azahexan; H<sub>2</sub>L<sup>3</sup> = *N,N'*-bis(3-ethoxy-2-hydroxy-benzyliden)-1,6-diamino-3-azahexan)<sup>129,130</sup> U dvoujaderného komplexu **5p** pozorujeme dva centrální atomy kobaltu v oxidačním stupni III, kdy každý z nich je koordinován ligandem



3,5Cl-salpet<sup>2-</sup>, a jsou spojené přes můstkující adeninový ligand, přičemž dusík N9 na imidazolovém cyklu je deprotonován a využit pro koordinaci na jeden z centrálních atomů kobaltu (Obr. 31a). Pro analogické koordinační sloučeniny Fe(III) a Co(III) se Schiffovými bázemi, kde je využit asymetrický amin *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propandiamin (pet) pro tvorbu pentadentátních ligandů typu H<sub>2</sub>salpet (*N,N'*-bis(2-hydroxybenzyliden)-1,5-diamino-3-azapentan) (**5p**, **7p** a **8p**) je také typické, že donorové atomy kyslíku jsou pak uspořádány v pozici *cis*.<sup>130,131</sup> U dimerního komplexu **5p** s ligandem 3,5Cl-salpet<sup>2-</sup> je však v jedné monomerní podjednotce pozorována izomerie *cis*, zatímco v druhé výjimečně *trans*. Toto uspořádání na *O*-donorových atomech má zřejmě vliv na typ ligandu L1, jež může být koordinován daným izomerem. Komplexy Schiffových bází s *cis* uspořádáním donorových atomů kyslíku ochotně koordinují halogenidové, pseudohalogenidové, karboxylátové či imidazolové typy ligandů. Nebyla však pozorována koordinace pyridinových ligandů, jež zřejmě preferují konformaci *trans*.<sup>131</sup> Pozorování konformace *trans* i na tomto typu ligandů je tedy zajímavé z hlediska studia Co(III) komplexů jakožto potenciálních přenašečů ligandů na bázi pyridinu. Koordinační sloučeniny s ligandy typu salpet<sup>2-</sup> mohou také díky vyšší rigiditě řetězce v jedné části svého systému vykazovat schopnost lepší interkalace bází DNA. V dvoujaderném komplexu **5p** dále pozorujeme v obou monomerních podjednotkách pentadentátní Schiffovu bázi 3,5Cl-salpet<sup>2-</sup>, která je koordinována na centrální atom kobaltu pomocí - mimo již zmiňovaných fenolických *O*-donorových atomů - dvojice iminových dusíků a sekundární aminoskupiny, jež pocházejí z alifatického aminu pet. V tomto systému lze také pozorovat několik intramolekulárních vodíkových vazeb. V monomerní podjednotce, která vykazuje *trans* izomerii na kyslíkových atomech, pozorujeme N-H···O vodíkovou vazbu mezi kyslíkem aniontové NO<sub>3</sub><sup>-</sup> skupiny a dusíkem sekundární aminové skupiny ligandového systému. Jeden fenolický kyslík a také atom chloru jsou spojeny pomocí vodíkových vazeb typu N-H···O a N-H···Cl s aminoskupinou můstkujícího adeninového ligandu. V druhé monomerní podjednotce můžeme pozorovat vodíkový můstek mezi sekundární amino skupinou Schiffovy báze a N3 dusíkem adeninového ligandu.

V krystalové struktuře komplexu **7p** opět pozorujeme Schiffovu bázi 3,5Cl-salpet<sup>2-</sup>, která je na centrální atom kobaltu koordinována pomocí *O*-donorových atomů v pozici *cis* (jak je typické pro tento typ ligandů), dále také dvěma iminovými dusíky a sekundární aminoskupinou ligandového systému (Obr. 31b). Na šestém koordinačním místě nalézáme heterocyklický ligand 1-methylimidazol, jež se na centrální Co(III) atom koordinuje prostřednictvím N3 dusíku imidazolového cyklu. U tohoto komplexu byla pozorována

vodíková vazba typu N-H···O mezi kyslíkem aniontové NO<sub>3</sub><sup>-</sup> skupiny a dusíkem sekundární aminové skupiny Schiffovy báze.

Komplex **8p** využívá Schiffovu bázi napet<sup>2-</sup>, která koordinuje centrální atom kobaltu opět pomocí donorového systému atomů N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. Fenolické atomy kyslíku jsou dle předpokladů navázány v konformaci *cis*. Dále je atom Co(III) opět koordinován dvojicí iminových dusíků a aminovou skupinou Schiffovy báze. Jako ligand na šestém koordinačním místě zde vystupuje atom chloru (Obr. 31c).

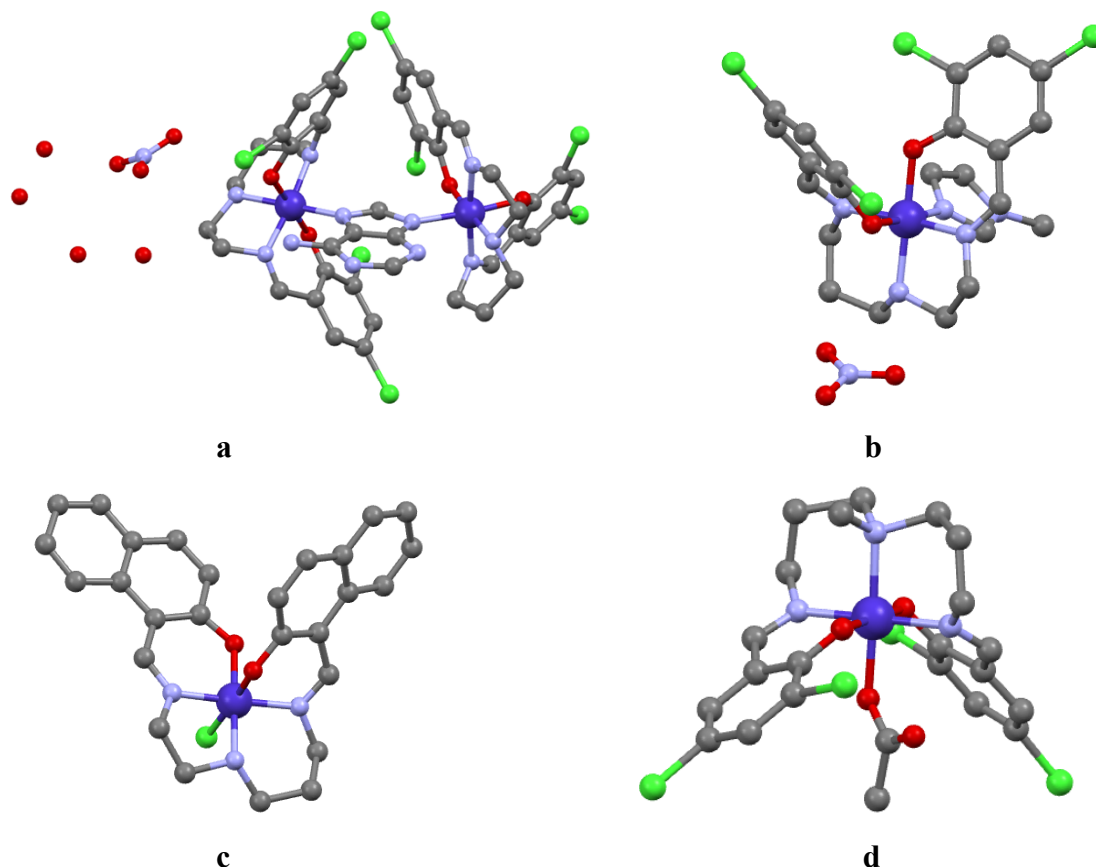
Poněkud jiná situace je pozorována u komplexu **10p**, v němž jako Schiffova báze vystupuje 3,5Cl-saldptm<sup>2-</sup>. Zde je centrální atom kobaltu koordinován pomocí *O*-donorových atomů, které zaujímají konformaci *trans* - je zde totiž využít symetrický alifatický amin dptm. Centrální Co(III) atom je dále koordinován pomocí dvojice iminových dusíků a terciární aminoskupiny ligandového systému. Ligand, který zaujímá šesté koordinační místo, je acetátový anion CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, jež je koordinován přes deprotonovaný hydroxylový atom kyslíku karboxylové skupiny (Obr. 31d).

	Analog 1	Analog 2	Analog 3	<b>5p</b>	<b>7p</b>	<b>8p</b>	<b>10p</b>
<b>Co-O</b>	1,884 <sup>a</sup>	1,889 <sup>a</sup>	1,8981 <sup>a</sup>	<i>trans</i> - 1,897 <sup>a</sup>	1,891 <sup>a</sup>	1,887 <sup>a</sup>	1,892 <sup>a</sup>
				<i>cis</i> - 1,879 <sup>a</sup>			
<b>Co-N<sub>im</sub></b>	1,908 <sup>a</sup>	1,916 <sup>a</sup>	1,9155 <sup>a</sup>	<i>trans</i> - 1,907 <sup>a</sup>	1,912 <sup>a</sup>	1,904 <sup>a</sup>	1,931 <sup>a</sup>
				<i>cis</i> - 1,912 <sup>a</sup>			
<b>Co-N<sub>am</sub></b>	1,970(3)	1,973(3)	1,9792(17)	<i>trans</i> - 1,976(4)	1,971(3)	1,970(6)	2,030(5)
				<i>cis</i> - 1,955(3)			
<b>Co-L1</b>	2,3029(10)	2,2746(13)	2,2892(5)	<i>trans</i> - 1,965(3)	1,945(4)	2,282(2)	1,926(3)
				<i>cis</i> - 1,986(3)			

**Tabulka 2:** Porovnání vybraných vazebných délek (v Å) připravených komplexů s analogickými Co(III) komplexy; horní index <sup>a</sup> značí, že se jedná o průměrnou vazebnou délku vypočtenou ze dvou hodnot.

	<b>5p</b>	<b>7p</b>	<b>8p</b>	<b>10p</b>
Složení komplexu	$C_{43}H_{46}Cl_8Co_2N_{12}O_{11}$	$C_{23}H_{23}Cl_4CoN_6O_5$	$C_{27}H_{25}ClCoN_3O_2$	$C_{23}H_{24}Cl_4CoN_3O_4$
Prost. grupa	$P 2_1/n$	$Pbca$	$C 2/c$	$P -1$
Mřížkové parametry	<b>a</b> 12.800(2) Å <b>b</b> 13.093(2) Å <b>c</b> 34.406(5) Å	<b>a</b> 12.250(3) Å <b>b</b> 17.566(4) Å <b>c</b> 24.730(6) Å	<b>a</b> 24,969(5) Å <b>b</b> 14,928(2) Å <b>c</b> 14,454(3) Å	<b>a</b> 9.4331(5) Å <b>b</b> 10.7231(6) Å <b>c</b> 14.9798(9) Å
	<b>α</b> 90° <b>β</b> 92,807(4)° <b>γ</b> 90°	<b>α</b> 90° <b>β</b> 90° <b>γ</b> 90°	<b>α</b> 90° <b>β</b> 104.761(7)° <b>γ</b> 90°	<b>α</b> 70.024(4)° <b>β</b> 72.449(4)° <b>γ</b> 87.456(4)°
Objem buňky	10551	5321.49	5209.74	1354.87
Z, Z'	Z: 14 Z': 0	Z: 8 Z': 0	Z: 8 Z': 0	Z: 2 Z': 0
R-faktor	5.41	5.32	7.87	6.13

**Tabulka 3:** Strukturní informace a mřížkové parametry připravených monokrystalů komplexů **5p**, **7p**, **8p** a **10p**

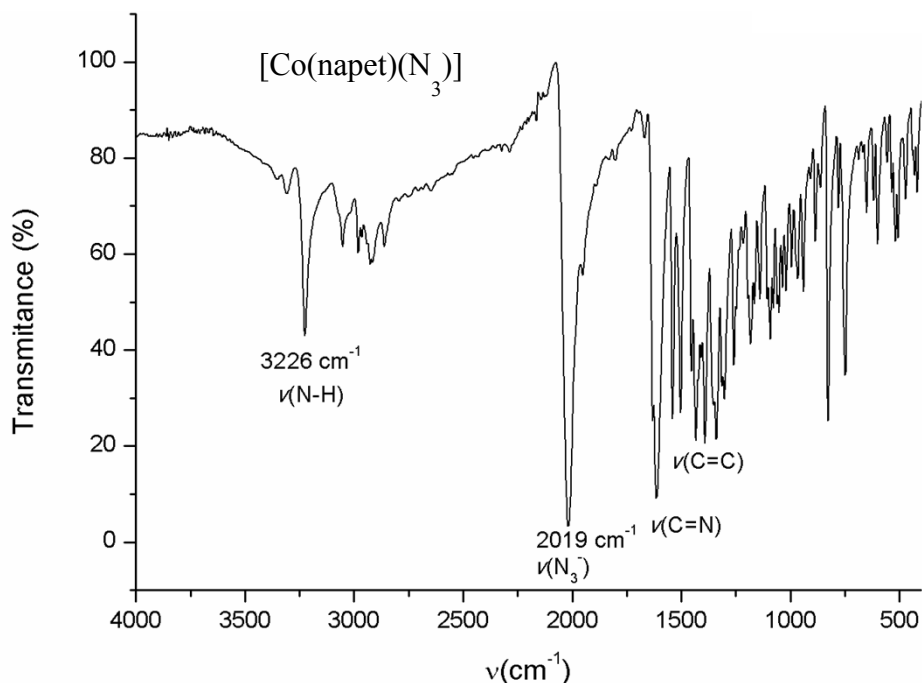


**Obr. 31:** Vyobrazení části krystalových struktur komplexů **5p** [ $\text{Co}_2(3,5\text{Cl-salpet})_2(\text{Ade})(\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ] (**a**), **7p** [ $\text{Co}(3,5\text{Cl-salpet})(1\text{-MeIM})(\text{NO}_3)$ ] (**b**), **8p** [ $\text{Co}(\text{napet})\text{Cl}$ ] (**c**), **10p** [ $\text{Co}(3,5\text{Cl-saldptm})(\text{ac})$ ] (**d**). Vybrané vazebné úhly ( $^\circ$ ): **5p**: *trans* O1-Co1-O2 = 178,2(1), N1-Co1-N3 = 172,7(2), N2-Co1-L1 = 177,1(1); *cis* N1-Co2-N3 = 174,4(1), O1-Co2-N2 = 177,1(1), O2-Co2-L1 = 175,5(1); **7p**: N1-Co-N3 = 174,4(2), N2-Co-O1 = 177,5(1), O2-Co-L1 = 176,5(1); **8p**: N1-Co-N3 = 173,9(2), N2-Co-O1 = 179,3(2), O2-Co-L1 = 176,0(1); **10p**: N1-Co-N3 = 177,7(2), O1-Co-O1 = 178,7(1), O2-Co-L1 = 177,0(2). Vybrané vazebné délky pro tyto komplexy jsou uvedeny v tabulce 2, mřížkové parametry a další strukturální informace jsou v tabulce 3.

## 5.2 Výsledky spektrálních, elektrochemických a termických analýz

Připravené komplexy a Schiffovy báze ( $\text{H}_23,5\text{Cl-salpet}$  a  $\text{H}_2\text{napet}$ ) byly studovány pomocí infračervené spektroskopie. Na základě porovnání získaných údajů můžeme usuzovat, že tyto ligandy se nacházejí v odpovídajících Co(III) komplexech. Ve střední (MID) části spektra lze pozorovat široké pásy v oblastech kolem 3600 až 3300  $\text{cm}^{-1}$ , které odpovídají vibracím  $\nu(\text{OH})$  krystalicky vázaných molekul vody. Dále byly pozorovány charakteristické

pásky v oblastech kolem 3230-3110  $\text{cm}^{-1}$ , které mohou být přiřazeny vibracím sekundární aminoskupiny  $\nu(\text{N-H})$  ze skeletu komplexů s *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propandiaminem (**pet**). U komplexů, které využívaly Schiffovy báze odvozené od diamino-*N*-methyl-dipropylaminu (**dptm**) tyto vibrace pozorovány nejsou, protože alifatická část tohoto ligandu obsahuje terciární aminoskupinu. Píky nalezené v oblasti kolem 3050  $\text{cm}^{-1}$  lze přiřadit vibracím  $\nu(\text{CH})$  aromatických systémů Schiffových bází. Pásky v rozmezí 2980-2850  $\text{cm}^{-1}$  poté odpovídají vibracím  $\nu(\text{CH}_2)$  alifatických aminů v Schiffových bázích. Výrazné píky odpovídající vibracím  $\nu(\text{C=N})$  charakteristickým pro komplexy se Schiffovými bázemi lze pozorovat v oblastech kolem 1650-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Množství píků typické pro aromatické vazby  $\nu(\text{C=C})$  bylo pozorováno v oblastech kolem 1550 a 1400  $\text{cm}^{-1}$ . U komplexů, jež ve své struktuře obsahují  $\text{NO}_3^-$  anion byly také pozorovány píky v oblastech kolem 1370 a 1320  $\text{cm}^{-1}$ , odpovídající vibracím  $\nu(\text{NO}_3^-)$ . U komplexů, v nichž vystupovala Schiffova báze napet<sup>2-</sup>, byly pozorovány charakteristické píky v oblasti okolo 830-820  $\text{cm}^{-1}$ , které odpovídají mimorovinným vibracím  $\nu(\text{Ar-H})$ , jež jsou typické pro tento typ substituovaných aromatických jader. Vibrace typické pro některé specifické ligandy, jako jsou azido  $\nu(\text{N}_3^-)$  (komplex **3p**), kyanáto  $\nu(\text{NCO}^-)$  (**19p**) či thiokyanáto (**15p**) ligandy  $\nu(\text{NCS}^-)$  byly pozorovány při 2019, 2209 a 2086  $\text{cm}^{-1}$ , respektive (Obr. 32).<sup>132,133</sup>



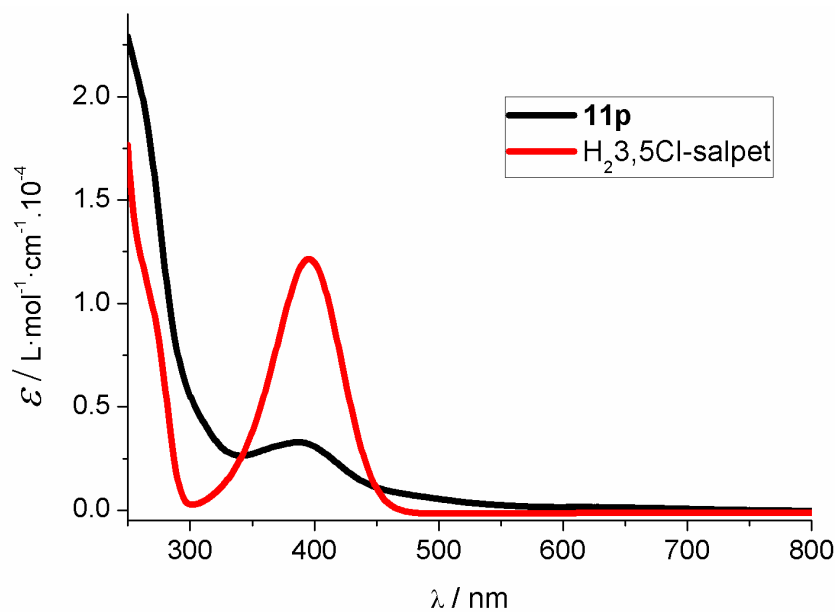
**Obr. 32:** Ukázkové spektrum komplexu **3p** v oblasti MID

Dále byla získána UV/Vis spektra komplexů a Schiffových bází v roztoku DMF a 4 vybraných komplexů a Schiffových bází v pevném stavu. U komplexů, které jako Schiffovu

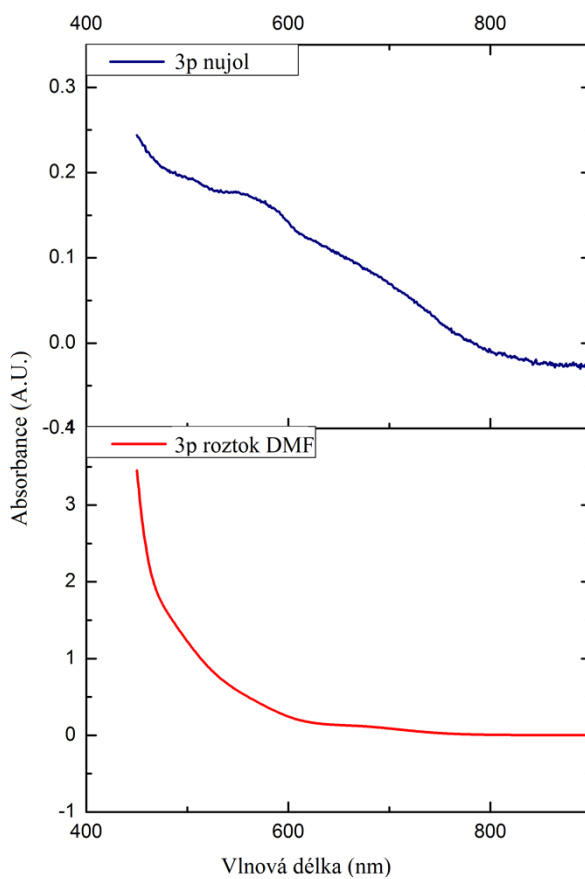
bázi využívaly různě substituovaný systém  $\text{salpdm}^{2-}$  (**1p**, **2p**, **10p**, **16p**) lze pozorovat málo výrazné pásy v oblastech od 639 do 668 nm, jež lze přiřadit přechodům  $d-d$ . Vypočtené molární absorpční koeficienty  $\epsilon$  pro tento typ komplexů se pohybovaly v rozmezí  $289\text{--}418\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  a odpovídají  $d-d$  přechodům. Koordinační sloučeniny se Schiffovou bází odvozenou od salpetu<sup>2-</sup> (**4p**, **5p**, **6p**, **7p**, **9p**, **11p** a **20p**) vykazovaly opět málo intenzivní pásy, jejichž absorpční maxima se pohybovala v oblastech kolem 589–631 nm a můžeme je přiřadit přechodům  $d-d$ . Molární absorpční koeficienty tohoto typu sloučenin nabývaly hodnot od 95 do  $308\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , což znovu odpovídá  $d-d$  přechodům. U komplexů obsahujících Schiffovy báze typu  $\text{napet}^{2-}$  lze pozorovat nevýrazné a málo intenzivní pásy v oblastech od 590 až 653 nm, které patří přechodům  $d-d$ . Molární absorpční koeficienty u těchto komplexů leží v rozmezí 103 až  $216\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  a opět odpovídají  $d-d$  přechodům.

U spekter získaných při měření roztoků Schiffových bází ( $\text{H}_2\text{3,5Cl-salpet}$  a  $\text{H}_2\text{napet}$ ) v DMF byly pozorovány intenzivní píky s maximem v oblasti kolem 400 nm, které odpovídají  $\pi \rightarrow \pi^*$  přechodům na skupinách  $\text{C}=\text{N}$  a jsou zodpovědné za žluté zbarvení Schiffových bází.<sup>134</sup> Tyto píky byly také zaznamenány ve spektrech komplexů měřených v roztoku DMF a jejich maxima byla pozorována v oblastech od 390 do 401 nm (Obr. 33). Intenzita těchto píků byla nižší než v případě samotných ligandů, molární absorpční koeficient nabýval hodnot řádově  $10^3\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Jedná se o přechody přenosu náboje CT (charge transfer) a jsou spojeny s přenosem elektronu z ligandu na centrální atom (LMCT, ligand to metal charge transfer). V oblastech kolem 250–265 nm byly pozorovány velmi intenzivní píky, které lze přiřadit vnitroligandovým přechodům  $\pi \rightarrow \pi^*$ , které probíhají na aromatických jádrech Schiffových bází.<sup>130,134</sup>

U komplexů **3p**, **4p**, **8p** a **11p** a jejich Schiffových bází byla také získána spektra UV/Vis v pevné fázi. Pozorované pásy jsou opět málo výrazné s nízkou intenzitou. Naměřená spektra vykazovala obdobný průběh jako odpovídající spektra roztoková, jejich maxima byla však posunuta. Pro komplexy **3p** a **8p** se Schiffovou bází typu  $\text{napet}^{2-}$  byly pozorovány pásy s maximem v oblastech 589 a 635 nm (srovnání s roztokovými spektry - pro **3p** 648 nm, pro **8p** 641 nm). U komplexů **4p** a **11p** se Schiffovou bází odvozenou od systému  $\text{salpet}^{2-}$  leží maximum těchto pásů při 570 nm pro komplex **4p** (srovnání s roztokovými spektry - 599 nm) a při 584 nm pro komplex **11p** (606 nm v roztoku). Na základě těchto údajů lze usuzovat, že komplex **8p** je v roztoku DMF poměrně stabilní. Komplexy **4p** a **11p** také vykazují v DMF dobrou stabilitu. Jako méně stabilní se jeví komplex **3p**, který může v tomto roztoku podléhat solvolýze a změně koordinační sféry (Obr. 34).<sup>135</sup>



**Obr. 33:** Porovnání UV/Vis spekter komplexu **11p** a ligandu  $H_{2,3,5}Cl$ -salpet v oblasti okolo 400 nm



**Obr. 34:** Srovnání UV/Vis spekter komplexu **3p** získaných měření v  $10^{-3}$  M roztoku DMF a v nujolové suspenzi

## Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie byla naměřena pro jednotlivé komplexy a Schiffovy báze ( $\text{H}_2\text{3,5Cl-salpet}$  a  $\text{H}_2\text{napet}$ ) v roztoku MeCN. Voltamogramy získané z měření připravených komplexů a odpovídajících Schiffových bází byly porovnány, a na tomto základě byly stanoveny redoxní páry Co(III)/Co(II) a jejich oxidační ( $E_{ox}$ ) a redukční ( $E_{red}$ ) potenciály. Následně byl vypočten rozdíl mezi oxidačními a redukčními píky  $\Delta E$ . Na základě tohoto rozdílu lze určit, zda redoxní reakce probíhající v komplexu jsou reverzibilní či ne. Teoreticky bylo stanoveno, že v případě ideálně reverzibilního redoxního páru, v němž je přenášen jeden elektron, je hodnota rozdílu anodického ( $E_{ox}, E_{pa}$ ) a katodického ( $E_{red}, E_{pc}$ ) potenciálu  $\Delta E$  rovna 57 mV ( $E_{pa} - E_{pc} = \frac{57 \text{ mV}}{n}$  pro n-elektronový děj). Experimentální hodnoty pro reálné reverzibilní systémy nabývají vyšších hodnot a pohybují se kolem 70 a 80 mV.<sup>136,137</sup>

Pro komplexy, ve kterých se vyskytuje Schiffova báze typu  $\text{saldptm}^{2-}$  (**1p**, **2p**, **10p** a **16p**), se hodnoty redukčních potenciálů  $E_{red}$  pohybovaly v rozmezí -564 až -269 mV, přičemž píky oxidačního potenciálu  $E_{ox}$  se nalézaly v rozmezí -319 až -110 mV. Rozdíly potenciálů  $\Delta E$  poté nabývaly hodnot od 150 do 245 mV, což odpovídá dějům kvazi reverzibilním až ireverzibilním.

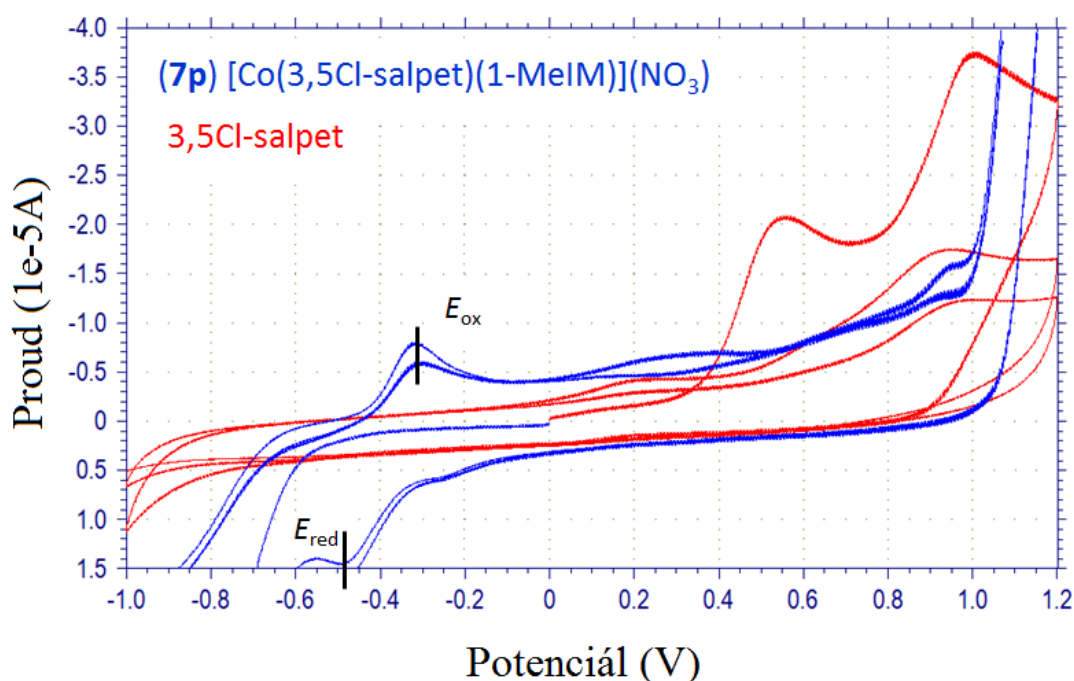
U komplexů se Schiffovou bází typu  $\text{salpet}^{2-}$  (**4p**, **5p**, **6p**, **7p**, **9p**, **11p** a **20p**) byly pozorovány píky, které se nevyskytovaly ve voltamogramu bází. Lze tedy usuzovat, že se jedná o redoxní páry Co(III)/Co(II). U všech komplexů vyjma **4p** byly píky odpovídající redukčnímu potenciálu  $E_{red}$  pozorovány v rozmezí -767 až -479 mV. U komplexu **4p** byl takovýto pík nalezen při 170 mV. Oxidační potenciály  $E_{ox}$  pro komplexy **5p** a **7p** nabývaly hodnot -318 a -312 mV, zatímco pro komplexy **4p**, **6p**, **9p**, **11p** a **20p** byl oxidační pík pozorován v rozmezí od 369 do 821 mV. Rozdíly potenciálů poté nabývaly různých hodnot. Pro komplexy **6p**, **9p**, **11p** a **20p** byla hodnota  $\Delta E$  v rozmezí 886 až 1418 mV a jde o děje ireverzibilní. U sloučenin **4p**, **5p** a **7p** odpovídal tento rozdíl hodnotám od 167 do 449 mV a jedná se o děje kvazi reverzibilní až ireverzibilní (Obr. 35).

U připravených komplexů **3p**, **8p**, **12p**, **13p**, **14p**, **15p**, **17p**, **18p** a **19p**, které ve své struktuře využívají Schiffovu bázi typu  $\text{napet}^{2-}$ , byla pozorovaná situace poněkud jiná. Voltamogram samotného ligandu  $\text{H}_2\text{napet}$  ukazuje, že tento systém je redoxně ireverzibilní, což znemožňuje srovnání dat získaných z měření komplexů. Tato vlastnost může být způsobena elektronově bohatým systémem 2-hydroxynaftaldehydu, který obsahuje dvě konjugovaná aromatická jádra. U tohoto typu komplexů nelze určit, zda pozorované oxidační a redukční píky odpovídají redoxnímu páru Co(III)/Co(II). Na základě srovnání těchto dat s údaji získanými z



měření komplexů se Schiffovou bází salpet<sup>2-</sup> však usuzujeme, že zde pozorované píky zřejmě odpovídají redoxnímu páru Co(III)/Co(II). Pozorované hodnoty redukčního potenciálu  $E_{red}$  komplexů **12p**, **13p**, **14p** a **15p** se pohybovaly v rozmezí od -552 do -385 mV, zatímco u komplexů **3p**, **8p**, **17p**, **18p** a **19p** nabýval redukční potenciál  $E_{red}$  hodnot od -687 do -794 mV. Oxidační potenciály  $E_{ox}$  pro komplexy **3p**, **8p**, **12p**, **13p**, **15p**, **17p** a **19p** se nalézaly v rozmezí 512-713 mV, zatímco u komplexů **14p** a **18p** nabývaly hodnot 256 a 242 mV. Vypočtené rozdíly potenciálů  $\Delta E$  dosahovaly vysokých hodnot od 808 do 1507 mV a jedná se o děje ireverzibilní.

Z výše uvedeného lze usuzovat, že nejbližší reverzibilnímu redoxnímu chování mají komplexy využívající jako Schiffovu bází  $\text{salpdm}^{2-}$ , přičemž zajímavé vlastnosti jsou pozorovány i u komplexů, kde se vyskytuje  $\text{salpet}^{2-}$ . Můžeme dojít k závěru, že i menší strukturní změny v ligandovém systému a různé ligandy na šestém koordinačním místě těchto komplexů mohou do značné míry ovlivnit elektrochemické chování těchto látek. Redoxním vlastnostem buněčného cytosolu (redukční potenciál -200 až -400 mV)<sup>88</sup> odpovídají redukční potenciály látek **1p**, **2p**, **13p** a **16p**. Získaná data jsou shrnuta v tabulce 4.



**Obr. 35:** Srovnání voltamogramu komplexu **7p** a příslušného ligandu. Podmínky: 1mM roztok v MeCN a 0,1M TBAP, rozmezí od -1 do 1,2 V, 25°C, rychlost skenování 0,2 V/s

	<b>Složení komplexu</b>	$E_{red}$ (mV)	$E_{ox}$ (mV)	$\Delta E$ (mV)
<b>1p</b>	[Co(3,5Br-saldptm)(ac)]·H <sub>2</sub> O	-339	-115	224
<b>2p</b>	[Co(3,5Cl-saldptm)Cl]·0,5H <sub>2</sub> O	-315	-110	205
<b>3p</b>	[Co(napet)(N <sub>3</sub> )]	-687	675	1362
<b>4p</b>	[Co(3,5Cl-salpet)Cl]	170	544	374
<b>5p</b>	[Co <sub>2</sub> (3,5Cl-salpet) <sub>2</sub> (Ade)](NO <sub>3</sub> )·4H <sub>2</sub> O	-767	-318	449
<b>6p</b>	[Co(3,5Cl-salpet)(BeIM)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	-597	821	1418
<b>7p</b>	[Co(3,5Cl-salpet)(1-MeIM)](NO <sub>3</sub> )	-492	-306	186
<b>8p</b>	[Co(napet)Cl]	-794	713	1507
<b>9p</b>	[Co(3,5Cl-salpet)(IM)](NO <sub>3</sub> )·0,5H <sub>2</sub> O	-717	453	1170
<b>10p</b>	[Co(3,5Cl-saldptm)(ac)]	-564	-319	245
<b>11p</b>	[Co(3,5Cl-salpet)(2-MeIM)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	-517	369	886
<b>12p</b>	[Co(napet)(NO <sub>3</sub> )]	-442	681	1123
<b>13p</b>	[Co(napet)(2-MeIM)](NO <sub>3</sub> )·0,5H <sub>2</sub> O	-385	649	1034
<b>14p</b>	[Co(napet)(4-pikolin)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	-552	256	808
<b>15p</b>	[Co(napet)(NCS)]	-448	512	960
<b>16p</b>	[Co(3,5I-saldptm)(ac)]·H <sub>2</sub> O	-269	-119	150
<b>17p</b>	[Co(napet)(diClac)]	-752	579	1331
<b>18p</b>	[Co(napet)(1-MeIM)](NO <sub>3</sub> )	-765	242	1007
<b>19p</b>	[Co(napet)(NCO)]	-737	516	1253
<b>20p</b>	[Co(4OH-salpet)(NO <sub>3</sub> )]	-639	480	1119

**Tabulka 4:** Údaje získané měřením cyklické voltametrie

## Termogravimetrická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie

U komplexů, v jejichž IČ spektrech byl pozorován pík odpovídající vibracím  $\nu(\text{OH})$  krystalických molekul vody, byla provedena také termogravimetrická analýza (TG) a diferenční skenovací kalorimetrie do 300°C. Nízká konečná teplota analýzy byla zvolena vzhledem k velkému počtu vzorků a z také z důvodu potřeby určit pouze množství krystalového solventu. Předpokládaný obsah krystalických molekul vody byl potvrzen pomocí elementární analýzy a měření IČ spekter v MID oblasti. Jedná se o připravené komplexy **1p**, **2p**, **6p**, **9p**, **11p**, **13p**, **14p** a **16p**. Na základě pozorovaného hmotnostního úbytku a endoefektu na křivce DSC bylo vypočteno, že tyto komplexy kokrystalizovaly s jednou nebo 0,5 molekulou vody. Endoeffekt odpovídající dehydrataci komplexu **1p** byl pozorován při 62,6°C a na základě pozorovaného



Strukturní typ A:	<b>4p</b> (Y=Cl, X=H, L1=Cl); <b>6p</b> (Y=Cl, X=H, L1=BeIM, 1 molekula H <sub>2</sub> O, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>7p</b> (Y=Cl, X=H, L1=1-MeIM, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>9p</b> (Y=Cl, X=H, L1=IM, 0,5 molekuly H <sub>2</sub> O, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>11p</b> (Y=Cl, X=H, L1=2-MeIM, 1 molekula H <sub>2</sub> O, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>20p</b> (Y=H, X=OH, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).
Strukturní typ B:	<b>1p</b> (Y=Br, L1=CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , 1 molekula H <sub>2</sub> O); <b>2p</b> (Y=Cl, L1=Cl <sup>-</sup> , 0,5 molekuly H <sub>2</sub> O); <b>10p</b> (Y=Cl, L1=CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ); <b>16p</b> (Y=I, L1=CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> , 1 molekula H <sub>2</sub> O).
Strukturní typ C:	<b>3p</b> (L1=N <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>8p</b> (L1=Cl <sup>-</sup> ); <b>12p</b> (L1=NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>13p</b> (L1=2-MeIM, 0,5 molekuly H <sub>2</sub> O, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>14p</b> (L1=4-pikolin, 1 molekula H <sub>2</sub> O, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>15p</b> (L1=NCS <sup>-</sup> ); <b>17p</b> (L1=CHCl <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> ); <b>18p</b> (L1=1-MeIM, koligand NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ); <b>19p</b> (L1=NCO <sup>-</sup> ).

**Tabulka 5:** Popis složení připravených komplexů

### 5.3 Výsledky stanovení *in vitro* protinádorové aktivity

U dvou zvolených komplexních sloučenin **3p** a **8p** a ligandu H<sub>2</sub>napet (**L1**) bylo dále provedeno stanovení protinádorové aktivity na několika nádorových buněčných liniích (pro komplex **3p** šlo o MCF7 - prsní karcinom; PANC-1 - karcinom slinivky břišní; HT29 - kolorektální adenokarcinom a A2780 - karcinom vaječníku; pro komplex **8p** pak A2780 a A2780R - karcinom vaječníku rezistentní na cisplatinu, MCF7 a MRC5 - plicní fibroblast) za pomoci MTT testu.

Buněčné kultury byly získány z European Collection of Cell Cultures (ECACC). Vypočtené množství komplexů, ligandu a cisplatinu (**CDDP**) bylo rozpuštěno ve směsi DMF+H<sub>2</sub>O (1:1000) a byly připraveny roztoky o koncentraci 50μM (25μM u komplexu **3** a ligandu **L1**). Buňky studovaných linií byly preinkubovány v médiu bez léčiva po dobu 24 hodin. Následně bylo médium nahrazeno roztoky testovaných sloučenin o koncentracích 0,01-50μM (resp. 25 μM). Po 72 hodinové expozici byly buňky zbaveny roztoků a promyty samotným médiem. Souběžně byly buňky studovány také v 0,1% směsi DMF+H<sub>2</sub>O pro negativní kontrolu - pro stanovení minimálního poškození buněk, a také v Triton X-100 pro pozitivní kontrolu k určení maximálního poškození těchto buněk. Vyhodnocení proběhlo pomocí MTT testu (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazol bromid). Přeživší metabolicky aktivní buňky přeměňují MTT na formazanové barvivo, jehož koncentrace je následně spektrofotometricky vyhodnocována.

Pomocí studia *in vitro* protinádorové aktivity na vybraných rakovinných buněčných liniích byly tedy stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub> pro 2 zvolené komplexy, jejich ligand a cisplatinu (Tab. 6 a 7).

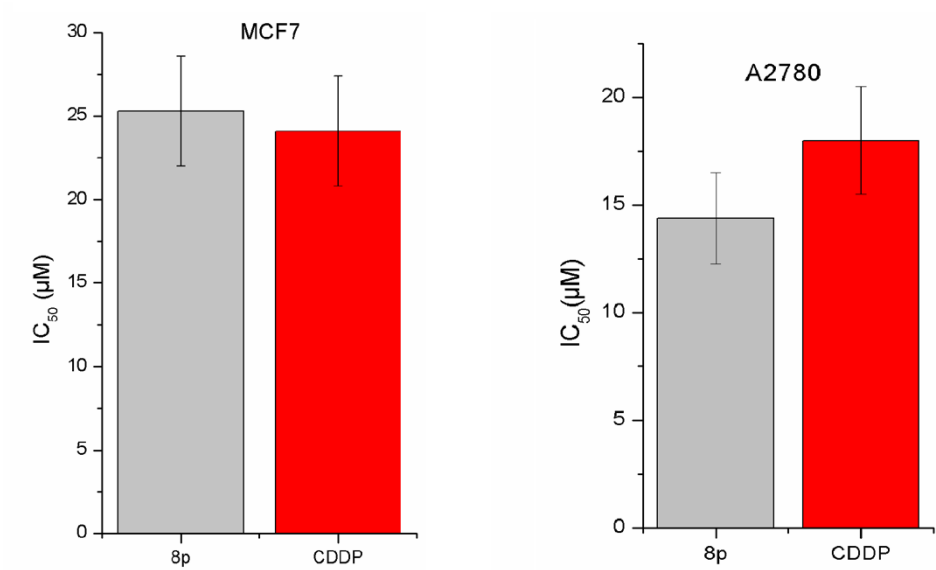
	MCF7 (IC <sub>50</sub> )	PANC-1 (IC <sub>50</sub> )	A2780 (IC <sub>50</sub> )	HT29 (IC <sub>50</sub> )
<b>3p</b>	> 25 μM	> 25 μM	> 25 μM	> 25 μM
<b>L1</b>	> 25 μM	> 25 μM	> 25 μM	> 25 μM
<b>CDDP</b>	20,4±2,5 μM	16,9±1,9 μM	10,4±0,8 μM	27,4±3,1 μM

**Tabulka 6:** Hodnoty IC<sub>50</sub> získané testováním komplexu **3p**, ligandu L1 a **CDDP** na nádorových liniích MCF7, PANC-1, HT29 a A2780

	MCF7 (IC <sub>50</sub> )	MRC5 (IC <sub>50</sub> )	A2780 (IC <sub>50</sub> )	A2780R (IC <sub>50</sub> )
<b>8p</b>	25,3±3,3 μM	22,5±0,2 μM	14,4±2,1 μM	16,6±2,6 μM
<b>CDDP</b>	24,1±3,3 μM	> 50 μM	18,0±2,5 μM	> 50 μM

**Tabulka 7:** Hodnoty IC<sub>50</sub> získané testováním komplexu **8p** a **CDDP** na nádorových liniích A2780, A2780R, MCF7 a MRC5

Ze získaných údajů lze tedy pozorovat, že nejvýraznější aktivitu vykazuje komplex **8p** [Co(napet)Cl], zatímco komplex **3p** [Co(napet)(N<sub>3</sub>)] neprokázal pozorovatelnou aktivitu. Komplex **8p** vykazuje proti nádorovým buňkám prsního karcinomu MCF7 aktivitu lehce nižší ve srovnání s klinicky využívanou cisplatinou. Proti buňkám plicního fibroblastu MRC5 prokázal komplex **8p** zvýšenou cytotoxicitu, jež předčila působení cisplatinu. Studium na nádorových buněčných liniích A2780 a A2780R (karcinom vaječníku a karcinom vaječníku rezistentní na cisplatinu) ukazuje, že komplex **8p** vykazuje účinnost srovnatelnou s cisplatinou v případě buněčné linie A2780, ale rovněž také prokázal výraznou aktivitu proti linii A2780R, jejíž buňky jsou proti působení cisplatinu odolné. Aktivita komplexu **3p** a ligandu **L1** nebyla na studovaných liniích pozorována v mezích rozpustnosti těchto látek v použité směsi rozpouštědel. Srovnání inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> komplexu **8p** a cisplatinu na liniích MCF7 a A2780 je uvedeno na obrázku 37.



**Obr. 37:** Srovnání aktivity komplexu **8p** a cisplatiny na nádorových buněčných liniích MCF7 a A2780.

## 6. Závěr

V rámci této diplomové práce byla vypracována literární rešerše, která se zabírala zastoupením a rolí kobaltu jakožto esenciálního mikroprvku v organismech, dále také vybranými kobaltitými komplexy, jež prokázaly zajímavé biologické vlastnosti a též ligandy použitými v těchto sloučeninách.

Následně byla provedena syntéza kobaltitých komplexů o složení  $[\text{Co}(\text{L}_5)(\text{L}_1)]$  s monodentátními halogenido/pseudohalogenido či heterocyklickými ligandy (L1) a s pentadentátními Schiffovými bázemi ( $\text{H}_2\text{L}_5$ ). Bylo připraveno 20 koordinačních sloučenin s centrálním atomem kobaltu v oxidačním stupni III, kdy jako Schiffovy báze byly využity systémy odvozené od různých derivátů salicylaldehydu, 2-hydroxynaftaldehydu a dvou typů alifatických aminů (pet a dptm). Na šestém koordinačním místě v těchto komplexech vystupovala široká škála monodentátních ligandů.

V dalším kroku byly tyto látky charakterizovány prostřednictvím elementární analýzy, infračervené a UV/Vis spektroskopie, monokrystalové rentgenové strukturní analýzy a také metodami termické analýzy. Elektrochemické vlastnosti těchto sloučenin byly studovány pomocí cyklické voltametrie. U dvou vybraných komplexů bylo také provedeno stanovení *in vitro* protinádorové aktivity na několika nádorových buněčných liniích.

Výsledky elementární analýzy pomohly stanovit složení připravených komplexů a ve spojení s infračervenou spektroskopií také umožnily zjistit přítomnost krystalických molekul vody. Naměřená infračervená spektra komplexů a Schiffových bází pomohla potvrdit přítomnost těchto ligandů v připravených látkách, odhalila přítomnost krystalicky vázaných molekul vody a také některých charakteristických skupin a ligandů L1. Pomocí termogravimetrické analýzy a diferenční skenovací kalorimetrie bylo stanoveno množství krystalicky vázaných molekul vody v připravených komplexech a také teploty, při kterých docházelo k desolvaci. Za užití UV/Vis spektrometrie a srovnání dat získaných z měření v roztoku DMF a v pevném stavu byla pozorována rozdílná stabilita připravených komplexů v roztoku DMF. V případě 4 komplexů (**5p**, **7p**, **8p** a **10p**) se podařilo připravit monokrystal vhodný pro studium pomocí rentgenové strukturní analýzy. Na základě těchto výsledků byla stanovena struktura těchto komplexů a byly diskutovány vazebné poměry a strukturní vlastnosti. Ve struktuře jednoho z připravených monokrystalů byla pozorována dosud nepozorovaná izomerie *trans* na *O*-donorových atomech Schiffovy báze odvozené od asymetrického aminu. Za pomoci cyklické voltametrie byly tyto látky studovány jakožto potenciální systémy pro doručování biologicky aktivních ligandů a jako prekurzory hypoxicky

aktivovaných léčiv s možným terapeutickým účinkem. Byla také diskutována redoxní reverzibilita těchto sloučenin. Redukční potenciály čtyř komplexů (**1p**, **2p**, **13p** a **16p**) korespondují s redoxními vlastnostmi prostředí eukaryotních buněk. Ani jeden z připravených komplexů nevykazuje ideálně reverzibilní vlastnosti. Ze získaných dat lze usuzovat, že i malá změna v ligandovém systému těchto komplexů může vést k výrazným změnám v jejich elektrochemickém chování. Dále bylo také provedeno stanovení *in vitro* protinádorové aktivity dvou vybraných komplexů a v medicínské praxi využívané cisplatinu na několika nádorových liniích. Na základě srovnání získaných údajů můžeme usuzovat, že jeden z těchto komplexů vykazuje zajímavé terapeutické vlastnosti.



## 7. Literatura

- 
- <sup>1</sup> M. Gielen, E. R. T. Tiekink, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents*, Eley, **2005**, str. 201
- <sup>2</sup> J. Kameníček, Z. Šindelář, R. Pastorek, F. Kašpárek, *Anorganická chemie*, Olomouc, **2009**, str. 269-274
- <sup>3</sup> N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků II*, Informatorium Praha, **1998**, str. 1113-1143
- <sup>4</sup> H. B. Gray, Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, **2003**, 100, str. 3563-3568
- <sup>5</sup> M. Kobayashi, S. Shimizu, Cobalt proteins, *Eur J Biochem*, **1999**, 261, str. 1–9.
- <sup>6</sup> G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, **2007**, str. 511-528
- <sup>7</sup> D. G. Barceloux, Cobalt, *Clin Toxicol*, **1999**, 37, str. 201-206
- <sup>8</sup> N. Gault *et al.*, Cobalt toxicity: chemical and radiological combined effects on HaCaT keratinocyte cell line, *Toxicol in Vitro*, **2009**, 24, str. 92–88
- <sup>9</sup> S. P. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, **1994**, str. 104
- <sup>10</sup> S. Okamoto, L. D. Eltis, The biological occurrence and trafficking of cobalt, *Metallomics*, **2011**, 3, str. 963-970
- <sup>11</sup> L. O. Simonsen, H. Harbak, P. Bennekou, Cobalt metabolism and toxicology - A brief update, *Sci Total Environ*, **2012**, 432, str. 210-215
- <sup>12</sup> A. Taylor, V. Marks, Cobalt: a review, *J Human Nutr*, **1978**, 32, str. 165-177
- <sup>13</sup> F. J. Schwarz, M. Kirchgessner, G. I. Stangl, Cobalt requirement of beef cattle - feed intake and growth at different levels of cobalt supply, *J Anim Physiol An N*, **2000**, 83, str. 121-131
- <sup>14</sup> R. W. Leggett, The biokinetics of inorganic cobalt in the human body, *Sci Total Environ*, **2008**, 389, str. 259-269
- <sup>15</sup> A. K. N. Nandedkar *et al.*, Co<sup>++</sup> binding by plasma proteins, *Bioinorg Chem*, **1972**, 2, str. 149-157
- <sup>16</sup> Simonsen *et al.*, Cobalt uptake and binding in human red blood cells, *Blood Cells Mol Dis*, **2011**, 46, str. 266-276
- <sup>17</sup> K. Yamada, Cobalt: Its Role in Health and Disease, *Met Ions Life Sci*, **2013**, 13, str. 295-320
- <sup>18</sup> Cobalamin, *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.*, z 9.3. **2018**
- <sup>19</sup> S. W. Ragdsdale, Metals and their scaffolds to promote difficult enzymatic reactions, *Chem Rev*, **2006**, 106, str. 3317-3337
- <sup>20</sup> R. Carmel, Cobalamin (Vitamin B-12), v M. E. Shils *et. al.*, *Modern Nutrition in Health and Disease*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**, str. 482-497.
- <sup>21</sup> A. G. Khan, S. V. Eswaran, Woodward's synthesis of vitamin B<sub>12</sub>, *Resonance*, **2003**, 8, str. 8–16
- <sup>22</sup> A. Eschenmoser, C. E. Wintner, Natural product synthesis and vitamin B<sub>12</sub>, *Science*, **1977**, 196, str. 1410-1420
- <sup>23</sup> K. Kirkland, *Biological Sciences: Notable Research and Discoveries*, **2010**, str. 87
- <sup>24</sup> E. V. Quadros, Advances in the Understanding of Cobalamin Assimilation and Metabolism, *Br J Haematol*, **2010**, 148(2), str. 195-204
- <sup>25</sup> B. Shane, Folic acid, vitamin B-12, and vitamin B-6, v M. Stipanuk, *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*, Philadelphia: W. B. Saunders Co., **2000**, str. 483-518
- <sup>26</sup> R. V. Banerjee, R. G. Matthews, Cobalamin-dependent methionine synthase, *FASEB J*, **1990**, 4, str. 1450-1459

- 
- <sup>27</sup> R. V. Banerjee, S. W. Ragsdale, The many faces of vitamin B<sub>12</sub>: catalysis by cobalamin-dependent enzymes, *Annu Rev Biochem*, **2003**, 72, str. 209-247
- <sup>28</sup> Institute of Medicine, Vitamin B<sub>12</sub>, *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, Washington, DC: The National Academies Press, **1998**, str. 340–342
- <sup>29</sup> A. M. Kuzminski, E. J. Del Giacco, Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamine, *Blood*, **1998**, 92(4), str. 1191-1198
- <sup>30</sup> F. Watanabe, Vitamin B12 sources and bioavailability, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232, str. 1266–1274
- <sup>31</sup> R. H. Allen, B. Seetharam, Effect of Proteolytic Enzymes on the Binding of Cobalamin to R Protein and Intrinsic Factor, *J Clin Invest*, **1978**, 61, str. 47-54
- <sup>32</sup> R. Kozyraki, M. Kristiansen, The human intrinsic factor-vitamin B<sub>12</sub> receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region, *Blood*, **1998**, 91(10), str. 3593–3600
- <sup>33</sup> S. N. Fedosov, Physiological and molecular aspects of cobalamin transport, *Sub-Cell Biochem*, **2012**, 56, str. 347-367
- <sup>34</sup> R. Kozyraki, O. Cases, Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders, *Biochimie*, **2013**, 95(5), str. 1002-1007
- <sup>35</sup> J. Abels, J. J. M. Vegter, The Physiologic Mechanism of Vitamin B12 Absorption, *Acta Med Scand*, **2009**, 165, str. 105-113
- <sup>36</sup> L. Hannibal, J. Kim, N. E. Brasch, Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: a role for the MMACHC (cblC) gene product, *Mol Genet Metab*, **2009**, 97(4), str. 260-266
- <sup>37</sup> R. Masalha, B. Chudakov, Cobalamin-responsive psychosis as the sole manifestation of vitamin B12 deficiency, *Isr Med Assoc J*, **2001**, 3(9), str. 701-703
- <sup>38</sup> A. Hunt, D. Harrington, Vitamin B12 deficiency, *BMJ*, **2014**, 349
- <sup>39</sup> H. W. Baik, R. M. Russel, Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the elderly, *Annu Rev Nutr*, **1999**, 19, str. 357-377
- <sup>40</sup> W. L. Neumann, E. Coss, Autoimmune atrophic gastritis-pathogenesis, pathology and management, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **2013**, 10(9), str. 529-541
- <sup>41</sup> E. Lahner, S. Persechino, Micronutrients (Other than iron) and Helicobacter pylori infection: a systematic review, *Helicobacter*, **2012**, 17(1), str. 1-15
- <sup>42</sup> R. Carmel, How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency, *Blood*, **2008**, 112(6), str. 2214-2221
- <sup>43</sup> L. A. Lane, C. F. Rojas, Treatment of vitamin B<sub>12</sub>-deficiency anemia: oral versus parenteral therapy, *Ann Pharmacother*, **2002**, 36, str. 1268-1272
- <sup>44</sup> C. Ho, G. P. Kauwell, Practitioners' guide to meeting the vitamin B-12 recommended dietary allowance for people aged 51 years and older, *J Am Diet Assoc*, **1999**, 99, str. 725-727
- <sup>45</sup> R. Grasbeck, Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B<sub>12</sub> malabsorption with proteinuria) *Orphanet J Rare Dis*, **2006**, 1, str. 17
- <sup>46</sup> D. Watkins, D. S. Rosenblatt, Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism, *Biochimie*, **2013**, 95, str. 1019-1022
- <sup>47</sup> M. Fenech, Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity, *Mutat Res*, **2012**, 733, str. 21-33
- <sup>48</sup> G. Scalabrino, The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency, *Prog Neurobiol*, **2012**, 220, str. 569-574
- <sup>49</sup> A. McCaddon, Vitamin B12 in neurology and ageing; clinical and genetic aspects, *Biochimie*, **2013**, 95, str. 1066-1076

- 
- <sup>50</sup> D. Ballhausen, L. Mittaz, Evidence for catabolic pathway of propionate metabolism in CNS: expression pattern of methylmalonyl-CoA mutase and propionyl-CoA carboxylase alpha-subunit in developing and adult rat brain, *Neuroscience*, **2009**, 164, str. 578-587
- <sup>51</sup> S. L. Roderick, B. W. Matthews, Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme, *Biochemistry*, **1993**, 32, str. 3907-3912
- <sup>52</sup> W. T. Lowther, B. W. Matthews, Structure and function of the methionine aminopeptidases, *Biochim Biophys Acta*, **2000**, 1447, str. 157-167
- <sup>53</sup> M. Kobayashi, S. Shimizu, Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology, *Nature Biotechnol*, **1998**, 16, str. 733-736
- <sup>54</sup> J. W. Schmidberger, L. J. Hepworth, Enzymatic Synthesis of Amides, v K. Faber, N. J. Turner, *Biocatalysis in Organic Synthesis 1*, **2015**, str. 329-372
- <sup>55</sup> T. Nagasawa, D. C. Mathew, Nitrile Hydratase-Catalyzed Production of Nicotinamide from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous*, *Appl Environ Microbiol*, **1988**, 54, str. 1766-1769
- <sup>56</sup> M. S. Payne, S. Wu, A stereoselective cobalt-containing nitrile hydratase, *Biochemistry*, **1997**, 36, str. 5447-5554
- <sup>57</sup> M. Ghosh, A. M. Grunden, Characterization of native and recombinant forms of an unusual cobalt-dependent proline dipeptidase (prolidase) from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus*, *J Bacteriol*, **1998**, 180, str. 4781-4789
- <sup>58</sup> X. Y. Zhu, M. K. Teng, Structure of xylose isomerase from *Streptomyces diastaticus* No. 7 strain M1033 at 1.85 Å resolution, *Acta Crystallogr Sect D*, **2004**, 56, 129-136
- <sup>59</sup> T. Arakawa, Y. Kawano, Structure of thiocyanate hydrolase: a new nitrile hydratase family protein with a novel five-coordinate cobalt(III) center, *J Mol Biol*, **2006**, 366, str. 1497-1509
- <sup>60</sup> D. V. Reddy, S. Rothmund, Structural characterization of the entire 1.3S subunit of transcarboxylase from *Propionibacterium shermanii*, *Protein Sci*, **1998**, 7, str. 2156-2163
- <sup>61</sup> P. R. Hall, R. Zheng, Transcarboxylase 5S structures: assembly and catalytic mechanism of a multienzyme complex subunit, *EMBO J*, **2004**, 23, str. 3621-3631
- <sup>62</sup> M. Dennis, P. E. Kolattukudy, A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO, *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**, 89, str. 5306-5310
- <sup>63</sup> N. Itoh, T. Kawanami, Cloning and biochemical characterization of Co<sup>2+</sup>-activated bromoperoxidase-esterase (perhydrolase) from *Pseudomonas putida* IF-3 strain, *Biochim Biophys Acta*, **2001**, 1545, str. 53-66
- <sup>64</sup> T. Eitinger, J. Suhr, Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations, *Biometals*, **2005**, 18, str. 399-405
- <sup>65</sup> D. A. Rodionov, P. Hebbeln, Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters, *J Bacteriol*, **2006**, 188, str. 317-327
- <sup>66</sup> T. Eitinger, Cobalt transporters, v R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, *Encyclopedia of Metalloproteins*, **2013**, str. 680
- <sup>67</sup> D. A. Rodionov, P. Hebbeln, A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes, *J Bacteriol*, **2009**, 191, str. 42-51
- <sup>68</sup> T. Eitinger, D. A. Rodionov, Canonical and EFC-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions, *FEMS Microbiol Rev*, **2011**, 35, str. 3-67
- <sup>69</sup> T. Eitinger, J. Suhr, Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations, *Biometals*, **2005**, 18, str. 399-405
- <sup>70</sup> Y. Zhang, D. A. Rodionov, Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B<sub>12</sub> utilization, *BMC Genomics*, **2009**, 10, str. 78

- 
- <sup>71</sup> R. Koebnik, TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule?, *Trends Microbiol*, **2005**, 8, str. 343-347
- <sup>72</sup> D. Niegowski, S. Eshaghi, The CorA family: structure and function revisited, *Cell Mol Life Sci*, **2007**, 64, str. 2564-2574
- <sup>73</sup> Y. Xia, A-K. Lundbäck, Co<sup>2+</sup> selectivity of *Thermotoga maritima* CorA and its inability to regulate Mg<sup>2+</sup> homeostasis present a new class of CorA proteins, *J Biol Chem*, **2011**, 286, str. 16525-16532
- <sup>74</sup> K. Schauer, D. A. Rodionov, New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg?', *Trends Biochem Sci*, **2008**, 33, str. 330-338
- <sup>75</sup> B. Rosenberg, L. VanCamp, Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature*, **1969**, 222, str. 385-386
- <sup>76</sup> I. Ott, R. Gust, Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Arch Pharm*, **2007**, 340, str. 117-126
- <sup>77</sup> M. D. Hall, T. W. Failes, Bioreductive activation and drug chaperoning in cobalt pharmaceuticals, *Dalton Trans*, **2007**, 36, str. 3983-3990
- <sup>78</sup> E. L. Chang, C. Simmers, Cobalt Complexes as Antiviral and Antibacterial Agents, *Pharmaceuticals*, **2010**, 3, str. 1711-1728
- <sup>79</sup> F. P. Dwyer, E. C. Gyarfás, Biological Activity of Complex Ions, *Nature*, **1952**, 170, str. 190-191
- <sup>80</sup> J. H. Koch, F. P. Dwyer, E. C. Gyarfás, Effect of Some Neuromuscular Blocking Agents on Mitochondrial Enzyme Systems, *Aust J Biol Sci*, **1956**, 9, str. 371-381
- <sup>81</sup> F. P. Dwyer, I. K. Reid, The biological actions of 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine hydrochlorides, quaternary salts and metal chelates and related compounds. 1. Bacteriostatic action on selected gram-positive, gram-negative and acid-fast bacteria, *Aust J Exp Biol Med Sci*, **1969**, 47, str. 203-218
- <sup>82</sup> C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998), *Pure Appl Chem*, **1998**, 70, str. 1129
- <sup>83</sup> R. A. Cairns, I. S. Harris, Regulation of cancer cell metabolism, *Nature Rev Cancer*, **2011**, 11, str. 85-95
- <sup>84</sup> W. R. Wilson, M. P. Hay, Targetting hypoxia in cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, **2011**, 11, str. 393-410
- <sup>85</sup> R. K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science*, **2005**, 307, str. 58-62
- <sup>86</sup> C. R. Munteanu, K. Suntharalingam, Advances in cobalt complexes as anticancer agents, *Dalton Trans*, **2015**, 44, str. 13796
- <sup>87</sup> Y. Chen, L. Hu, Design of anticancer prodrugs for reductive activation, *Med Res Rev*, **2009**, 29, str. 29-64
- <sup>88</sup> F. Q. Schafer, G. R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radicals Biol Med*, **2001**, 30, str. 1191-1212
- <sup>89</sup> J. M. Brown, W. R. Wilson, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment, *Nat Rev Canc*, **2004**, 4, str. 437-447
- <sup>90</sup> B. A. Teicher, J. L. Jacobs, Some complexes of cobalt(III) and iron(III) are radiosensitizers of hypoxic EMT6 cells, *Radiat Res*, **1987**, 109, str. 36-46
- <sup>91</sup> B. A. Teicher, M. J. Abrams, Cytotoxicity, radiosensitization, antitumor activity, and interaction with hyperthermia of a Co (III) Mustard complex, *Cancer Res*, **1990**, 50, str. 6971-6975
- <sup>92</sup> A. Gilman, The initial clinical trial of nitrogen mustard, *Am J Surg*, **1963**, 105, str. 574-578

- <sup>93</sup> R. F. Anderson, W. A. Denny *et al.*, Pulse radiolysis studies on the hypoxia-selective toxicity of a cobalt-mustard complex, *Br J Cancer, Suppl*, **1996**, 27, str. 48–51
- <sup>94</sup> D. C. Ware, B. D. Palmer *et al.*, Hypoxia-selective antitumor agents. 7. Metal complexes of aliphatic mustards as a new class of hypoxia-selective cytotoxins. Synthesis and evaluation of cobalt(III) complexes of bidentate mustards, *J Med Chem*, **1993**, 36, str. 1839–1846
- <sup>95</sup> D. C. Ware, P. J. Brothers *et al.*, Synthesis, structures and hypoxia-selective cytotoxicity of cobalt(III) complexes containing tridentate amine and nitrogen mustard ligands, *J Chem Soc, Dalton Trans*, **2000**, str. 925–932
- <sup>96</sup> D. C. Ware, H. R. Palmer *et al.*, Bis-tropolonato derivatives of cobalt(III) complexes of bidentate aliphatic nitrogen mustards as potential hypoxia-selective cytotoxins, *J Inorg Biochem*, **1997**, 68, str. 215–224
- <sup>97</sup> P. R. Craig, P. J. Brothers *et al.*, Anionic carbonato and oxalato cobalt(III) nitrogen mustard complexes, *Dalton Trans*, **2004**, str. 611–618
- <sup>98</sup> T. W. Failes, C. Cullinane *et al.*, Studies of a cobalt(III) complex of the MMP inhibitor marimastat: a potential hypoxia-activated prodrug, *Chem – Eur J*, **2007**, 13, str. 2974–2982
- <sup>99</sup> C. E. Brinckerhoff, L. M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**, 3, str. 207–214
- <sup>100</sup> K. Nabeshima, T. Inoue *et al.*, Cell Migration in Development and Disease, *Pathol Int*, **2002**, 52, str. 255–264
- <sup>101</sup> L. M. Coussens, B. Fingleton *et al.*, Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science*, **2002**, 295, str. 2387–2392
- <sup>102</sup> S. R. Bramhall, M. T. Hallissey *et al.*, Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial, *Br J Cancer*, **2002**, 86, str. 1864–1870
- <sup>103</sup> T. W. Failes, T. W. Hambley, Models of hypoxia activated prodrugs: Co(III) complexes of hydroxamic acids *Dalton Trans*, **2006**, str. 1895–1901
- <sup>104</sup> G. O. Ahn, D. C. Ware *et al.*, Optimization of the Auxiliary Ligand Shell of Cobalt(III)(8-Hydroxyquinoline) Complexes as Model Hypoxia-Selective Radiation-Activated Prodrugs, *Radiat Res*, **2004**, 162, str. 315–325
- <sup>105</sup> J. Y. Chang, R. J. Stevenson *et al.*, Syntheses of 8-quinolinolato cobalt(III) complexes containing cyclen based auxiliary ligands as models for hypoxia-activated prodrugs, *Dalton Trans*, **2010**, 39, str. 11535–11550
- <sup>106</sup> G. O. Ahn, K. J. Botting *et al.*, Radiolytic and cellular reduction of a novel hypoxia-activated cobalt(III) prodrug of a chloromethylbenzindoline DNA minor groove alkylator, *Biochem Pharmacol*, **2006**, 71, str. 1683–1694
- <sup>107</sup> G. L. Lu, R. J. Stevenson *et al.*, N-Alkylated cyclen cobalt(III) complexes of 1-(chloromethyl)-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,2-f]quinolin-5-ol DNA alkylating agent as hypoxia-activated prodrugs, *Bioorg Med Chem*, **2011**, 19, str. 4861–4867
- <sup>108</sup> J. B. Milbank, R. J. Stevenson *et al.*, Synthesis and evaluation of stable bidentate transition metal complexes of 1-(chloromethyl)-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-ylcarbonyl)-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,2-f]quinoline (seco-6-azaCBI-TMI) as hypoxia selective cytotoxins, *J Med Chem*, **2009**, 52, str. 6822–6834
- <sup>109</sup> J. Y.-C. Chang, G.-L. Lu *et al.*, Cross-bridged cyclen or cyclam Co(III) complexes containing cytotoxic ligands as hypoxia-activated prodrugs, *Inorg Chem*, **2013**, 52, str. 7688–7698
- <sup>110</sup> N. Cenas, Z. Anusevicius *et al.*, The electron transfer reactions of NADPH: cytochrome P450 reductase with non-physiological oxidants, *Arch Biochem Biophys*, **1994**, 315, str. 400–406

- <sup>111</sup> N. Yamamoto, S. Danos *et al.*, Cellular uptake and distribution of cobalt complexes of fluorescent ligands, *J Biol Inorg Chem*, **2008**, 13, str. 861–871
- <sup>112</sup> N. S. Bryce, B. J. Kim *et al.*, Visualising the hypoxia selectivity of cobalt(III) prodrugs, *Chem Sci*, **2011**, 2, str. 2135–2142.
- <sup>113</sup> N. S. Bryce, B. J. Kim *et al.*, Dual targeting of hypoxic and acidic tumor environments with a cobalt(III) chaperone complex, *J Med Chem*, **2012**, 55, str. 11013–11021
- <sup>114</sup> N. S. Bryce, A. K. Renfrew *et al.*, Delivery and release of curcumin by a hypoxia-activated cobalt chaperone: a XANES and FILM study, *Chem Sci*, **2013**, 4, str. 3731–3739
- <sup>115</sup> D. Tomco, S. Schmitt *et al.*, Effects of tethered ligands and of metal oxidation state on the interactions of cobalt complexes with the 26S proteasome, *J Inorg Biochem*, **2011**, 105, str. 1759–1766
- <sup>116</sup> P. A. Ajibade, G. A. Kolawole, Cobalt(III) Complexes of Some Antimalarial Drugs: Synthesis, Characterization, and *in vitro* Antiprotozoal Studies, *Synth React Inorg Met-Org Chem*, **2010**, str. 273–278
- <sup>117</sup> Redox Pharmaceutical Cooperation, <http://www.redoxpharm.com/>
- <sup>118</sup> P. A. Asbel, S. P. Epstein *et al.*, Efficacy of cobalt chelates in the rabbit eye model for epithelial herpetic keratitis, *Cornea*, **1998**, 17, str. 550–557
- <sup>119</sup> T. Takeuchi, A. Böttcher *et al.*, Inhibition of thermolysin and human alpha-thrombin by cobalt(III) Schiff base complexes, *Bioorg Med Chem*, **1999**, 7, str. 815–819
- <sup>120</sup> S. P. Epstein, Y. Y. Pashinsky *et al.*, Efficacy of topical cobalt chelate CTC-96 against adenovirus in a cell culture model and against adenovirus keratoconjunctivitis in a rabbit model, *BMC Ophthalmol*, **2006**, 6, str. 22
- <sup>121</sup> J. B. Delehanty, J. E. Bongard *et al.*, Antiviral properties of cobalt(III)-complexes, *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, str. 830–837
- <sup>122</sup> P. Řezáčová, P. Cígler *et al.*, Design of HIV protease inhibitors based on inorganic polyhedral metallacarboranes, *J Med Chem*, **2009**, 52, str. 7132–7141.
- <sup>123</sup> P. Nagababu, J. N. L. Latha *et al.*, Studies on antimicrobial activity of cobalt(III) ethylenediamine complexes, *Can J Microbiol*, **2006**, 52, str. 1247–1254
- <sup>124</sup> E. Keskiöglu, A. B. Güendüzalp *et al.*, Cr(III), Fe(III) and Co(III) complexes of tetradentate (ONNO) Schiff base ligands: Synthesis, characterization, properties and biological activity, *Spectrochim Acta*, **2008**, 70, str. 634–640
- <sup>125</sup> B. Murukan, K. Mohanan, Synthesis, characterization and antibacterial properties of some trivalent metal complexes with [(2-hydroxy-1-naphthaldehyde)-3-isatin]-bishydrazone. *J. Enzyme Inhib Med Chem*, **2007**, 22, str. 65–70
- <sup>126</sup> M. Poyraz, M. Sari *et al.*, Synthesis, crystal structure and biological activity of 1-(1H-benzimidazol-2-yl)-ethanone thiosemicarbazone and its cobalt complex. *Polyhedron*, **2008**, 27, str. 2091–2096
- <sup>127</sup> V. K. Sharma, S. Srivastava, Synthesis and characterization of trivalent chromium, manganese, iron and cobalt complexes with Schiff bases derived from 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazoles, *Indian J Chem*, **2006**, 45, str. 1368–1374
- <sup>128</sup> D. U. Miodragović, G. A. Bogdanović *et al.*, Interesting coordination abilities of antiulcer drug famotidine and antimicrobial activity of drug and its cobalt(III) complex, *J Inorg Biochem*, **2006**, 100, str. 1568–1574
- <sup>129</sup> I. Nemeč, P. Zoufálý, R. Herchel, Z. Trávníček, Cobalt(III) Schiff-base cyanido complex usable as a ligand in preparation of heterobimetallic Co(III)–Fe(III) building blocks, *Inorg Chem Commun*, **2013**, 35, str. 50–53
- <sup>130</sup> L. Pogány, J. Moncol, M. Gál, I. Šalitraš, R. Boča, Four cobalt(III) Schiff base complexes – Structural, spectroscopic and electrochemical studies, *Inorg Chim Acta*, **2017**, 462, str. 23–29

---

<sup>131</sup> I. Nemeč, R. Boča, M. Gembický, L. Dlháň, R. Herchel, F. Renz, High-spin Schiffbase dinuclear iron(III) complexes bridged by N-oxide ligands, *Inorg Chim Acta*, **2009**, 362, str. 4754–4759

<sup>132</sup> P. Kania, *Infračervená spektrometrie*, <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená+spektrometrie.pdf>

<sup>133</sup> K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., **1986**, str. 121-124

<sup>134</sup> R. M. Issa, A. M. Khedr, H. Rizk, <sup>1</sup>H NMR, IR and UV/VIS Spectroscopic Studies of Some Schiff Bases Derived From 2-Aminobenzothiazole and 2-Amino-3-hydroxypyridine, *J Chin Chem Soc-Taipei*, **2008**, 55, str. 875-884

<sup>135</sup> R. Novotná, T. Šilha, Z. Trávníček, *Spektrální metody studia chemických látek*, Olomouc, **2011**, str. 8-9

<sup>136</sup> R. S. Nicholson, S. Irving, Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems, *Anal Chem*, **1964**, 36, str. 706–723

<sup>137</sup> N. Elgrishi, K. J. Rountree *et al.*, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J Chem Educ*, **2018**, 95, str. 197-206

<sup>138</sup> P. Štarha, Z. Trávníček, *Termická analýza*, Olomouc, **2011**, str. 24-34