

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra anorganické chemie**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Příprava můstkových ligandů pro dvoujaderné komplexní  
sloučeniny kondenzací aromatických aldehydů s beta-diketony**

Autor: Lucie Kotásková

Studijní obor: Bioanorganická chemie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Termín odevzdání: 30. 4. 2018

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci sepsala samostatně pod odborným dohledem Ing. Ivana Nemce, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Lucie Kotásková

Chtěla bych poděkovat Ing. Ivanu Nemcovi, Ph.D. za odborné vedení a připomínky při vypracovávání bakalářské práce a za provedení rentgenové strukturní analýzy a interpretaci struktur. Dále bych chtěla poděkovat Pavle Richterové za provedení elementární analýzy, RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D. za provedení NMR spektroskopie a pomoc s interpretací naměřených spekter a Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za provedení infračervené spektroskopie a pomoc s interpretací naměřených spekter. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Pavlu Zoufalému za pomoc při pokročilých syntézách. Rovněž bych chtěla poděkovat vedoucímu Katedry anorganické chemie, prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D., za možnost vypracovat bakalářskou práci na půdě uvedené katedry.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Lucie Kotásková

Název práce: Příprava můstkových ligandů pro dvoujaderné komplexní sloučeniny kondenzací aromatických aldehydů s beta-diketony

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

**Abstrakt:** Heterodvoujaderné sloučeniny se staly předmětem mnoha studií a jsou připravovány zejména pro své cytotoxické vlastnosti napříč různými buněčnými liniemi. Kombinace dvou odlišných kovů v jediné sloučenině podporuje zvýšení léčebného účinku. Kovové atomy jsou ve vícejaderných sloučeninách vázány můstkovými ligandy a tato práce se zabývá přípravou tohoto typu ligandů. Syntézy byly prováděny Knoevenagelovou kondenzací aromatických aldehydů s beta-diketony za vzniku příslušných kondenzátů. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí elementární analýzy, nukleární magnetické rezonance, infračervené spektroskopie a rentgenové strukturní analýzy.

Klíčová slova: Heterodvoujaderná sloučenina, protinádorové činidlo, můstkový ligand, Knoevenagelova kondenzace, beta-diketon, aromatický aldehyd

Počet stran: 49

Jazyk: Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Lucie Kotásková

Title: Preparation of bridging ligands for dinuclear complexes using condensation of aromatic aldehydes and beta-diketones

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

The year of presentation: 2018

**Abstract:** Heterobimetallic compounds are the subject of many studies and they are of a great interest because of their cytotoxic properties across different cell lines. The combination of two different metals in a single compound may promote a significant increase in the therapeutic effect. The metal atoms are in the polynuclear compounds linked by bridging ligands and the thesis deals with preparation of this type of ligands. The syntheses were performed by Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes with beta-diketones to form the corresponding condensates. Prepared compounds were characterized by elemental analysis, nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy and single-crystal X-ray structure analysis.

Keywords: Heterobimetallic compound, antitumor agent, bridging ligand, Knoevenagel condensation, beta-diketone, aromatic aldehyde

Number of pages: 49

Language: Czech

# OBSAH

1 ÚVOD.....	7
1. 1 CÍLE PRÁCE .....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2. 1 HETERODVOUJADERNÉ KOMPLEXY 3D-5D KOVŮ.....	9
2. 1. 1 Komplexy mědi a platiny .....	9
2. 1. 2 Komplexy titanu a zlata.....	12
2. 4. 2 Komplexy titanu a platiny .....	14
2. 2 HETERODVOUJADERNÉ KOMPLEXY 4D-5D KOVŮ.....	15
2. 1. 2 Komplexy ruthenia a platiny .....	15
2. 3 HETERODVOUJADERNÉ KOMPLEXY 5D-5D KOVŮ.....	20
2. 3. 1 Komplexy platiny a zlata.....	20
2. 3. 2 Komplexy platiny a rhenia .....	22
2. 3. 3 Komplexy rhenia a zlata.....	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE.....	25
3.2 PŘÍPRAVA SLOUČENIN.....	26
3. 2. 1 Příprava symetrických prekurzorů .....	27
3. 2. 2 Příprava nesymetrických prekurzorů .....	28
3. 2. 3 Příprava Schiffových bází .....	33
4 DISKUZE .....	34
4. 1 SYNTÉZA .....	34
4. 2 CHARAKTERIZACE (NMR, IČ SPEKTROSKOPIE) .....	39
4. 3 KRYSTALOVÉ STRUKTURY .....	40
5 ZÁVĚR.....	44
6 POUŽITÁ LITERATURA .....	45

# 1 ÚVOD

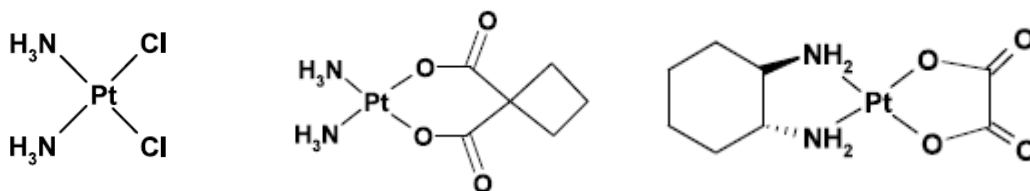
Objev protinádorových účinků cisplatin v druhé polovině minulého století vedl k velkému pokroku v léčbě rakoviny. Mimo cisplatinu byly studovány i jiné sloučeniny, a to například komplexy ruthenia (NAMI-A, NKP1339), zlata (auranofin) nebo titanu (titanocen dichlorid). Cisplatina je dodnes velmi frekventovaně využívaným kancerostatikem v boji proti různým typům nádorových buněk. Přestože jsou účinky cisplatin nezpochybnitelné, tato látka vykazuje mnoho nežádoucích vedlejších účinků na organismus (neurotoxicita, nefrotoxicita, ototoxicita či nevolnost) a dále mnohé z těchto nádorových buněk mají značnou rezistenci vůči cisplatině, která je nejčastěji způsobena opakovaným podáváním léčiva. Z těchto důvodů je potřeba vyvíjet nová kancerostatika, která by byla účinnější, a zároveň se jejich podáváním minimalizovaly vedlejší účinky. Vhodnou alternativou se jeví heterodvojjaderné sloučeniny, které ve své struktuře obsahují dva odlišné centrální kovy, nejčastěji kovy přechodné. Tyto kovy dokáží pracovat synergicky, zvýšit tak léčebný účinek a fungovat v organismu odlišným mechanismem účinku než zmíněná cisplatina. Mnohé sloučeniny z této skupiny komplexů byly připraveny a zároveň byly sledovány jejich cytotoxické účinky vůči různým buněčným liniím [1-7].

## 1.1 Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracovat literární rešerši týkající se biologické aktivity vybraných heterodvojjaderných sloučenin s důrazem na sloučeniny s centrálními atomy 3d a 5d kovů. Cílem experimentální části je příprava můstkových ligandů Knoevenagelovou kondenzací aromatických aldehydů (např. benzen-1,4-dikarbaldehyd, 4-formylbenzoová kyselina) s beta-diketony (např. acetylaceton) a tyto připravené sloučeniny charakterizovat dostupnými analytickými metodami.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

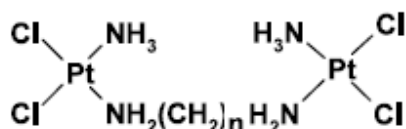
K významným protinádorovým činidlům patří bezesporu sloučeniny platiny. Mezi tyto látky řadíme mimo jiné cisplatinu (*cis*-diamin-dichloroplatinatý komplex,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ , obr.1), která byla připravena již v roce 1844 Michele Peyronem, avšak teprve v 60. letech 20. století Barnett Rosenberg objasnil mechanismus účinku a zjistil, že cisplatinu vyvolává zastavení buněčného cyklu, a tím se stala důležitým terapeutikem při léčbě rakoviny. Nejčastěji se cisplatinu podává při léčbě rakoviny plic, vaječníků, varlat, prsou nebo také při léčbě nádorových buněk na mozku [8]. Nádorové buňky si však při dlouhodobé chemoterapii postupně vytvářejí rezistenci, navíc bylo objeveno mnoho nežádoucích účinků jako nefrotoxicita, ototoxicita, hepatotoxicita, kardiotoxicita, gastrointestinální toxicita, neurotoxicita či chudokrevnost [9]. Dalšími zástupci této skupiny jsou například karboplatina nebo oxaliplatin (Obr. 1), jejichž mechanismus účinku je obdobný jako u cisplatinu, nicméně vykazují menší míru vedlejších účinků.



**Obr. 1:** Strukturní vzorec cisplatinu, karboplatiny a oxaliplatinu (převzato z [10] a upraveno)

Snahou je vytvořit takové látky, které by byly účinnější, šetrnější k organismu, s minimálními vedlejšími účinky. Vhodnou alternativou mohou být dvoujaderné komplexy s můstkovými ligandy, kterými by bylo možné obejít rezistenci tumorů vůči již zmíněným sloučeninám. Příkladem lze uvést sloučeniny s obecným vzorcem  $[\{\text{PtCl}_m(\text{NH}_3)_{3-m}\}(\mu\text{-H}_2\text{N-R-NH}_2\text{-}\{\text{PtCl}_n\text{-}(\text{NH}_3)_{3-n}\})]^{[(2-m)+(2-n)]+}$  (Obr. 2), kde  $m$  nebo  $n$  je 0-3 a R je alifatický můstek. Dvoujaderné sloučeniny jsou schopny vytvářet odlišné, flexibilnější a nesměrové adukty s DNA, které nejsou přístupny pro jednojaderné komplexy, navíc navázání některých bimetalických látek na DNA je mnohem rychlejší než navázání jednojaderných. Faktory ovlivňující rychlost navázání mohou být délka a náboj alifatického řetězce spojujícího oba kovy, celkový náboj sloučeniny nebo zda se sloučenina váže jen na jedno či obě vlákna DNA [10-12].





**Obr. 2:** Strukturální vzorec dvoujaderného komplexu s můstkovým ligandem;  $m, n = 2$ ; R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (převzato z [10])

Jako slibná cytostatika se jeví heterodvoujaderné sloučeniny, protože odlišné centrální atomy jsou schopny působit synergicky, tzn. zvýšit léčebný účinek, a to díky dvěma (v případě vícejaderných sloučenin i více) atomům kovů v jediné molekule, a navíc je také možné dosáhnout více biologických cílů [13].

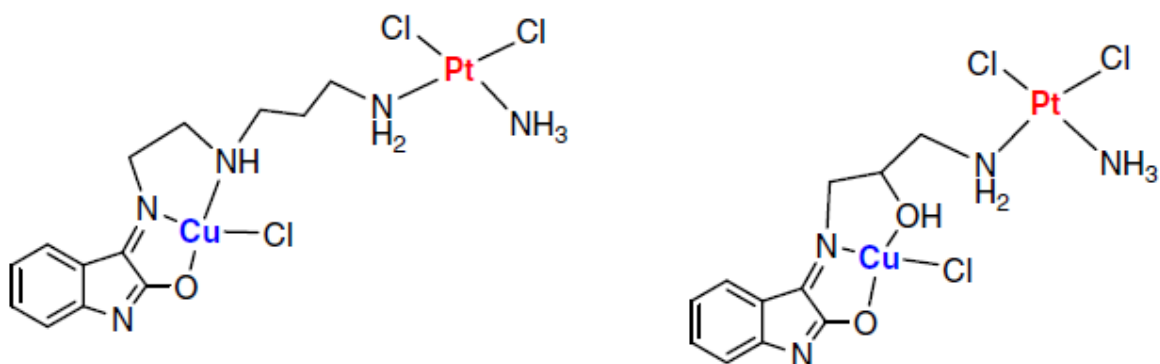
Mezi atomy kovů často využívaných do struktur heterodvoujaderných sloučenin zahrnujeme zejména platinu schopnou navázat se na DNA [8]. Jiným takovým centrálním atomem může být zlato, přičemž komplexy se zlatem (Au<sup>I</sup>) se využívají při léčbě revmatoidní artritidy (auranofin), ale své využití mají i komplexy Au<sup>III</sup>, která se zkoumají pro své protinádorové vlastnosti [14]. Dále pak měď, která zasahuje proteiny či mitochondrie [15], komplexy s centrálním atomem titanu (konkrétně titanocen dichlorid) se navazují na DNA [16] nebo komplexy s atomem ruthenia vykazující protinádorové účinky (NKP 1339, NAMI-A) [17]. Byly popsány různé příklady heterodvoujaderných sloučenin s centrálními atomy přechodných kovů v různých uspořádáních, vybranou část z nich prezentuji v teoretické části této práce.

## **2. 1 Heterodvoujaderné komplexy 3d-5d kovů**

### **2. 1. 1 Komplexy mědi a platiny**

Komplexy [Cu(Cl)L<sup>1</sup>Pt(NH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>]Cl a [Cu(Cl)L<sup>2</sup>Pt(NH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>], (L<sup>1</sup> = 3-({2-[(3-aminopropyl)amino]ethyl}imino)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on, L<sup>2</sup> = 3-[(3-amino-2-hydroxypropyl)imino]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on, obr. 3), obsahují jako tridentátní ligand oxindolimin (váže atom mědi) a z něho vycházející alifatické rameno zakončeno primárním aminem (váže atom platiny). Obě koordinační místa tohoto ligandu jsou schopny silně vázat oba kovové atomy a byly použity ke zvýšení aktivity komplexu při štěpení DNA oproti jednojaderným Cu<sup>II</sup> komplexům [CuL<sup>1</sup>(H<sub>2</sub>O)Cl]Cl a [CuL<sup>2</sup>(H<sub>2</sub>O)Cl]Cl. Předpokládá se, že obě

části molekuly se svým vlastním kovovým centrem budou mít odlišný mechanismus účinku. Oxindoliminová část s mědí dokáže oxidačním mechanismem poškodit DNA a mitochondrie (v přítomnosti redukčního činidla nebo kyslíku vykazují komplexy mědi generováním reaktivních forem kyslíku (ROS) aktivitu štěpení, ROS oxidují DNA a vedou k modifikování báze nebo štěpení řetězce) a mohou také inhibovat klíčové proteiny, zatímco platinová část silným navázáním na DNA vyvolá deformaci, která zabraňuje její replikaci a zároveň inhibuje transkripci [1, 18].



**Obr. 3:** Strukturální vzorce komplexů  $[\text{CuCl}(\text{L}^1)\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Cl}_2]\text{Cl}$  a  $[\text{CuCl}(\text{L}^2)\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Cl}_2]$  (převzato z [1] a upraveno)

Protinádorová aktivita byla testována u obou oxindoliminových  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexů vůči B16F10 myšim melanomu, lidským sarkomům dělohy MES-SA a odpovídajícím rezistentním sarkomům MES-SA/Dox5 (rezistentní vůči protinádorovému léčivu doxorubicin). Cytotoxicita komplexů se srovnávala s odpovídajícími jednojadernými oxindoliminovými  $\text{Cu}^{\text{II}}$  komplexy a cisplatinou (Tab. 1).

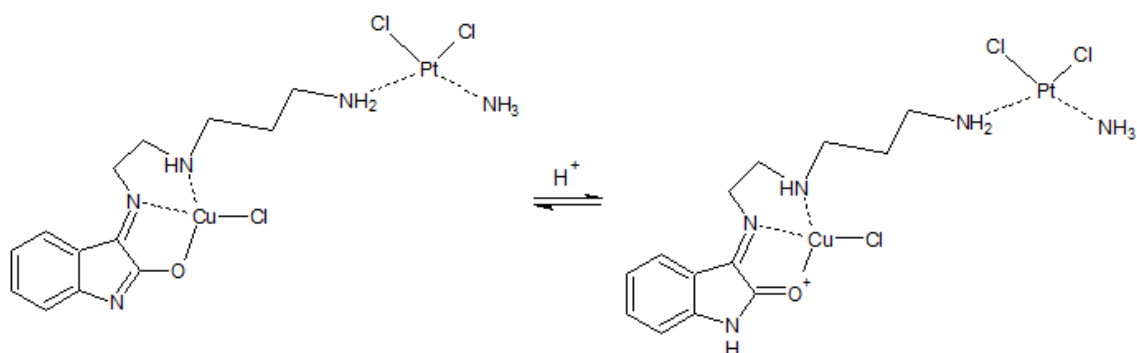
Cells	IC <sub>50</sub> values / $\mu\text{M}$				
	MES-SA		MES-SA/Dox5		B16F10 melanoma
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h
[CuL <sup>1</sup> ]	17.0 ± 0.8	11.6 ± 0.6	19.2 ± 0.9	12.4 ± 0.6	1.98 ± 0.18
[CuL <sup>2</sup> ]	13.2 ± 0.7	9.7 ± 0.5	9.1 ± 0.5	13.8 ± 0.6	2.72 ± 1.06
[CuL <sup>1</sup> Pt]	4.07 ± 0.30	0.98 ± 0.05	10.8 ± 0.6	0.94 ± 0.05	0.63 ± 0.25
[CuL <sup>2</sup> Pt]	3.38 ± 0.30	2.89 ± 0.20	4.85 ± 0.30	0.98 ± 0.05	1.91 ± 0.20
Cisplatin	2.62 ± 0.20	0.93 ± 0.06	7.70 ± 0.60	0.46 ± 0.03	2.88 ± 0.45

**Tab. 1:** Hodnoty IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) jednojaderných  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , dvoujaderných  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexů a cisplatinu sledované u lidských sarkomech dělohy MES-SA, rezistentních MES-SA/Dox5 a melanomu B16F10 po 24 a 48 hod. inkubace při 37 °C (převzato z [1] a upraveno)

Z testování vůči sarkomům dělohy je patrné, že  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexy jsou výrazně účinnější než odpovídající komplexy mědi, přičemž  $[\text{CuL}^1\text{Pt}]$  je v porovnání s  $[\text{CuL}^2\text{Pt}]$  po 48 hodinách inkubace aktivnější, nicméně je podobně aktivní jako cisplatina ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ). Oproti standardním buňkám (MES-SA) vykazovaly  $[\text{CuL}^1\text{Pt}]$  a  $[\text{CuL}^2\text{Pt}]$  komplexy u rezistentních sarkomů nižší toxicitu a jejich hodnota  $\text{IC}_{50}$  po 24 hodinách inkubace byla vyšší. Komplexy mědi nabývají zhruba podobných hodnot jak u MES-SA, tak MES-SA/Dox5, proto je rezistence s velkou pravděpodobností selektivní pro platinu. U  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexů při testování aktivity vůči B16F10 melanomu  $\text{IC}_{50}$  opět ukazují, že jsou cytotoxičtější než ostatní sledované látky.

Na základě výsledků lze tedy říci, že vložení  $\text{Pt}^{\text{II}}$  do struktury oxindoliminového  $\text{Cu}^{\text{II}}$  komplexu značně zvyšuje protinádorovou aktivitu, dále pak komplex  $[\text{CuL}^1\text{Pt}]$  je díky delšímu můstkovému ligandu aktivnější než  $[\text{CuL}^2\text{Pt}]$  a jeho hodnoty  $\text{IC}_{50}$  jsou nižší nebo srovnatelné s  $\text{IC}_{50}$  hodnotou cisplatiny. Je však nutno dodat, že tyto heterodvoujaderné sloučeniny jsou méně cytotoxické na rozdíl od cisplatiny, a to v případě buněk MES-SA po 24 hodinách inkubace [1].

Za zmínku stojí i fakt, že oxindoliminová část nenarušuje pouze DNA a mitochondrie, ale mimo jiné inhibuje i cyklin-dependentní kinázy, což je zásadní při protinádorové aktivitě léčiva, inhibice totiž vede k indukci apoptózy tumorů. Aktivita oxindoliminu může být vysvětlena tautomerní rovnováhou (obr. 4) – v enolové formě funguje jako donor elektronu, který se využívá při tvorbě vodíkové vazby (skrze dusík indolového kruhu) se zbytky proteinů [19].



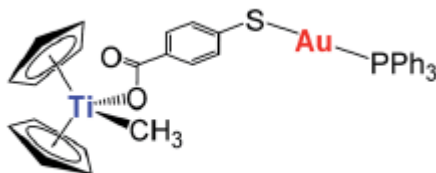
**Obr. 4:** Tautomerizace mezi enol a keto formou  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexu

## 2. 1. 2 Komplexy titanu a zlata

Velké pozornosti se při studiu biologické aktivity komplexů s centrálním atomem titanu dostalo organokovové sloučenině titanocen dichloridu (dichloridobis( $\eta^5$ -cyklopentadienyl)titan; TDC), který byl již v 90. letech minulého století podroben klinickému testování. TDC při studiích vykazoval vedlejší účinky jako je nefrotoxicita, avšak nepoukazoval na jakýkoliv účinek na proliferační aktivitu kostní dřeně a mimo jiné disponuje značnou protinádorovou aktivitou vůči buňkám a nádorům rezistentním na cisplatinu [20]. V další fázi testování byla aktivita sledována u pacientů s metastazujícím karcinomem ledvinových buněk [21] nebo s metastazujícím karcinomem prsu [22]. Účinek TDC byl však příliš nízký, aby jej bylo možné dále sledovat. Aby se předešlo těmto problémům, připravily se jiné deriváty TDC jako například titanocen Y (dichloridobis( $\eta^5$ -(*p*-methoxybenzyl)cyklopentadienyl)titan) [23].

Sloučeniny zlata si při léčbě rakoviny pokládají za cíl proteiny, např. thioredoxin, dále pak slouží k léčbě revmatoidní artritidy, AIDS nebo parazitických onemocnění (spavá nemoc) [24]. Některé komplexy zlata vykazují i antiproliferační účinky [25]. K vylepšení protinádorových vlastností těchto dvou skupin metaloterapeutik se různé vědecké skupiny snažily o návrh a přípravu heterodvoujaderných sloučenin titanu a zlata.

Byla navržena struktura a sledována biologická aktivita sloučeniny se vzorcem  $[(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{Ti}(\text{Me})(\mu\text{-mba})\text{Au}(\text{PPh}_3)]$  (Obr. 5). Za vhodný můstkový ligand byl vybrán ligand mba, odvozený od 4-merkaptobenzoové kyseliny ( $\text{H}_2\text{mba}$ ), který je schopen kovalentně vázat obě kovová centra [2].



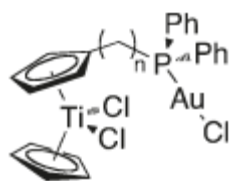
**Obr. 5:** Strukturní vzorec  $[(\eta\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{TiMe}(\mu\text{-mba})\text{Au}(\text{PPh}_3)]$  (převzato z [2])

Cytotoxicita dané sloučeniny se sledovala u ledvinových nádorových buněčných linií Caki-1, ledvinových buněčných linií bez nádoru (HEK-293T) a buněk ledvinového proximálního kanálku (RPTC). Buňky se inkubovaly se sloučeninou po dobu 72 hodin a výsledky byly srovnány (kromě buněk RPTC) s cisplatinou, TDC a titanocenem Y. Z výsledků

studie plyne, že heterodvoujaderná sloučenina titanu a zlata je mnohem toxičtější u buněk Caki-1 i HEK-293T ( $IC_{50} = 0,12 \mu\text{M}$  a  $0,49 \mu\text{M}$ ), než cisplatin ( $IC_{50} = 29 \mu\text{M}$  a  $3,27 \mu\text{M}$ ), TDC ( $IC_{50} >200 \mu\text{M}$  a  $>200 \mu\text{M}$ ) i titanocen Y ( $IC_{50} = 29,42 \mu\text{M}$  a  $>200 \mu\text{M}$ ). Po inkubaci u buněk RPTC výsledek poukazoval na poněkud nižší toxicitu komplexu a hodnota  $IC_{50}$  se rovnala  $2,67 \mu\text{M}$  [2].

Dále se zkoumala aktivita thioredoxin reduktázy (TrxR), jejíž nadměrná exprese dopomáhá k větší rezistenci buněk vůči léčivům (např. cisplatině), proto se tento enzym stává důležitým protinádorovým cílem. Předpokládá se, že je to centrální atom zlata v heterodvoujaderném komplexu, který hraje důležitou roli při inhibici TrxR (a tím i snížení rezistence buněk), pravděpodobně díky své vysoké afinitě k selenu, jenž je součástí aktivního místa v TrxR. Působením takového inhibitoru jako je například auranofin dochází k apoptóze buňky a tento účinek byl již sledován u lidských buněk rakoviny vaječníků [26]. Proto se vyzkoušela aktivita TrxR v buňkách Caki-1 po inkubaci s heterodvoujaderným komplexem a pozorovaná inhibice vystoupala na 68,2 % (pro srovnání při inkubaci s auranofinem 74,1 %). I když naměřená míra inhibice je menší než pro auranofin, přesto je komplex toxičtější k Caki-1 buňkám ( $IC_{50} = 0,12 \mu\text{M}$ , pro auranofin  $IC_{50} = 3,08 \mu\text{M}$ ), což naznačuje, že inhibice TrxR není jediným faktorem podílejícím se na cytotoxických mechanismech těchto heterodvoujaderných sloučenin [2].

Sloučeniny podobné struktury, které byly syntetizovány a testovány, jsou komplexy s obecným vzorcem  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\mu\text{-}\eta^5\text{:}\kappa^1\text{-C}_5\text{H}_4\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{PPh}_2)\text{TiCl}_2]\text{AuCl}$  ( $n = 0, 2, \text{ nebo } 4$ ) (obr. 6). U komplexů byly studovány jejich antiproliferační vlastnosti na lidských nádorových buněčných liniích vaječníků (A2780) a jejich variantě rezistentních vůči cisplatině (A2780cisR). Z výsledků (obr. 6) je patrná značná cytotoxická aktivita komplexů oproti cisplatině, a to v obou zmíněných buněčných liniích [27].



compound	IC <sub>50</sub> (μM)	
	A2780	A2780cisR
4 [(η <sup>5</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )TiCl <sub>2</sub> (μ-η <sup>5</sup> :κ <sup>1</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> PPh <sub>2</sub> )]AuCl	3.7 ± 1.3	3.4 ± 0.9
6 [(η <sup>5</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )TiCl <sub>2</sub> (μ-η <sup>5</sup> :κ <sup>1</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> PPh <sub>2</sub> )]AuCl	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.6
8 [(η <sup>5</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )TiCl <sub>2</sub> (μ-η <sup>5</sup> :κ <sup>1</sup> -C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> PPh <sub>2</sub> )]AuCl	6.3 ± 2.0	2.8 ± 1.3
cisplatin	5.5 ± 1.1	35 ± 7

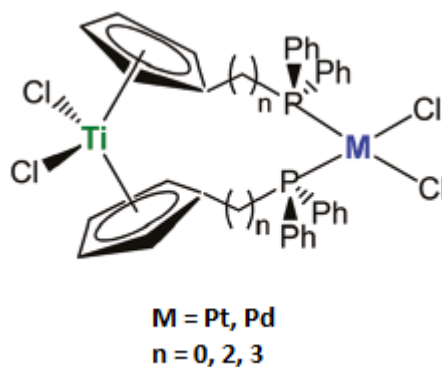
4: n = 0  
 6: n = 2  
 8: n = 4

**Obr. 6:** Strukturální vzorec  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\mu\text{-}\eta^5\text{:}\kappa^1\text{-C}_5\text{H}_4\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{PPh}_2\text{)TiCl}_2\text{]AuCl}$  a hodnoty IC<sub>50</sub> (μM) komplexů (srovnáno s cisplatinou) u buněčných linií A2780 a A2780cisR (převzato z [27] a upraveno)

#### 2. 4. 2 Komplexy titanu a platiny

Vyzkoušena byla také příprava sloučenin s centrálními atomy titanu a platiny, které jsou strukturálně podobné sloučeninám, jakými byly komplexy titanu a zlata (viz obr. 6). Byly připraveny tři komplexy s obecným vzorcem  $[\text{TiCl}_2\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\kappa\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{PPh}_2\}_2(\text{PtCl}_2)]$  (n = 0, 2 nebo 3) (obr. 7) a sledovala se u nich cytotoxicita vůči buňkám rakoviny děložního hrdla (HeLa) a rakoviny prostaty (DU-145). Pouze u komplexu s propylovým ramenem (n = 3) byla zjištěna mírná protinádorová aktivita srovnatelná s cisplatinou (IC<sub>50</sub> = 73,51 μM), a to jen u DU-145 buněčné linie [3].

Společně s komplexy titanu a platiny se připravily a studovaly i obdobné komplexy titanu a paladia (obecný vzorec zůstal nezměněn). U všech těchto sloučenin již byla protinádorová aktivita pozorována, a především pak opět komplex s propylovým ramenem (n = 3) byl nejcytotoxičtější – IC<sub>50</sub> = 4,25 μM (pro srovnání s cisplatinou – IC<sub>50</sub> = 14,9 μM) vůči HeLa buňkám. Co se týče testování vůči DU-145 buněčné linii, pouze komplex bez alkylového ramene (n = 0) vykazoval mírné protinádorové vlastnosti (IC<sub>50</sub> = 49,84 μM) [3].

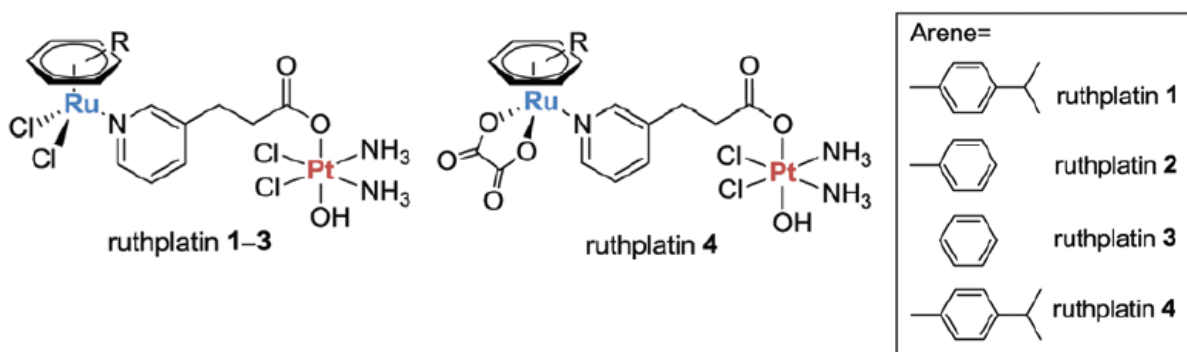


**Obr. 7:** Strukturální vzorec  $[\text{TiCl}_2\{\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\kappa\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{PPh}_2\}_2(\text{MCl}_2)]$ , kde  $\text{M} = \text{Pt, Pd}$  (převzato z [3])

## 2. 2 Heterodvoujaderné komplexy 4d-5d kovů

### 2. 1. 2 Komplexy ruthenia a platiny

Komplexy ruthenia představují důležitou skupinu protinádorových činidel, stále rodící se oblastí je vývoj bifunkčních heterodvoujaderných Pt-Ru sloučenin vykazující cytotoxicitu a antimetastatické vlastnosti. Komplexy  $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{-Ru}^{\text{II}}$ , nazývané též ruthplatiny (Obr. 8), jsou prvními heterodvoujadernými sloučeninami svého druhu, které dokážou být účinné proti nádorovým buňkám rezistentním vůči cisplatině [4].



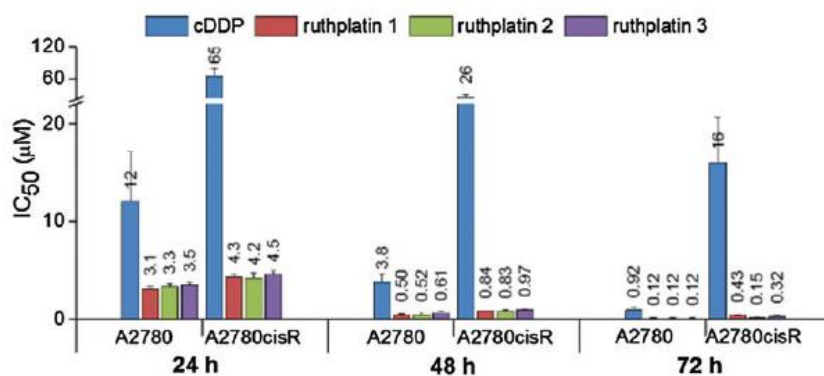
**Obr. 8:** Strukturální vzorce ruthplatin 1 – 4 (převzato z [9])

Všechny čtyři komplexy byly po dobu 72 hodin studovány a všechny projevovaly submikromolární a nanomolární cytotoxicitu, což jsou mnohem vyšší hodnoty než u cisplatiny (až 72×), a to u většiny lidských nádorových buněk. Zajímavostí je až o 107× vyšší aktivita vůči cisplatině rezistentním buňkám A2780cisR oproti samotné cisplatině. Nárůst aktivity byl zaznamenán také u buněk v A549 a A549cisR. Rezistenční faktor (RF) je 17 pro cisplatinu a dramaticky klesá k 1,3 pro ruthplatinu 2. Významně navýšená cytotoxicita a snížená hodnota RF ruthplatin je pozorována také v A549 a A549cisR buňkách. Ruthplatin jsou celkem aktivní proti růstu lidských nádorových buněk prsu (MCF-7, MDA-MB-231) a leukémii (HL-60) (Tab. 2). Ruthplatin mají mnohem vyšší rozpustnost ve vodě a rychlejší režim účinku (Tab. 3). Dále byly sloučeniny ruthplatin testovány na buněčných liniích HeLa (nádorové buňky děložního hrdla) a Hs27 (nádorové buňky kožních fibroblastů).

Cell line	Type	cDDP	Ruthplatin 1 (FI <sup>a</sup> )	Ruthplatin 2 (FI)	Ruthplatin 3 (FI)	Ruthplatin 4 (FI)
A2780	Ovarian carcinoma	0.92 ± 0.30	0.12 ± 0.02 (7.7)	0.12 ± 0.03 (7.7)	0.12 ± 0.02 (7.7)	0.09 ± 0.03 (10)
A2780cisR	Ovarian carcinoma	16 ± 5	0.43 ± 0.01 (37)	0.15 ± 0.09 (107)	0.32 ± 0.06 (50)	0.19 ± 0.03 (84)
RF <sup>b</sup>		17	3.6	1.3	2.7	2.1
A549	Lung carcinoma	4.3 ± 0.5	1.0 ± 0.2 (4.2)	1.3 ± 0.1 (3.3)	1.5 ± 0.1 (2.9)	0.60 ± 0.09 (7.2)
A549R	Lung carcinoma	24 ± 3	1.4 ± 0.1 (17)	1.6 ± 0.5 (15)	2.9 ± 0.6 (8.2)	1.0 ± 0.3 (24)
RF		5.6	1.4	1.2	2.0	1.7
MDA-MB-231	Breast adenocarcinoma	9.2 ± 2.4	0.55 ± 0.2 (17)	ND <sup>c</sup>	ND	ND
MCF-7	Breast adenocarcinoma	9.6 ± 0.8	0.41 ± 0.04 (23)	ND	ND	ND
HL-60	Promyelocytic leukemia	4.1 ± 1	0.17 ± 0.03 (24)	0.14 ± 0.01 (30)	0.16 ± 0.03 (26)	0.13 ± 0.02 (32)
MRC-5	Lung fibroblast	1.0 ± 0.3	1.7 ± 0.7 (0.6)	4.2 ± 1.1 (0.2)	1.5 ± 0.7 (0.7)	3.1 ± 2 (0.3)

<sup>a</sup> FI (fold increase) is defined as IC<sub>50</sub>(cDDP)/IC<sub>50</sub>(ruthplatin). <sup>b</sup> RF (resistant factor) is defined as IC<sub>50</sub> in A2780cisR/IC<sub>50</sub> in A2780 or IC<sub>50</sub> in A549cisR/IC<sub>50</sub> in A549. <sup>c</sup> ND, not determined.

**Tab. 2:** Hodnoty IC<sub>50</sub> (μM) a rezistenčních faktorů cisplatiny a ruthplatin 1 – 4 u vybraných buněčných linií (převzato z [4] a upraveno)

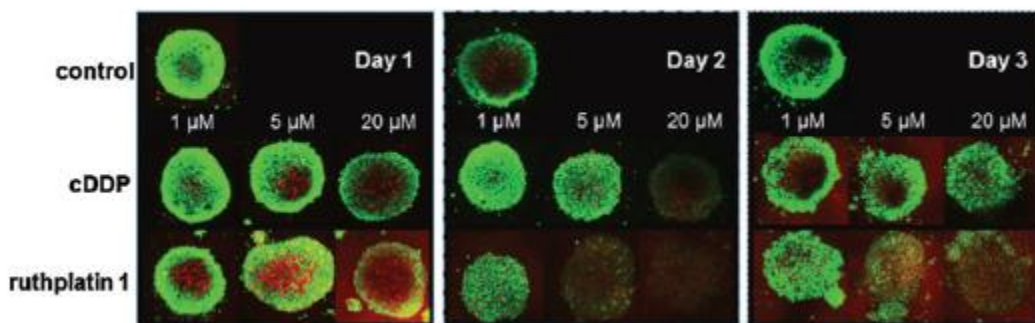


**Tab. 3:** Závislost času na cytotoxicitě cisplatiny (cDDP) a ruthplatin 1 – 3 u buněčných linií A2780 a A2780cisR (převzato z [4])



Jako modelový systém pro výzkum a léčbu rakoviny byly použity 3D mnohobuněčné sféroidy. Jedná se o shluky buněk, díky kterým se lépe simulují okolní podmínky živé buňky v porovnání s 2D buněčným modelem. Buňky ve sféroidech disponují vhodnějším tvarem, proto tato metoda se často uplatňuje při *in vitro* studiu protinádorových látek. Výhodami použití tohoto modelu jsou efektivita studie účinnosti a bezpečnosti léčiva nebo lepší predikce rezistence vůči léčivu [28-30].

Při studiu ruthplatin bylo použito buněčných linií MCF-7, které dokážou velmi jednoduše tvořit sféroidy. MCF-7 sféroidy byly ošetřeny ruthplatinou 1 a směsí cisplatin s PPA-Ru<sup>II</sup> (jednojaderná Ru část ruthplatin s 3-pyridinpropanovou kyselinou-PPA) a následně obarveny kalceinem (bis[N,N'-bis(karboxymethyl)aminomethyl]fluorescein nebo také fluorexon) – živé buňky a PI (propidium jodidem) – mrtvé buňky k vizualizaci účinnosti ruthplatin 1 (Obr. 9).



**Obr. 9:** Sféroidy buněčné linie MCF-7 – kontrolní vzorek, vzorek s cisplatinou a ruthplatinou 1; všechny barveny kalceinem AM a PI (převzato z [4])

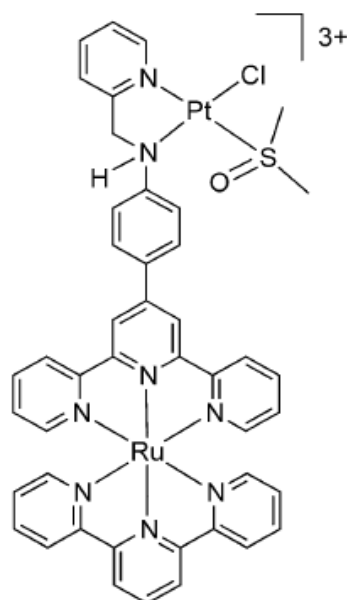
V prvním dni sféroidy ošetřeny ruthplatinou 1 vykazovaly vyšší zlomky mrtvých buněk než cisplatin, a to již při 1  $\mu\text{M}$ . Morfologie sféroidů ošetřených jak cisplatinou, tak především ruthplatinou 1 během druhého a třetího dne začíná být nepravidelná z důvodu zborcení sféroidů. Je zřejmé, že léčba ruthplatinou 1 má za následek větší počet mrtvých buněk (také v porovnání s léčbou kontrolorem PPA-Pt<sup>IV</sup> – jednojaderná Pt část ruthplatin s 3-pyridinpropanovou kyselinou-PPA), což vede k faktu, že ruthplatin mají vysoký potenciál v zabíjení nádorových buněk.

Nakonec byly testovány antimetastatické vlastnosti ruthplatin 1 pomocí testu hojení ran využitím MDA-MB-231 (metastatická linie nádorových buněk prsu). Poranění byla ošetřována po dobu 24 hodin ruthplatinou 1 (5  $\mu\text{M}$ ) a také různými typy kontrol zahrnující PPA-

Ru<sup>II</sup>, směs cisplatinu a PPA-Ru<sup>II</sup> a sunitinib (klinicky využívané antimetastatické léčivo). Poranění buněk MDA-MB-231 vykazuje bez léčby 43% (12 hod) a 100% (24 hod) uzavření. PPA-Ru<sup>II</sup> disponuje velmi slabými antimetastatickými vlastnostmi – 39% (12 hod) a 91% (24 hod), obdobné účinky se jeví i u směsi cisplatinu a PPA-Ru<sup>II</sup>. U buněk léčených ruthplatinou 1 byla zjištěna poměrně značná inhibice procesu migrace – 23% (12 hod) a 46% (24 hod). Sunitinib byl v testu použit jako pozitivní kontrola a vykazoval významný inhibiční účinek na migraci buněk. Antimetastatické vlastnosti ruthplatinu byly sledovány i v A546 buňkách [31, 32].

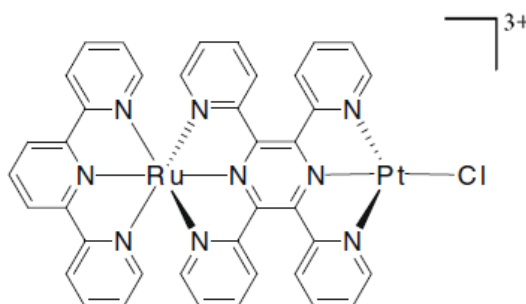
Do skupiny Pt-Ru komplexů (platina zde vystupuje v oxidačním stavu + IV) můžeme zahrnout i sloučeninu, jejíž vzorec je [Ru(tpy)(tpypma)Pt(Cl)(DMSO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (Obr. 10), označovanou jako VR 54, (tpypma = 4-([2,2':6',2''-terpyridin]-4'-yl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)anilin). Oktaedrická Ru<sup>II</sup> část s terpyridinem navazuje část s Pt centrálním atomem pomocí ligandu tpypma, čímž se opět navyšuje aktivita zmíněného komplexu (sledováno na buněčných liniích A2780 a A2780CIS, IC<sub>50</sub> = 29, resp. 38 μM) v porovnání s jeho jednojadernými Pt (114, resp. >200 μM) a Ru (obojí >200 μM) fragmenty.

Opětovným podáváním léčiv dochází k jejich značné akumulaci v buňkách a tyto buňky postupně získávají rezistenci vůči léčivu. Je tedy nutné podávat tato léčiva ve stále vyšších dávkách, což se stává velmi nešetrným řešením pro organismus. Proto bylo důležité zaměřit se na vývoj terapeutik, která by byla schopna zabránit proliferaci buněk jiným způsobem, a právě u sloučeniny VR 54 byl sledován odlišný mechanismus účinku. Toto terapeutikum dokáže zabránit přechodu z G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu. Vstup do S fáze podporuje cyklin D s navázanou cyklin-dependentní kinázou. Pokud se ovšem na uvedenou kinázu naváže vhodný inhibitor, přechod do S fáze nenastane a tím se zastaví buněčný cyklus dané buňky. Takovým inhibitorem může být inhibitor cyklin-dependentní kinázy p27<sup>KIP1</sup>, jehož je komplex VR 54 schopný up-regulovat (zvýšení buněčné odezvy na molekulární stimul způsobené zvýšením počtu receptorů na buněčném povrchu). Tato up-regulace s výsledným zastavením buněčného cyklu byla testována na cisplatině rezistentních buňkách A2780CIS, potvrdila se výrazná aktivita VR 54 (podáván o koncentraci 100 μM), a to 4× vyšší než u jednojaderných Pt a Ru fragmentů [33, 34].



**Obr. 10:** Strukturní vzorec  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{tppzma})\text{Pt}(\text{Cl})(\text{DMSO})]^{3+}$  (VR 54) (převzato z [33])

Jiným studovaným komplexem této skupiny  $\text{Ru}^{\text{II}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  komplexů je sloučenina se vzorcem  $[(\text{tpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{PtCl}](\text{PF}_6)_3$ , (Obr. 11), tpy = 2,2':6',2''-terpyridin; tppz = 2,3,5,6-tetrakis(2-pyridyl)pyrazin. V této sloučenině můstkový ligand tppz spojuje polyazinovou Ru část komplexu, což je část absorbující světlo (má tvar deformovaného oktaedru) s bioaktivní Pt jednotkou ( $[(\text{tpy})\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}]$  mající tvar deformovaného čtverce). Ru polyazinová část vykazuje značnou fotoreaktivitu způsobenou MLCT přechodem  $\text{Ru}(\text{d}\pi) \rightarrow \text{tppz}(\pi^*)$ . Použití tppz ligandu při tvorbě dvoujaderného komplexu vede k stereochemicky definovaným systémům.



**Obr. 11:** Strukturní vzorec kationtové části komplexu  $[(\text{tpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{PtCl}](\text{PF}_6)_3$  (převzato z [35] a upraveno)

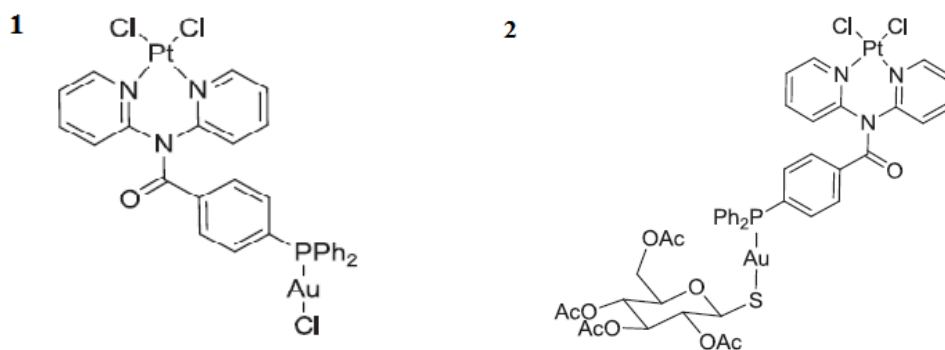
Na centrálním atomu  $\text{Pt}^{\text{II}}$  je navázán labilní chloridový anion (podobně jako u cisplatin), po jehož odštěpení dochází k navázání na dusíkaté báze DNA. U komplexu byla sledována jeho schopnost vazby na DNA pomocí gelové elektroforézy, což bylo pozorováno jako funkce poměru BP:MC (BP = páry bází DNA; MC = kovový komplex). Komplex se inkuboval s kruhovou plazmidovou DNA pUC18 v různých poměrech BP:MC při pokojové teplotě. Výsledky prokázaly lepší vaznost na DNA než u cisplatin, což by mohlo být vysvětleno vyšším nábojem komplexního kationtu a jeho molekulovou hmotností nebo také přítomností jediného labilního chloridového aniontu na atomu platiny. Experiment nepoukazoval na druh vytvořeného aduktu, pouze potvrdil kovalentní vazbu na DNA, což vede k závěru, že tento typ komplexu může fungovat jako protinádorové činidlo a jeho biologickým cílem je DNA [35, 36].

## **2. 3 Heterodvoujaderné komplexy 5d-5d kovů**

### **2. 3. 1 Komplexy platiny a zlata**

Jak komplexy platiny, tak komplexy zlata mohou být značně cytotoxické, avšak typ jejich biologického účinku se liší. Zatímco komplexy platiny se navazují na nukleové kyseliny, sloučeniny zlata se zaměřují při léčbě rakoviny na proteiny, jak bylo již popsáno výše (viz 2. 1. 2).

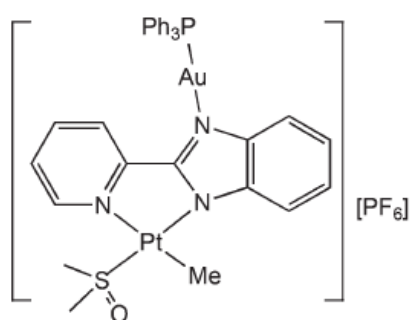
Byly připraveny dva typy dvoujaderných  $\text{Au}^{\text{I}}\text{-Pt}^{\text{II}}$  sloučenin (Obr. 12). Z dřívějších studií se již prokázala zvýšená cytotoxická aktivita užitím 1-thio- $\beta$ -D-glukosa tetraacetátu jako ligandu, který se koordinuje na  $\text{Au}^{\text{I}}$  atom (obdobně jako u auranofinu) [37]. Příprava tohoto komplexu byla vyzkoušena z komplexu uvedeného na obrázku 12 (vlevo) odštěpením chloridového aniontu a následným navázáním 1-thio- $\beta$ -D-glukosa tetraacetátu. Produkt sice získán byl, ovšem nepodařilo se jej pročistit, proto se syntéza provedla z odpovídajícího jednojaderného  $\text{Au}^{\text{I}}$  komplexu.



**Obr. 12:** Strukturní vzorce dvoujaderných Au<sup>I</sup>-Pt<sup>II</sup> komplexů (převzato z [5])

Tyto dvoujaderné sloučeniny byly testovány pro jejich antiproliferační aktivitu *in vitro* v lidských nádorových buněčných liniích (A2780, A2780cisR, A549) a v buňkách bez tumoru (HEK-293T). Na základě studií bylo prokázáno, že sloučeniny jevíly antiproliferační účinky. Komplex na obrázku 12 vlevo vykazoval vyšší aktivitu než odpovídající jednojaderný Au komplex, a to u všech typů buněčných linií, především A549 a HEK-293T (cca 2× vyšší). Na druhou stranu komplex na obrázku 12 vpravo je méně aktivní než odpovídající jednojaderný Au<sup>I</sup> komplex, u buněčné linie A2780 nabývají hodnoty IC<sub>50</sub> 2,3 μM resp. 0,7 μM. Oba komplexy jsou aktivnější u A2780 a A2780cisR nádorových buněk vaječníků, zatímco u A549 (nádorové buňky plic) se jejich aktivita až 5× snížila [5].

Další zkoumanou sloučeninou byla [(PPh<sub>3</sub>)Au(μ-pbi)Pt-(Me)(DMSO)][PF<sub>6</sub>] (Obr. 13) a byla testována vůči nádorovým buněčným liniím A2780/S a A2780/R, přičemž IC<sub>50</sub> = 0,19 μM resp. 0,37 μM. Hodnoty se srovnávaly s odpovídajícím jednojaderným Au<sup>I</sup> komplexem (IC<sub>50</sub> = 1,5 μM resp. 2 μM), heterodvoujaderný komplex má tedy silnější antiproliferační účinky [38, 39].



**Obr. 13:** Strukturální vzorec  $[(\text{PPh}_3)\text{Au}(\mu\text{-pbi})\text{Pt}(\text{Me})(\text{DMSO})][\text{PF}_6]$  (převzato z [38])

### 2. 3. 2 Komplexy platiny a rhenia

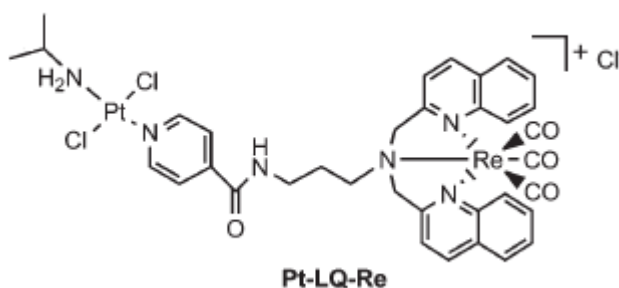
Použití jediné terapeutické metody k léčbě nádorových onemocnění často nevede k uspokojivému výsledku, proto se kromě aplikace selektivnějších léků vůči nádorovým buňkám používají i kombinace různých terapeutických metod jako je chemoterapie a fotodynamická terapie (PDT). PDT zahrnuje léčbu vyvolanou světlem a daným léčivem. Lék (fotosenzibilizátor) se zanedbatelnou tmavou toxicitou (tzn. fotosenzibilizátor nezpůsobí poškození tkání, pokud není vystaven světlu o vlnové délce požadované pro léčbu) se zavádí do těla a akumuluje se přednostně v rychle se dělících buňkách. Jakmile lék dosáhne vhodného poměru akumulace v nemocných versus zdravých buňkách, jsou nemocné buňky vystaveny světlu. Světlo aktivuje lék a ten vyvolává toxické působení (tvorbou singletové formy kyslíku) v těchto buňkách. V porovnání s jinými běžnými protinádorovými metodami má PDT mnoho výhod – prostorovou a časovou kontrolu a možnost opakovaných dávek [40, 41].

Vhodným fotosenzibilizátorem se jeví organokovové sloučeniny rhenia ( $\text{Re}^{\text{I}}$ ), jejichž účinky byly již sledovány [42]. Začleněním těchto typu sloučenin s komplexy platiny vykazujících značné protinádorové vlastnosti do jediné molekuly vznikají multifunkční metaloterapeutika, tzv. teranostika (složenina slov terapie a diagnostika).

Byla připravena heterodvoujaderná sloučenina (Pt-LQ-Re, obr. 14) složená z fragmentu *trans*- $\text{Pt}^{\text{II}}$  (terapeutická část) a  $\text{Re}^{\text{I}}$  trikarbonylového jádra (diagnostická část), které je navázáno na ligand  $\text{N,N}'\text{-bis}[(\text{chinolin-2-yl})\text{methyl}]\text{amin}$  a na něj je připojeno propylaminové rameno (LQ) [6]. Ligandem u *trans*- $\text{Pt}^{\text{II}}$  části byl vybrán isopropylamin a pyridin-4-karboxylová kyselina z důvodu jejich potenciální aktivity vůči buňkám rezistentním

na cisplatinu [43], avšak teprve oxidací na *trans*-Pt<sup>IV</sup> komplex s tímto typem ligandu vykazuje cytotoxické vlastnosti [44].

Fototoxicita a toxicita bez ozáření (tmavá toxicita) komplexu se sledovala u několika lidských buněčných liniích – buňkách rakoviny vaječníků (A2780, citlivé na cisplatinu i A2780R na cisplatinu rezistentní), rakoviny děložního hrdla (HeLa) a také buňkách bez nádoru (MRC-5). Na základě výsledků testování se zjistilo, že komplex Pt-LQ-Re je mírně cytotoxický (přesto však je cisplatinu u A2780R, HeLa a MRC-5 buněk dvakrát a u A2780 až 15× aktivnější), ale ozářením se jeho aktivita zvyšuje, což je vyjádřeno foto-indexem (PI; poměr IC<sub>50</sub> hodnot komplexu bez ozáření a po ozáření). Hodnoty PI pro Pt-LQ-Re komplex jsou 6,7 (A2780), 4,1 (A2780R) a 5,7 (HeLa), z čehož plyne, že u nádorových buněk vaječníků (A2780) aktivita komplexu po ozáření narostla nejvíce. Nicméně nejcytotoxičtější účinky komplex vykazoval u buněk rakoviny děložního hrdla (HeLa), hodnota IC<sub>50</sub> se přibližně rovnala 16,5 μM [6].

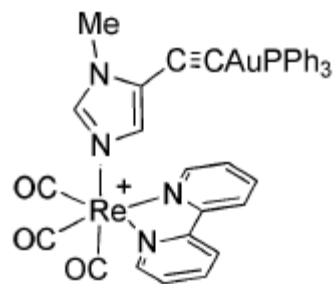


**Obr. 14:** Strukturální vzorec komplexu Pt-LQ-Re (převzato z [6])

### 2. 3. 3 Komplexy rhenia a zlata

Byly připraveny a testovány heterodvoujaderné sloučeniny s centrálními atomy Re<sup>I</sup> a Au<sup>I</sup> s obecným vzorcem *fac*-[Re(bipy)(CO)<sub>3</sub>(L-AuPPh<sub>3</sub>)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), kde L = imidazol, alkynyl-imidazol, alkynyl-pyridin nebo jejich deriváty. Tyto komplexy zařazujeme mezi teranostika (obdobně jako Pt<sup>II</sup>-Re<sup>I</sup>, viz 2. 3. 2). Působí analogickým mechanismem účinku a byly testovány na buněčné linii A549 (adenokarcinomické lidské alveolární bazální epiteliální buňky), ovšem nebyla sledována tmavá toxicita (jako tomu bylo v případě Pt-LQ-Re, obr. 14). Nejcytotoxičtějším derivátem (obr. 15) byla sloučenina s alkynyl-imidazolovým můstkovým ligandem (IC<sub>50</sub> = 4,4 μM), zatímco jednojaderný fragment s centrálním atomem rhenia

nevykazoval téměř žádnou cytotoxicitu. Tento rozdíl může být spojován se začleněním Au-fosfinové části do struktury, než se synergickým účinkem Au-fosfinové části s obecně  $[\text{Re}(\text{bipy})(\text{CO})_3\text{L}]$  fragmentem [7, 13].



**Obr. 15:** Strukturní vzorec komplexu  $\text{Re}^{\text{I}}\text{-Au}^{\text{I}}$  s alkynyl-imidazolovým můstkovým ligandem (převzato z [7] a upraveno)



## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

Použité chemikálie k jednotlivým syntézám pyridin-4-karbaldehyd (97 %), pyridin-3-karbaldehyd (98 %), 4-formylbenzoová kyselina (97 %), benzen-1,4-dikarbaldehyd (99 %), monohydrát fenanthrolinu (p. a.), 2-amino-4-methylfenol (97 %), 4-isopropylamilín (> 98 %), acetylaceton (p. a.), piperidin (99 %), monohydrát *p*-toluensulfonové kyseliny ( $\geq 99$  %), ethan-1,2-diol (p. a.), octan amonný (p. a.), bromid draselný ( $\geq 99,9$  %), hydroxid draselný (p. a.), hydroxid sodný (p. a.), uhličitan draselný (p. a.), kyselina sírová (96 %), kyselina dusičná (65 %), kyselina chlorovodíková (35 %), kyselina octová ( $\geq 99,7$  %), amoniak (25-27 %), silikagel 60 (0,015 – 0,040 mm) a dále rozpouštědla methanol, ethanol, diethylether, aceton, chloroform, dichlormethan, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, *n*-hexan, toluen byly zakoupeny z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, Lach-Ner, Penta, Acros Organics, Merck KGaA). Sloučeniny nebyly dále jakkoliv pro syntézu upraveny.

Elementární analýza je založena na mineralizaci, což je převedení organické látky na látku anorganickou oxidačním nebo redukčním rozkladem. Provádí se spalováním vzorku v atmosféře kyslíku, vznikají plynné produkty dále nesené do trubice skládající se z oxidační a redukční části. Vznikají CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>, které jsou dále odděleny a analyzovány a výsledkem je procentové zastoupení prvků ve vzorku. Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Flash 2000 (Thermo Finnigan) [45].

NMR spektroskopie je založena na absorpci elektromagnetického záření jádry některých atomů umístěných v magnetickém poli. Podmínkou je, aby jádra měly nenulový magnetický moment  $\mu$ , což je splněno u jader s celkovým nenulovým jaderným spinem  $I$  a to souvisí s počtem protonů a neutronů v jádře. Magnetické pole vyvolává rozštěpení základního energetického stavu jádra na energetické hladiny a pro <sup>1</sup>H ( $I = \frac{1}{2}$ ; počet hladin =  $2I + 1$ ) jsou to hladiny dvě. Absorpci fotonu elektromagnetického záření lze vyvolat přechod mezi hladinami. Při měření se mění frekvence radiofrekvenčního pole nebo intenzita magnetického pole. V <sup>1</sup>H NMR spektru sledujeme počet signálů, chemické posuny signálů, multiplicitu signálů, velikost signálů (plocha pod křivkou) a interakční konstantu. <sup>1</sup>H NMR spektroskopie byla provedena na přístroji 400 MHz NMR spektrometru pro měření spekter vysokého rozlišení vzorků v roztoku od firmy Varian při 400,00 MHz; (gs = gradient selected, HMQC = heteronuclear multiple

quantum coherence). Vzorky na NMR experimenty byly rozpuštěny v  $\text{CDCl}_3$  nebo  $\text{DMSO-}d_6$  a analyzované při teplotě 300 K. Štěpení signálu v  $^1\text{H}$  NMR spektrech je definované jako s = singlet, d = dublet, t = triplet, br = široký signál (br. s. = široký singlet), m = multiplet, dd = dublet dubletů.

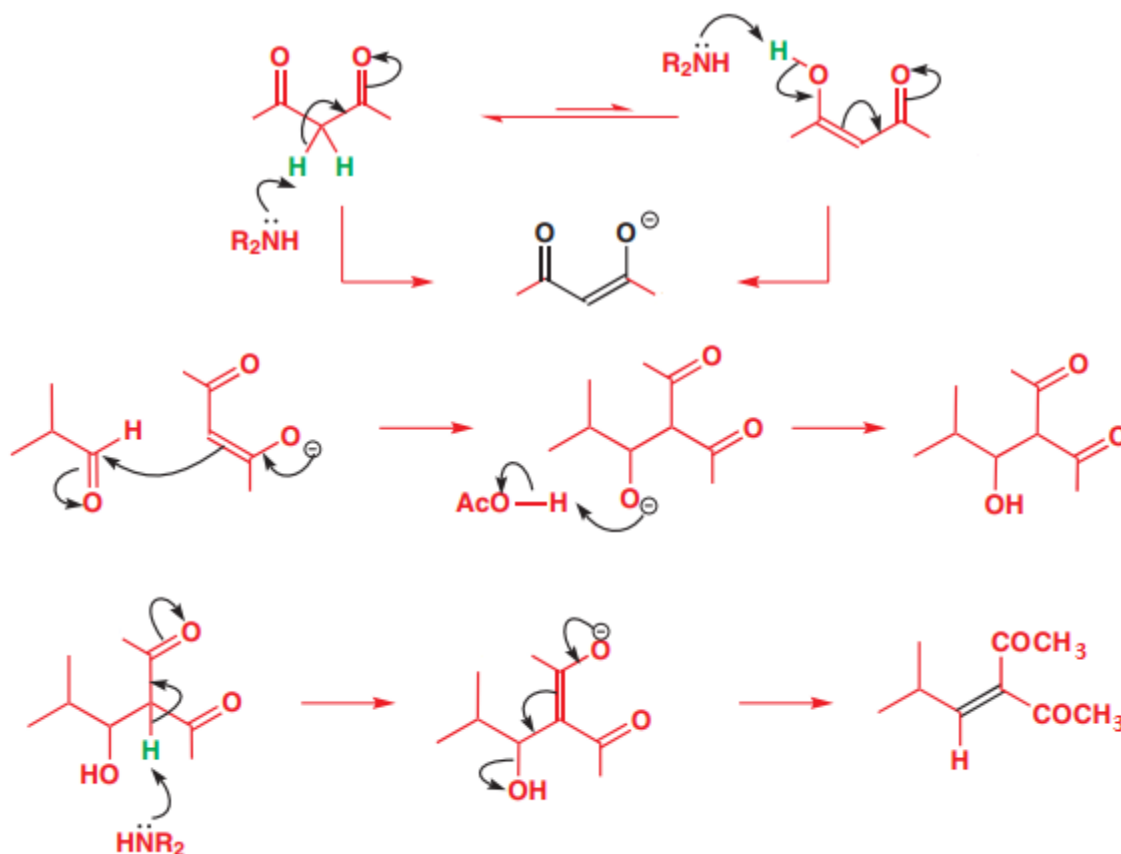
Infračervená spektroskopie je založena na absorpci infračerveného záření molekulami, energie tohoto záření způsobuje změny vibračních a rotačních stavů molekul. Infračervené červené spektrum je dáno závislostí vlnočtu na transmitanci (popř. absorbanci). Nejčastěji se sledují valenční vibrace ( $\nu$ ), při kterých se mění vazebná délka mezi atomy, dále se sleduje deformační vibrace (změna vazebného úhlu). Infračervená spektra byla změřena na přístroji Nexus 670 FT-IR (Thermo Nicolet) v rozsahu vlnočtů  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  za použití techniky ART [46].

Rentgenová strukturní analýza je založena na dopadu monochromatického rentgenového paprsku na monokrystal zkoumané látky. Po tomto dopadu dojde k difrakci paprsku, ze kterého se získá difrakční diagram změřením intenzity a úhlů paprsků. Z diagramu lze zjistit schéma elektronové hustoty a z ní pak predikovat polohy atomů, úhly, které svírají i vazby mezi nimi. Krystalové struktury byly určeny na monokrystalovém difraktometru D8 QUEST (Bruker) vybaveném PHOTON 100 CMOS detektorem při teplotě 395 K [47].

### **3.2 Příprava sloučenin**

Na přípravu prezentovaných sloučenin v této práci byla primárně použita Knoevenagelova kondenzace. [48]. Tato organická syntéza byla poprvé popsána a pojmenována po německém chemikovi Emilu Knoevenagelovi. Syntéza probíhá v bazickém prostředí za vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasycené sloučeniny a je známa v mnoha modifikacích [49], obecně se jedná o reakci aldehydu s další reakční komponentou, kterou může být nitro sloučenina, kyselina malonová nebo její derivát či keton.

V prvním kroku reakce se tvoří enolátový ion z acetylacetonu díky přítomnosti báze, zatímco kyselina funguje jako pufr a předchází tvorbě enolátového iontu z aldehydu. Vytvořený enolát následně atakuje aldehyd za vzniku aldolového meziprojektu a posledním krokem reakce je dehydratace, přičemž vzniká  $\alpha,\beta$ -nenasycená sloučenina (obr. 16) [50].



**Obr. 16:** Mechanismus Knoevenagelovy kondenzace (převzato z [50] a upraveno)

Vybrané prekurzory byly připraveny upraveným analogickým postupem, a to reakcí aromatických aldehydů s acetylacetonem v přítomnosti piperidinu nebo piperidinu a kyseliny octové (99%). Syntéza byla prováděna s rozpouštědlem nebo bez rozpouštědla, pouze v acetylacetonu.

### 3. 2. 1 Příprava symetrických prekurzorů

#### 3. 2. 1. 1 Příprava 3,3'-(benzen-1,4-diyldimethyliden)dipenta-2,4-dionu (**1**)

Sloučenina byla připravena dle publikovaného postupu [51], avšak reakční podmínky byly částečně upraveny. Reakční čas byl výrazně prodloužen (z původních 7 minut na 90 minut), jako katalyzátor nebyl použit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -modifikovaný polyethylenglykol-6000 (pouze piperidin). Roztok benzen-1,4-dikarbaldehydu (100 mmol; 13,4 g) v acetylacetonu (200 mmol; 20 g) a s dvěma kapkami piperidinu byl zahříván pod zpětným chladičem po dobu 90 minut. Na začátku reakce měl roztok červenou barvu, po proběhnutí reakce a ochlazení roztoku na

laboratorní teplotu byla pozorována oranžová sraženina, která byla odsána, promyta methanolem a následně i hexanem (k vymytí nezreagovaných reaktantů). Vzniklá sloučenina (obr. 17 a) byla rekrystalizována z chloroformu, promyta methanolem a etherem. Výtěžnost reakce byla 54 %.  $M_r = 298,33$

EA: Teoretické hodnoty pro  $C_{18}H_{18}O_4$  ( $M_r = 298,33$ ): C (72,47 %), H (6,08 %); naměřené hodnoty: C (72,16 %), H (6,13 %)

NMR:  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ , 300 K):  $\delta$  2,28 (s, 6H), 2,45 (s, 6H), 7,51 (s, 4H), 7,69 (s, 2H), 8,12 (s, 1H), 10,14 (s, 1H) ppm

IČ (mid, ATR): 3052, 3032 a 3006  $cm^{-1}$   $\nu(C-H_{arom})$ ; 2907 a 2949  $cm^{-1}$   $\nu(C-H_{alif})$ ; 1705  $cm^{-1}$   $\nu(C=O)$ ; 1653  $cm^{-1}$   $\nu(C=C)_{alken}$ ; 1615  $cm^{-1}$ , 1568  $cm^{-1}$ , 1509  $cm^{-1}$   $\nu(C=C)_{arom}$ .

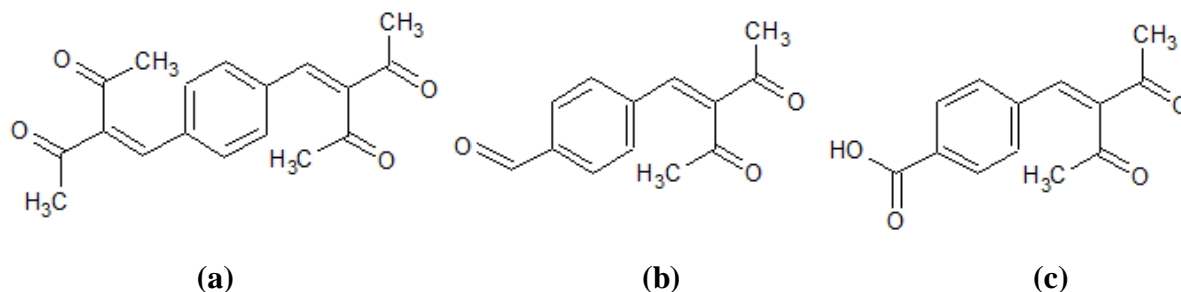
### 3. 2. 2 Příprava nesymetrických prekurzorů

#### 3. 2. 2. 1 Příprava 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzaldehydu (2)

Sloučenina byla připravována dle publikovaného postupu [52]. Benzen-1,4-dikarbaldehyd (50 mmol; 6,7 g) a acetylaceton (50 mmol; 5 g) byly rozpuštěny v 25 ml methanolu, poté byla přidána kapka piperidinu. Roztok se 5 hodin míchal a zároveň ochlazoval v ledu, aby teplota reakční směsi nepřesáhla 5 °C. Žlutá směs během reakce oranžověla, po ukončení reakce byl roztok odpařen na rotační vakuové odparce, vzniklá sloučenina byla třikrát promyta hexanem a odsána, poté rekrystalizována z methanolu. Již po prvním dni volného odpařování roztoku byly pozorovány bílé krystalky, které byly dále charakterizovány. Měření  $^1H$  NMR bylo zjištěno, že obě karbonylové skupiny benzen-1,4-dikarbaldehydu reagovaly s acetylacetonem (viz 3. 2. 1. 1) a nebyl tedy připraven monokondenzovaný prekurzor (obr. 17 b). Je nutno poznamenat, že nebyla potvrzena přítomnost detekovatelného množství sloučeniny 2 pomocí TLC a NMR spektroskopie.

Proto byl vyzkoušen jiný postup, a to chránění jedné z karbonylových skupin ethan-1,2-diolem za vzniku cyklického acetalu (konkrétně 4-(1,3-dioxolan-2-yl)benzaldehyd) [53]. Benzen-1,4-dikarbaldehyd (7,46 mmol; 1 g) a ethan-1,2-diol (8,06 mmol; 0,5 g) byly rozpustěny ve 20 ml toluenu a bylo přidáno katalytické množství kyseliny p-toluensulfonové (TsOH). Směs se zahřívala pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Vznikl bezbarvý roztok, ve kterém se po 24 hodinách volného odpařování toluenu začala vytvářet bílá pevná látka.

NMR spektroskopii se potvrdilo, že vzniklou látkou je směs nezreagovaného benzen-1,4-dikarbaldehydu, benzen-1,4-dikarbaldehyd s monoacetalovou skupinou a benzen-1,4-dikarbaldehyd chráněn diacetalovou skupinou. Podle zmíněného postupu [53] byl produkt následně přečištěn flash chromatografií, což bylo nedostatečné (nedostatečné pročištění bylo zjištěno pomocí tenkovrstvé chromatografie) a vzhledem k nedostatku času nebyla látka dočištěna a v její syntéze se již dále nepokračovalo.



**Obr. 17:** Strukturální vzorce a) 3,3′-(benzen-1,4-diylidimethylidene)dipenta-2,4-dionu (**1**), b) 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzaldehydu (**2**), c) 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzoové kyseliny (**3**)

### 3. 2. 2. 2 Příprava 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzoové kyseliny (**3**)

Roztok 4-formylbenzoové kyseliny (20 mmol; 3 g) a nadbytku acetylacetonu (49 mmol; 4,9 g) byl zahříván 7 hodin pod zpětným chladičem. Roztok tmavnul ze světle žluta do žluté až světle oranžové barvy, vznikla sraženina obdobné barvy, která byla poté 15 minut míchána bez zahřívání s 15 ml hexanu, odsána na fritě a promyta methanolem. Světle žlutá až bílá sraženina byla rekrystalizována z chloroformu za vzniku krystalické látky (obr. 17 c) obdobné barvy. Výtěžnost reakce byla 50,9 %.  $M_r = 232,23$ .

EA: Teoretické hodnoty pro  $C_{13}H_{12}O_4$  ( $M_r = 232,23$ ): C (67,23 %), H (5,21 %); naměřené hodnoty: C (67,13 %), H (4,89 %)

NMR:  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ , 300 K):  $\delta$  2,29 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 7,46 – 7,55 (m, 3H), 8,13 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2 H) ppm

IČ (mid, ATR): 3000 – 2500  $cm^{-1}$   $\nu(O-H)$ ; 1707  $cm^{-1}$   $\nu(C=O)$ ; 1679  $cm^{-1}$   $\nu(C=O)_{COOH}$ , 1658  $\nu(C=C)_{alken}$ ; 1603  $cm^{-1}$ , 1560  $cm^{-1}$ , 1511  $cm^{-1}$   $\nu(C=C)_{arom}$ .

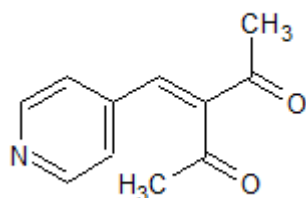
### 3. 2. 2. 3 Příprava 3-(pyridin-4-ylmethyliden)penta-2,4-dionu (4)

Postup A: Dle již publikovaného modifikovaného postupu [54] (za použití jako rozpouštědla toluenu místo benzenu) byl roztok pyridin-4-karbaldehydu (37,3 mmol; 4 g) v nadbytku acetylacetonu (74,7 mmol; 7,48 g) smíchán s kapkou piperidinu a CH<sub>3</sub>COOH (99 %) v 10 ml toluenu a zahříván hodinu pod zpětným chladičem. Byla pozorována změna zbarvení ze světle žluté barvy na oranžovou, roztok byl následně ponechán samovolnému odpařování rozpouštědla. Vznikla hnědočervená sraženina, která byla rekrystalizována z chloroformu a promyta hexanem. Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (na silikagelu 60 Å; 0,015 – 0,040 mm) s chloroformem, získaný eluát měl tmavě oranžovou barvu a byl následně odpařen na rotační vakuové odparce. Získaný produkt (obr. 18) měl oranžovou barvu a byl ještě rekrystalizován z toluenu. Rekrystalizací byla připravena směs oranžové látky a velmi malé množství látky (4) ve formě světle žlutých krystalů. Směs produktu nebyla vzhledem k malému množství připraveného produktu dále pročišťována anebo analyzována.

Postup B: Roztok pyridin-4-karbaldehydu (37,3 mmol; 4 g) v acetylacetonu (37,3 mmol; 3,74 g) byl smíchán s kapkou piperidinu a CH<sub>3</sub>COOH (99 %) a bez rozpouštědla. Roztok byl míchán bez zahřívání a ihned po pár minutách byla pozorována změna zbarvení z oranžovohnědé na žlutou barvu. Zhruba po 45 minutách se roztok zesvětlil a vznikla tvrdá světlé žlutá látka, která byla odsána a promyta hexanem. Látka byla rekrystalizována z methanolu, avšak nepodařilo se izolovat krystalický produkt, vznikla pouze oranžová olejovitá látka. V případě, že byla tato látka rekrystalizována z CHCl<sub>3</sub>, tak vzniklo malé množství krystalické látky, později identifikované jako 3-[hydroxy(pyridin-4-yl)methyl]penta-2,4-dion (4').

NMR: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 300 K): δ 2,05 (s, 1H), 2,06 (s, 1H), 2,08 (s, 3H), 2,22 (s, 3H) 4,11 (d, J = 7,43 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 7,43 Hz, 1H), 5,51 (s, 1H), 5,83 (s, 1H), 7,22 – 7,26 (m, 1H), 7,29 – 7,32 (m, 2H), 7,33 – 7,38 (m, 1H), 7,70 – 7,74 (m, 1H), 8,51 (d, J = 6,26 Hz, 2H), 8,60 – 8,64 (m, 1H), 8,85 – 8,89 (m, 1H), 10,09 (s, 1H) ppm

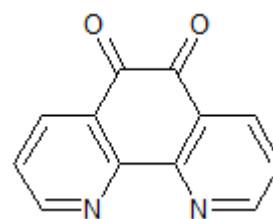
IČ (mid, ATR): 3100 – 3104 cm<sup>-1</sup> ν(O-H); 3061 cm<sup>-1</sup> ν(C-H<sub>arom</sub>); 2938, 2853 cm<sup>-1</sup> ν(C-H<sub>alif</sub>); 1730 – 1697 cm<sup>-1</sup> ν(C=O); 1602, 1558, 1414 cm<sup>-1</sup> ν(C=N), ν(C=C, pyridin)



**Obr. 18:** Strukturální vzorec 3-(pyridin-4-ylmethyliden)penta-2,4-dionu (**4**)

### 3. 2. 2. 4 Příprava 2-(4-formylfenyl)imidazo[4,5-f]-[1,10]fenanthrolinu (fmp) (**5**)

Samotné Knoevenagelově kondenzaci ligandu fmp (obr. 20 a) předcházela příprava jednoho z reaktantů – 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu (obr. 19) [55]. Monohydrát 1,10-fenanthrolinu (22,2 mmol; 4,4 g) a KBr (33,6 mmol; 4 g) byly společně postupně po částech přidávány do chlazené směsi koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (40 ml) a koncentrované  $\text{HNO}_3$  (20 ml). Roztok se zahříval 24 hodin pod zpětným chladičem.



**Obr. 19:** Strukturální vzorec 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu

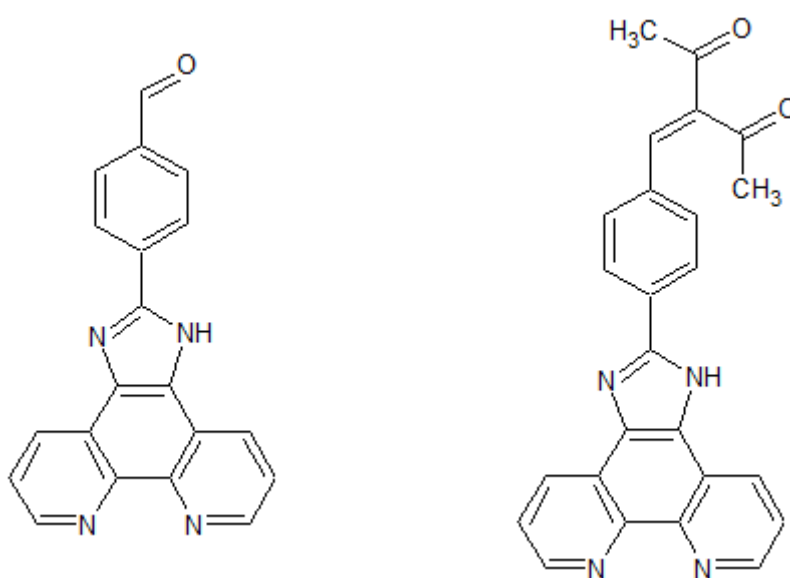
Horký roztok červeného zbarvení se nalil do 600 ml ledové vody, přičemž zežloutl a za stálého míchání byl neutralizován hydroxidem sodným (pH~ 6 – 7). Sloučenina byla extrahována chloroformem a její frakce následně odpařeny na rotační vakuové odparce. Výsledným produktem byla tmavě žlutá látka pevného skupenství a výtěžnost reakce, která byla provedena dvakrát, činila v obou případech 16,5 %.

Takto připravený 1,10-fenanthrolin-5,6-dion byl použit k další reakci vedoucí k již výše zmíněnému ligandu fmp, který se připravoval již dříve publikovaným postupem [56]. Roztok benzen-1,4-dikarbaldehydu (1,5 mmol; 0,201 g), 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu (1,5 mmol; 0,315 g), octanu amonného (30 mmol; 2,31 g) a 99% kyseliny octové (30 ml) byl zahříván 2 hodiny pod zpětným chladičem. Poté byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a doplněna destilovanou vodou (60 ml). K reakční směsi byl po kapkách přidáván koncentrovaný roztok amoniaku, dokud roztok neměl pH~6. Byla získána žlutá sraženina, která byla odsána a promyta destilovanou vodou. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (na silikagelu 60 Å; 0,015 – 0,040 mm) s methanolem, získaný eluát měl žlutou barvu a byl následně odpařen na

rotační vakuové odparce. Výsledným produktem (obr. 20 a) byl žlutý prášek a výtěžnost reakce, která byla několikrát zopakována byla 38,3 %.  $M_r = 324,34$

EA: Teoretické hodnoty pro  $C_{20}H_{12}N_4O$  ( $M_r = 324,34$ ): C (74,06 %), H (3,73 %), N (17,27 %); naměřené hodnoty: C (73,68 %), H (3,50 %), N (16,98 %)

NMR:  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,88 (s, 1H), 7,70 (dd,  $J = 8,02, 4,11$  Hz, 1H), 7,73 – 7,86 (m, 2H), 8,01 (s, 1H), 8,03 – 8,12 (m, 2H), 8,26 – 8,36 (m, 1H), 8,36 – 8,46 (m, 2H), 8,72 (d,  $J = 8,22$  Hz, 1H), 8,83 (dd,  $J = 8,22, 1,57$  Hz, 2H), 8,87 (br. s., 1H), 8,93 (d,  $J = 2,35$  Hz, 1H), 8,98 (dd,  $J = 4,30, 1,57$  Hz, 2H), 10,00 – 10,07 (m, 1H) ppm



**Obr. 20:** Strukturní vzorec a) 2-(4-formylfenyl)imidazo[4,5-*f*]-[1,10]fenanthrolinu (**5**), b) 3-[[4-(1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]fenanthrolin-2-yl)fenyl]metylen]penta-2,4-dionu (**6**)

### 3. 2. 2. 5 Příprava 3-[[4-(1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]fenanthrolin-2-yl)fenyl]metylen]penta-2,4-dionu (**6**)

2-(4-formylfenyl)imidazo[4,5-*f*]-[1,10]fenanthrolin (fmp) (0,31 mmol; 0,1 g), acetylaceton (0,62 mmol; 0,062 g) a kapka piperidinu byly rozpuštěny v 10 ml methanolu a zahřívány pod zpětným chladičem po dobu 5 hodin. Reakcí vznikla oranžová sraženina, která byla odsána a promyta methanolem. Výsledným produktem byla oranžová tuhá látka (obr. 20 b) a výtěžnost reakce byla 67,3 % při předpokládané  $M_r = 406,44$ . Takto připravená látka je částečně rozpustná jen v horkém DMSO, což výrazně limitovalo možnosti jejího pročištění.



Pomocí NMR spektroskopie bylo zjištěno, že takto připravený produkt je znečištěn a obsahuje nejméně dvě další příměsi.

### 3. 2. 3 Příprava Schiffových bází

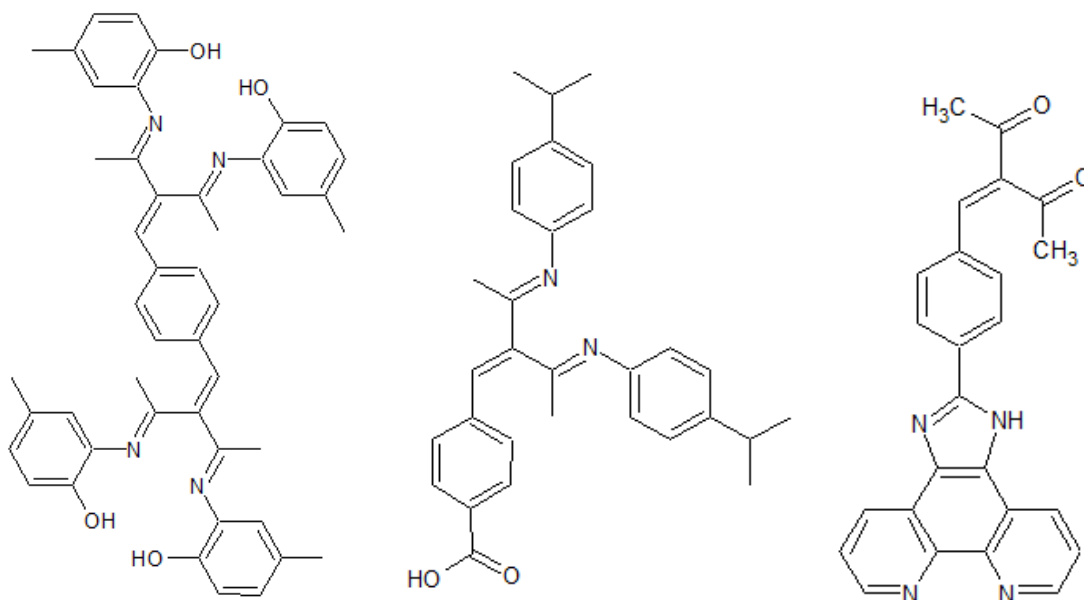
Výše popsané Knoevenagelovy kondenzáty mohou dále reagovat s primárními aminy za vzniku Schiffových bází [47]. Nově vzniklé iminové vazby v těchto sloučeninách vytvářejí vhodné koordinační místo (atom dusíku) pro mnohé přechodné kovy (například  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  nebo  $\text{Ni}^{2+}$ ), mohly by tedy být vhodnými můstkovými ligandy pro přípravu heterodvoujaderných sloučenin.

Schiffovy báze je možné připravovat obvyklým způsobem, a to pouhým smísením reakčních komponent ve vhodném rozpouštědle a zahříváním pod zpětným chladičem. Byly provedeny kondenzace 3,3'-(benzen-1,4-diyl(dimethylilyden)dipenta-2,4-dionu (**1**) nebo 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzoové kyseliny (**3**) s primárními aminy (2-amino-4-methylfenol a 4-isopropylanilín) v přítomnosti methanolu. Tímto způsobem přípravy se sice podařilo u některých reakcí izolovat krystalické produkty, avšak kombinací analytických technik bylo zjištěno, že látky neodpovídají předpokládané struktuře.

Dalším řešením se nabízí reakce Knoevenagelových kondenzátů s příslušným primárním aminem ve vhodném rozpouštědle za přítomnosti  $\text{K}_2\text{CO}_3$  [57]. Do reakcí byly použity výše zmíněné primární aminy. Avšak ani tento způsob přípravy nebyl úspěšný a žádané produkty se nepodařilo izolovat.

## 4 Diskuze

Cílem této práce bylo připravit ligandy, které by obsahovaly dvě (různá) koordinační místa, v případě asymetrických sloučenin (odvozených od **2**, **3**, **4** a **6**) selektivní pro koordinaci různých kovů. Tyto ligandy by pak byly vhodnými můstkovými ligandy pro vznik heterodvoujaderných sloučenin. V první fázi byly provedeny syntézy symetrického a nesymetrických prekurzorů Knoevenagelovou kondenzací [46, 47, 53]. Následně tyto prekurzory reagovaly s primárními aminy za vzniku Schiffových bází (viz kapitola 3. 2) [51].



**Obr. 21:** Strukturální vzorce vybraných produktů, které se nepodařilo připravit: a) produkt reakce **1** s 2-amino-4-methylfenolem, b) produkt reakce **3** s 4-isopropylanilínem, c) 3-[[4-(1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]fenanthrolin-2-yl)fenyl]metylen]penta-2,4-dionu (**6**)

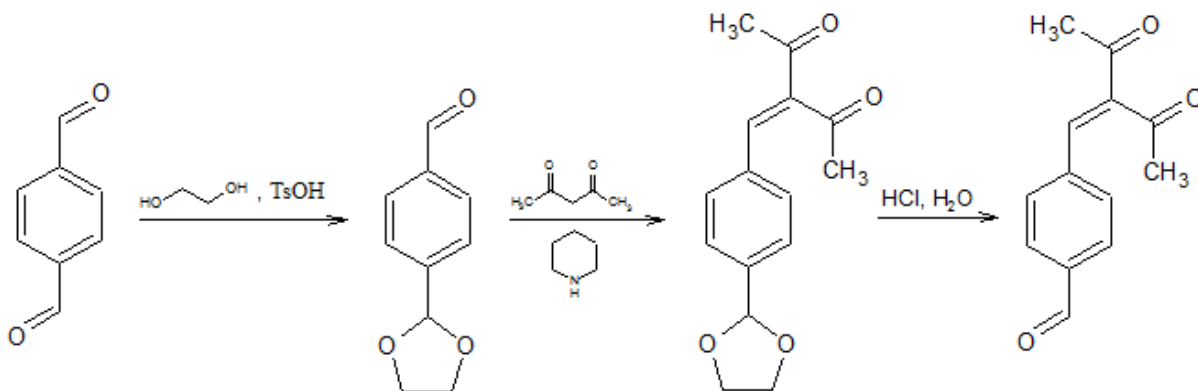
### 4.1 Syntéza

Postupy výše zmíněnými v experimentální části byly připraveny sloučeniny **1** – **6**, konkrétně 3,3'-(benzen-1,4-diyl dimethyliden)dipenta-2,4-dion (**1**), 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzaldehyd (**2**), 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzoová kyselina (**3**), 3-(pyridin-4-ylmethyliden)penta-2,4-dion (**4**), 2-(4-formylfenyl)imidazo[4,5-*f*]-[1,10]fenanthrolin (**5**) a 3-[[4-(1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]fenanthrolin-2-yl)fenyl]metylen]penta-2,4-dion (**6**). Sloučeniny

**1 - 4** byly připraveny z komerčně dostupných látek, přípravě sloučeniny **5** předcházela příprava 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu a sloučenina **6** byla připravena reakcí acetylacetonu s **5**.

Přípravy látek **1** a **3** byly pozměněny oproti již publikovaným postupům, jak je zmíněno u daných reakcí v experimentální části a probíhaly v nadbytku acetylacetonu, bez přítomnosti rozpouštědla a katalytickým množstvím piperidinu (1 – 2 kapky), popř. i kyseliny octové (99 %). U sloučeniny **1** to bylo hlavně z důvodu, že v literatuře popsána příprava používá speciální typ katalyzátoru [51]. Použitý postup přípravy využívající jako rozpouštědlo nadbytek acetylacetonu vyžaduje sice výrazně delší reakční dobu (v literatuře 7 minut, avšak syntéza trvala zhruba 90 minut) a přináší menší reakční výtěžek (v literatuře 96 %, výtěžek syntézy 54 %), ale je synteticky nenáročný a nevyžaduje žádné speciální podmínky nebo pomocné látky. Tyto důvody vedly k použití tohoto postupu i při přípravě sloučeniny **3**, jejíž příprava ještě nebyla v literatuře popsána a tato reakce proběhla obdobně k přípravě látky **1**. Pokusy o monokondenzaci tereftaldehydu acetylacetonem byly neúspěšné navzdory snaze o co nejpřesnější zopakování publikovaného postupu [52]. Opakování reakce zároveň s optimalizací reakčních podmínek (prodlužování chlazení) nevedly k přípravě sloučeniny **2**, jejíž příprava nebyla potvrzena pomocí TLC a NMR.

Jiným způsobem přípravy sloučeniny **2** je ochránění jedné z karbonylových skupin vhodnou chránicí skupinou (obr. 21), což bylo rovněž v experimentální části popsáno. V prvním kroku syntézy byl připraven meziproduct 4-(1,3-dioxolan-2-yl)benzaldehyd, který byl studován <sup>1</sup>H NMR spektroskopii. V souladu s literárními zdroji bylo potvrzeno, že reakcí nevznikl pouze žádaný meziproduct, ale také sloučenina s ochráněnými oběma karbonylovými skupinami (2,2'-benzen-1,4-diylbis(1,3-dioxolan)) a rovněž část benzen-1,4-dikarbaldehydu zůstala nezreagována. Přechistění pomocí flash chromatografie popsané v literatuře bylo nedostačující a z důvodu nedostatku času se nepodařilo dokončit celou syntézu a izolovat tak žádoucí produkt (viz experimentální část).



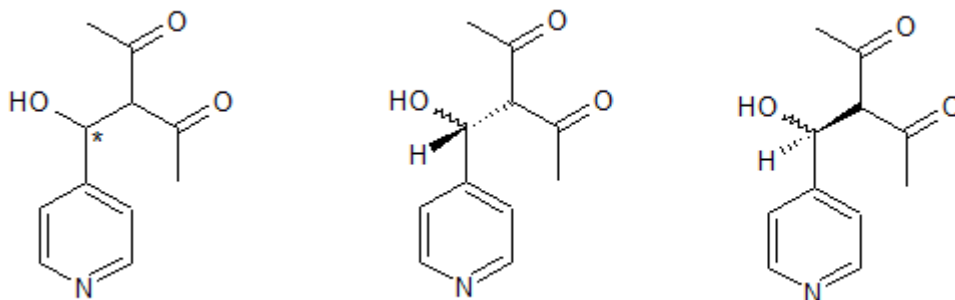
**Obr. 21:** Reakční schéma přípravy 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzaldehydu

U sloučeniny **4** se předpokládalo, že Knoevenagelova kondenzace proběhne obdobně jako tomu bylo u syntézy sloučenin **1** a **3**. Dle literatury [58] reakce dobře probíhá za použití azeotropní destilace, která vede k odstraňování vody z reakční směsi (jako rozpouštědlo byl použit toluen) a posunutí tak rovnováhy reakce ve prospěch produktu, tedy za použití Dean-Starkovy aparatury. Tu jsem však k dispozici neměla, proto bylo navrženo jiné řešení.

Reakce byly vyzkoušeny v různých molárních poměrech pyridin-4-karbaldehydu a acetylacetonu (1:1; 1:1,5; 1:2) v přítomnosti piperidinu, kyseliny octové a bez rozpouštědla. Reakce proběhly poměrně rychle (asi 5 minut) a podařilo se připravit světle žlutou pevnou látku prakticky kvantitativně. Následně, když tato látka byla rekrystalizována z methanolu, tak se znovu nepodařilo izolovat krystalický produkt a vznikla pouze červenooranžová olejovitá látka. Stejně jako při pokusech vysušit tuto látku infračervenou lampou se látka okamžitě roztékala na červenooranžovou olejovitou látku.

Když však tato látka byla promyta cyklohexanem a následně rekrystalizována z chloroformu, tak vzniklo malé množství krystalické látky, která mohla být podrobena NMR spektroskopii a rentgenové strukturní analýze. Bylo zjištěno, že se nejedná o látku **4**, ale že se jedná se o poslední meziproduct (dále označovaná jako **4'**, obr. 22) Knoevenagelovy reakce (mezi pyridin-4-karbaldehydem a acetylacetonem), přičemž poslední krok spočívá v dehydrataci a následnému vzniku  $\alpha,\beta$ -nenasycené sloučeniny. Pravděpodobně tento produkt vznikl na základě nedostatečného odčerpávání vody z reakční směsi, a to je pravděpodobně důvodem, proč se nepodařilo připravit žádoucí produkt (**4**). Prozatím tato sloučenina nebyla v literatuře popsána, pouze byl připraven analogický meziproduct kondenzace benzaldehydu s acetylacetonem [55].

Sloučenina krystalizuje v centrosymetrické grupě (viz kapitola 4. 3), což znamená, že sloučenina vytváří racemát, tedy obsahuje levotočivý (*S*-konfigurace) i pravotočivý (*R*-konfigurace) enantiomer (obr. 22).

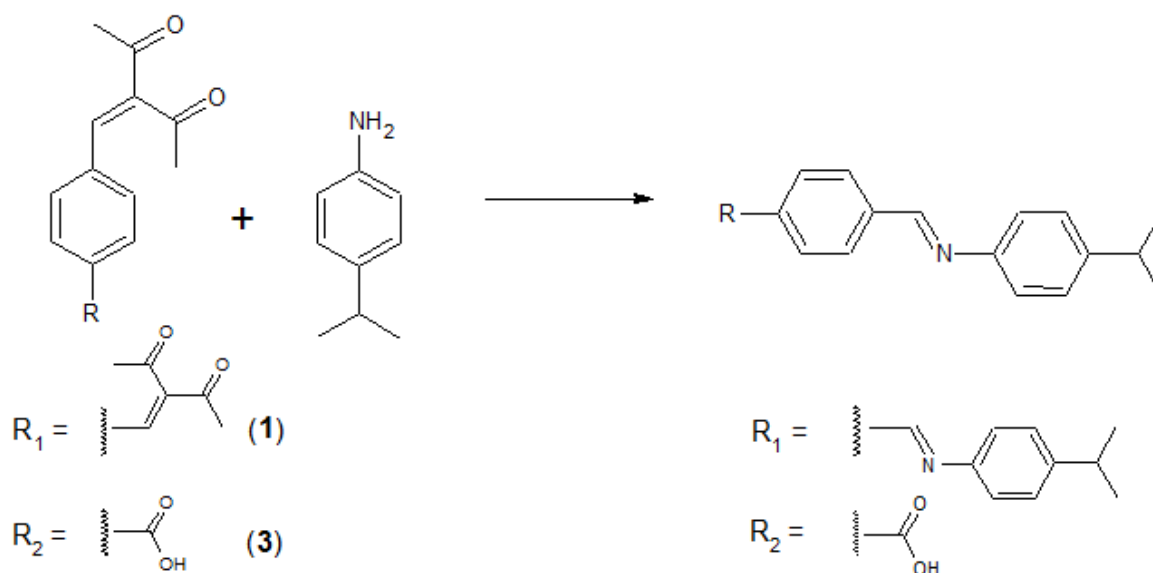


**Obr. 22:** Nově vzniklý produkt 3-[hydroxy(pyridin-4-yl)methyl]penta-2,4-dion (4') s naznačeným chirálním uhlíkem a jeho *S*-konfigurace a *R*-konfigurace

Sloučenina **5** byla připravena dle dříve popsaného postupu (viz experimentální část), reakcí byla získána žlutá sraženina, která byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu. Výsledný žlutý eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce za vzniku žluté látky pevného skupenství. Sloučenina byla charakterizována elementární analýzou a  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii, jimiž byla potvrzena přítomnost sloučeniny **5**.

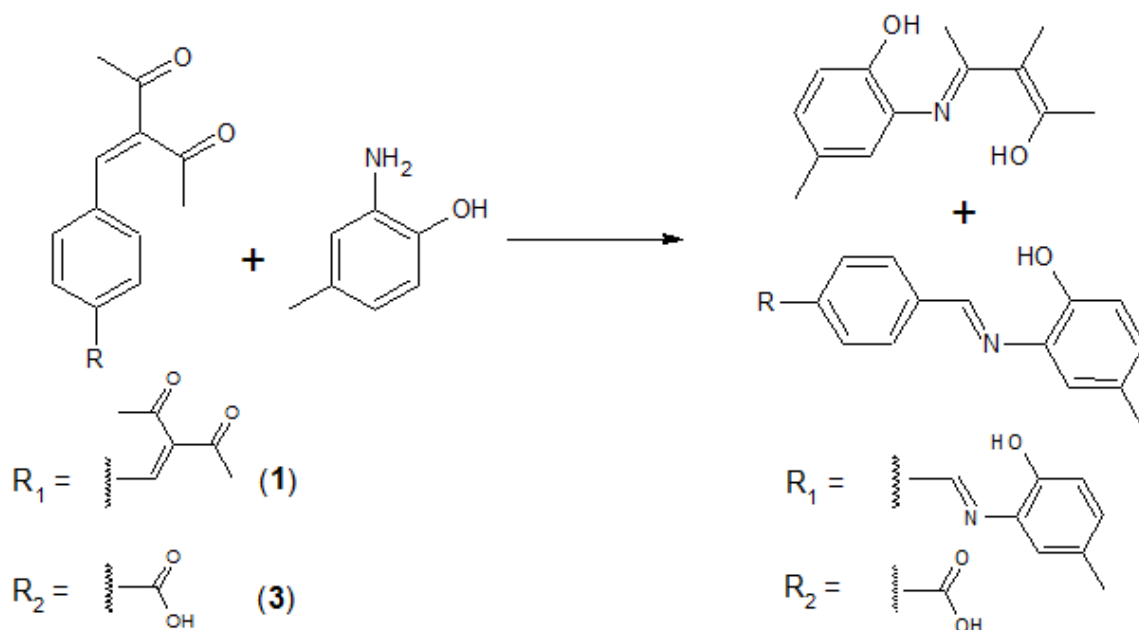
Tato látka sloužila jako prekurzor k přípravě sloučeniny **6** reakcí s nadbytkem acetylacetonu v methanolu. Byla připravena oranžová krystalická látka, a přestože se podařilo sloučeninu izolovat, problém nastal při pokusu o rozpuštění. Produkt se tedy nepodařilo přečistit, z toho důvodu byly pozorovány velké odchylky mezi předpokládaným a skutečným složením při měření elementární analýzy. Pro charakterizaci byla použita i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, avšak ta rovněž poukázala na nízkou čistotu připravené látky. Příprava sloučeniny byla vyzkoušena za stejných podmínek i v mikrovlnném syntetizátoru (reakce probíhala 10 minut při 200 °C), výsledkem však byl černý prášek, který rovněž nebylo možné dále zpracovat. Reakce v mikrovlnném syntetizátoru byla zopakována, avšak při 150 °C po dobu 3 minut, přičemž se podařilo připravit žlutou pevnou látku. Tato látka byla rovněž částečně rozpustná jen v horkém DMSO, čímž se výrazně limitovala možnost jejího pročištění. Analytickými metodami bylo zjištěno, že je složením podobná produktu, který byl připraven bez mikrovlnného syntetizátoru.

Vzhledem k tomu, že výše zmíněné Knoevenagelovy kondenzáty mohou dále reagovat s primárními aminy za vzniku Schiffových bází, které by mohly být použity jako vhodné můstkové ligandy heterodvoujaderných sloučenin, byly vyzkoušeny některé reakce (viz 3. 2. 3). Syntézy byly prováděny v přítomnosti methanolu smísením příslušného Knoevenagelova kondenzátu a primárního aminu (v molárním poměru 1:4 u reakce s **1**, popř. 1:2 u reakce s **3**) a relativně krátkou dobu zahřívány (cca 30 minut). Produkty byly vesměs žluté látky, které byly dále analytickými metodami charakterizovány, přičemž bylo zjištěno, že neodpovídají složením žádaným produktům. Produkty reakcí popisují následující schémata.



**Obr. 23:** Schéma reakce **1** a **3** s 4-isopropylanilínem

Schéma reakce **1** a **3** s 4-isopropylanilínem (obr. 23) poukazuje (v případě sloučeniny **1**) na jeho rozklad zpět na benzen-1,4-dikarbaldehyd a následné navázání 4-isopropylanilínu. V případě reakce sloučeniny **3** se rovněž reaktant rozložil zpět na 4-formylbenzoovou kyselinu a poté reagoval s 4-isopropylanilínem. Schéma reakce **1** a **3** s 2-amino-4-methylfenolem (obr. 24) naznačuje vznik směsi dvou látek (u reakce s **1**). První kondenzát vznikl reakcí enol tautomeru acetylacetonu (což opět naznačuje rozklad sloučeniny **1**) s 2-amino-4-methylfenolem. Druhý kondenzát se vytvořil obdobně jako na obr. 23 u reakce **3** s příslušným aminem.



**Obr. 24:** Schéma reakce **1** a **3** s 2-amino-4-methylfenolem

## 4. 2 Charakterizace (NMR, IČ spektroskopie)

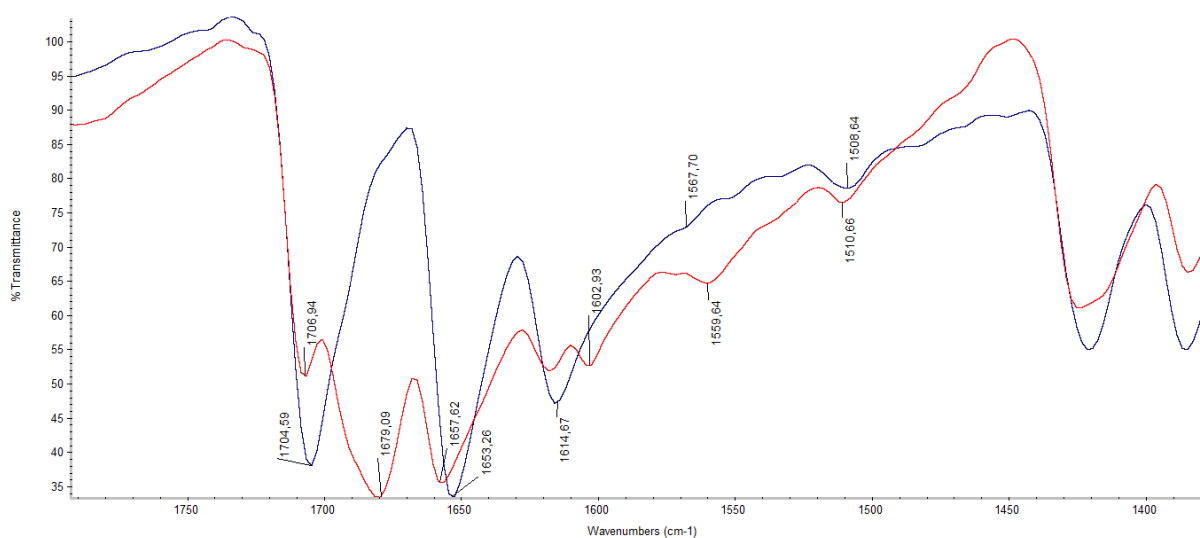
Pouze u sloučenin **1**, **3** a **5** byla kombinací analytických metod potvrzena přítomnost očekávaných produktů. Příprava ostatních sloučenin sice proběhla, bohužel se však prokázalo, že žádané produkty nebyly izolovány v čisté podobě. U těchto syntéz došlo k opakované optimalizaci reakčních podmínek (viz kapitola 4. 1), nicméně přesto se nepodařilo již zmíněné sloučeniny **2**, **4** a **6** připravit v dostačující čistotě.

Všechny sloučeniny byly podrobeny elementární analýze, přičemž u sloučenin **1**, **3** a **5** nebyla odchylka od naměřené a teoretické hodnoty větší než o 0,5 %, u ostatních sloučenin se odchylka lišila podstatně více, což poukazuje na to, že žádaný produkt nebyl připraven čisté podobě.

Sloučeniny **1**, **3** a **5** byly dále charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie. Hodnoty signálů (viz experimentální část) potvrzovaly přítomnost jednotlivých atomů vodíků u těchto sloučenin.

Infračervená spektroskopie byla provedena u sloučenin **1** a **3** (oblast  $1800 - 1350 \text{ cm}^{-1}$  obr. 25) ATR měřením vzorku v tuhé fázi. V oblasti  $4000 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  by měly být

pozorovány píky odpovídající valenčním vibracím –O–H (COOH skupina u sloučeniny **3**), –C–H<sub>alif</sub> (methylové skupiny acetylacetonu) a –C–H<sub>arom</sub> (vodíky benzenových jader). Z porovnání spekter vidíme, že vibrace –C–H<sub>alif</sub> a –C–H<sub>arom</sub> jsou u sloučeniny **1** dobře rozlišeny ( $\nu$ (–C–H<sub>alif</sub>) = 2907 a 2949 cm<sup>-1</sup>; –C–H<sub>arom</sub> = 3052, 3032 a 3006 cm<sup>-1</sup>). U sloučeniny **3** dochází z důvodu tvorby dimeru karboxylových skupin (skrže vodíkové můstky) k výraznému posunu vibrace  $\nu$ (O–H) do oblasti vibrací  $\nu$ (–C–H<sub>alif</sub>), kde je pozorován široký pík složený právě z těchto vibrací. V oblasti 1800 až 1600 cm<sup>-1</sup> by měly být pozorovány píky odpovídající vibracím karbonylových skupin (>C=O z diketonu) a v případě sloučeniny **3** také vibrace karboxylových skupin. Při nižších vlnočtech (1650 cm<sup>-1</sup> a nižší) je možné očekávat vibrace vazby C=C vzniklé Knoevenagelovou kondenzací. Z porovnání spekter pro sloučeniny **1** a **3** můžeme provést identifikaci (hodnoty vlnočtu v cm<sup>-1</sup>):  $\nu$ (>C=O) = 1705 (**1**), 1707 (**3**);  $\nu$ (–C(OH)=O) = 1679 (**3**);  $\nu$ (>C=C<) = 1653 (**1**), 1658 (**3**). Relativně nízký vlnočet vibrace karboxylové skupiny u **3** může být opět připsán tvorbě dimeru karboxylových skupin [60].



**Obr. 25:** IČ spektra (v oblasti 1800 – 1350 cm<sup>-1</sup>) u sloučenin **1** (modrá křivka) a **3** (červená křivka)

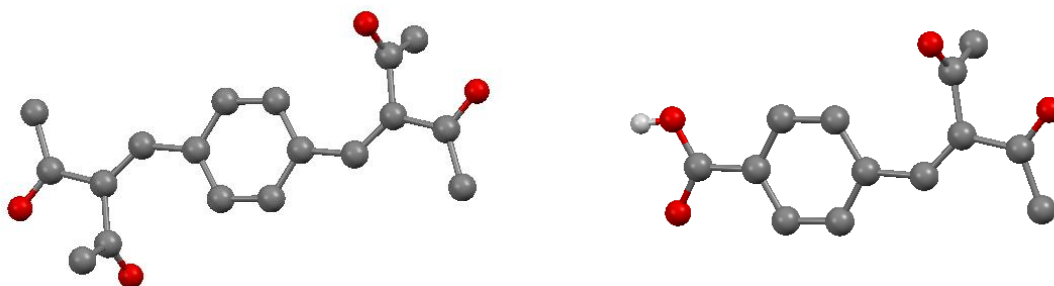
### 4.3 Krystalové struktury

Syntézou sloučenin **1** a **3** se podařilo izolovat krystaly vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu a byly vyřešeny struktury obou látek (obr. 26). Byly změřeny vazebné délky funkčních skupin. Pro sloučeninu **1** byly zjištěné vazebné délky 1,208(4) – 1,213(4) Å pro C=O vazby ketonových skupin; 1,370(4) – 1,397(4) Å pro C=C vazby na benzenovém jádře; 1,340(4)

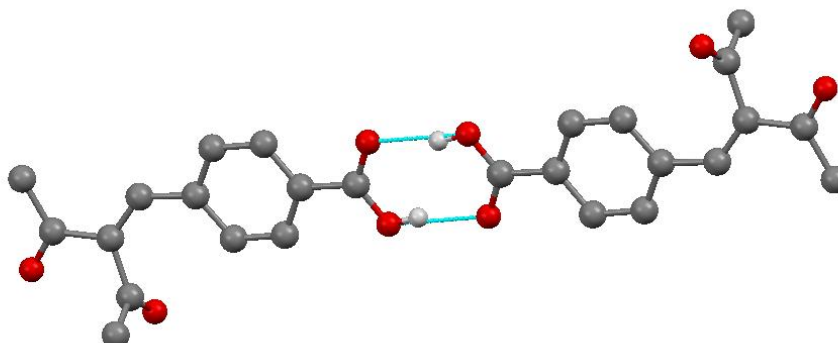


Å pro C=C vazbu vzniklou Knoevenagelovou kondenzací. Pro sloučeninu **3** byly zjištěné vazebné délky 1,205(4) – 1,212(4) Å pro C=O vazby ketonových skupin; 1,269(3) Å pro C=O vazbu karboxylové kyseliny; 1,371(4) – 1,399(3) Å pro C=C vazby na benzenovém jádře; 1,334(3) Å pro C=C vazbu vzniklou Knoevenagelovou kondenzací. Krystalografická soustava obou sloučenin je trojklonná.

Struktura sloučeniny **3** navíc poukazuje na tvorbu mezimolekulových O-H···O vodíkových vazeb ( $d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2,625(3)$  Å) mezi sousedními karboxylovými skupinami – tvorba centrosymetrického dimeru karboxylových skupin (obr. 27). Obě sloučeniny také vykazují  $\pi$ - $\pi$  interakci benzenových jader, která jsou paralelně posunuta.



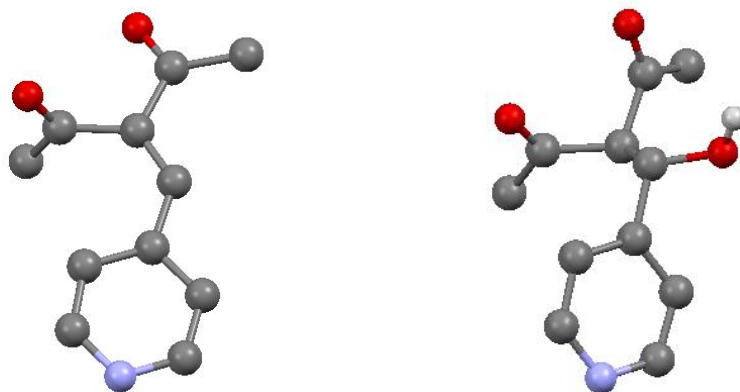
**Obr. 26:** Zobrazení molekulových struktur sloučenin **1** a **3**. Vodíkové atomy nebyly kvůli přehlednosti zobrazeny (kromě vodíku hydroxylové skupiny u sloučeniny **3**). Barevná legenda atomů: C (černá), O (červená), H (bílá).



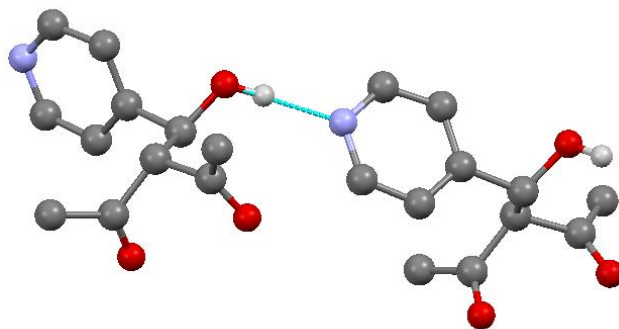
**Obr. 27:** Zobrazení vodíkových vazeb (modrá čára) v molekulové struktuře sloučeniny **3**. Vodíkové atomy (kromě těch, které jsou součástí vodíkové vazby) nebyly kvůli přehlednosti zobrazeny. Barevná legenda atomů: C (černá), O (červená).

Rovněž se podařilo získat krystaly pro rentgenovou strukturní analýzu syntézou sloučenin **4** a **4'** a byly vyřešeny struktury obou látek (obr. 28). Pro sloučeninu **4** byly zjištěné vazebné délky 1,202(4) a 1,208(4) Å pro C=O vazby ketonových skupin; 1,372(5) – 1,394(4) Å pro C=C vazby na benzenovém jádře; 1,319(5) a 1,329(5) Å pro C-N vazby na benzenovém jádře; 1,333(3) Å pro C=C vazbu vzniklou Knoevenagelovou kondenzací. Pro sloučeninu **4'** byly zjištěné vazebné délky 1,198(4) a 1,217(4) Å pro C=O vazby ketonových skupin; 1,377(4) – 1,383(3) Å pro C=C vazby na benzenovém jádře; 1,329(4) a 1,330(4) Å pro C-N vazby na benzenovém jádře. Krystalografická soustava sloučeniny **4** i **4'** je kosočtverečná.

Struktura sloučeniny **4'** poukazuje na tvorbu mezimolekulových O-H...N vodíkových vazeb ( $d(\text{O}\cdots\text{N}) = 2,799(3)$  Å) mezi dusíkem pyridinového kruhu a hydroxylovou skupinou (obr. 29). Sloučenina **4** vykazuje  $\pi$ - $\pi$  interakci benzenových jader, která jsou paralelně posunuta, zatímco struktura sloučeniny **4'** poukazuje na  $\pi$ - $\pi$  interakci benzenových jader uspořádaných do tvaru písmene T. Základní parametry struktur sloučenin **1**, **3**, **4** a **4'** znázorňuje tabulka 4.



**Obr. 28:** Zobrazení molekulových struktur sloučenin **4** a **4'**. Vodíkové atomy nebyly kvůli přehlednosti zobrazeny (kromě vodíku hydroxylové skupiny u sloučeniny **4'**). Barevná legenda atomů: C (černá), O (červená), H (bílá), N (modrá).



**Obr. 29:** Zobrazení vodíkových vazeb (modrá čára) v molekulové struktuře sloučeniny **4'**. Vodíkové atomy (kromě těch, které jsou součástí vodíkové vazby) nebyly kvůli přehlednosti zobrazeny. Barevná legenda atomů: C (černá), O (červená), H (bílá), N (modrá).

	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4'</b>
prostorová grupa	$P \bar{1}$	$P \bar{1}$	$P 2_1 2_1 2_1$	$Pbca$
a [Å]	5,9841(9)	5,7703(9)	7,2063(12)	7,4482(6)
b [Å]	6,5131(11)	6,6039(12)	11,2776(17)	14,2838(11)
c [Å]	10,3405(19)	15,313(3)	12,3942(16)	20,3184(15)
$\alpha$ [°]	80,535(5)	88,359(5)	90	90
$\beta$ [°]	83,396(6)	82,132(5)	90	90
$\gamma$ [°]	79,298(6)	78,440(5)	90	90
V [Å <sup>3</sup> ]	389,134	566,303	1007,27(3)	2161,65(3)

**Tab. 4:** Základní krystalografická data sloučenin **1**, **3**, **4** a **4'**

## 5 Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla formou literární rešerše rozebrána biologická aktivita vybraných heterodvoujaderných komplexních sloučenin s centrálními atomy 3d, 4d i 5d kovů. U jednotlivých komplexů se především poukazovalo na protinádorovou aktivitu, která byla srovnávána s jednojadernými fragmenty, popř. i cisplatinou.

Praktická část bakalářské práce se zaměřuje na přípravu můstkových ligandů pro dvoujaderné sloučeniny a na charakterizaci těchto ligandů vybranými analytickými metodami. Byly provedeny syntézy ligandů 3,3'-(benzen-1,4-diyl dimethyliden)dipenta-2,4-dion (**1**), 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzaldehyd (**2**), 4-(2-acetyl-3-oxobut-1-en-1-yl)benzoová kyselina (**3**), 3-(pyridin-4-ylmethyliden)penta-2,4-dion (**4**), 2-(4-formylfenyl)imidazo[4,5-f][1,10]fenanthrolin (**5**) a 3-[[4-(1*H*-imidazo[4,5-f][1,10]fenanthrolin-2-yl)fenyl]metylen]penta-2,4-dion (**6**). Rovněž byl připraven nový prekurzor 3-[hydroxy(pyridin-4-yl)methyl]penta-2,4-dion (**4'**), který ale není konečným produktem Knoevenagelovy kondenzace. Především sloučeniny **1** a **3** se podařilo charakterizovat analytickými metodami. Krystalové struktury byly vyřešeny u sloučenin **1**, **3**, **4** a **4'**. Syntézy sloučenin **2**, **4** a **6** sice provedeny byly, avšak při jejich charakterizaci se prokázalo, že se nepodařilo žádané produkty připravit. Reakční podmínky se u těchto syntéz mnohokrát upravovaly, přesto se však nepodařilo dosáhnout kýžených výsledků. Také byly vyzkoušeny přípravy Schiffových bází, avšak ani zde se zcela nepodařilo optimalizovat podmínky pro úspěšnou syntézu.

Závěrem lze tedy konstatovat, že Knoevenagelovy kondenzáty **1**, **3** a **5** vznikaly výše popsanými způsoby poměrně rychle a jednoduše. Ostatní syntézy tohoto typu, přestože by měly probíhat analogickým reakčním mechanismem a za obdobných podmínek, nevedly k uspokojivým výsledkům. Schiffova kondenzace sloučenin **1** a **3** se ukázaly jako problematické, protože docházelo k rozkladu Knoevenagelových kondenzátů.

## 6 Použitá literatura

- [1] ARANDA, E. E. a kol.: Design, syntheses, characterization, and cytotoxicity studies of novel heterobinuclear oxindolimine copper(II)-platinum(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, *165*, 108–118.
- [2] FERNÁNDEZ-GALLARDO, J. a kol.: Heterometallic titanium–gold complexes inhibit renal cancer cells in vitro and in vivo. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5269-5283.
- [3] GONZÁLEZ-PANTOJA, J. F. a kol.: Titanocene–Phosphine Derivatives as Precursors to Cytotoxic Heterometallic TiAu<sub>2</sub> and TiM (M = Pd, Pt) Compounds. Studies of Their Interactions with DNA. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 11099-11110.
- [4] MA, L. a kol.: Heterodinuclear Pt(IV)–Ru(II) anticancer prodrugs to combat both drug resistance and tumor metastasis. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10735-10738.
- [5] WENZEL, M. a kol.: New heteronuclear gold(I)–platinum(II) complexes with cytotoxic properties: Are two metals better than one?. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 10-16.
- [6] QUENTAL, L. a kol.: Combining imaging and anticancer properties with new heterobimetallic Pt(II)/M(I) (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) complexes. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 14523-14536.
- [7] FERNÁNDEZ-MOREIRA, V. a kol.: Luminescent Re(I) and Re(I)/Au(I) complexes as cooperative partners in cell imaging and cancer therapy. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4434-4446.
- [8] KOMEDA, S. a kol.: Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 219-235.
- [9] DASARI, S. a kol.: Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364-378.
- [10] WHEATE, N. a kol.: Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 133-145.
- [11] WONG, E. a kol.: Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451-2466.
- [12] FARRELL, N. a kol.: Comparison of Chemical Reactivity, Cytotoxicity, Interstrand Cross-Linking and DNA Sequence Specificity of Bis(platinum) Complexes Containing Monodentate or Bidentate Coordination Spheres with Their Monomeric Analogues. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9522-9531.
- [13] FERNÁNDEZ-MOREIRA, V. a kol.: Heterobimetallic Complexes for Theranostic Applications. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 3345-3353.
- [14] BERTRAND, B. a kol.: Gold(I) NHC-based homo- and heterobimetallic complexes: synthesis, characterization and evaluation as potential anticancer agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 1005-1020.

- [15] DUNCAN, C. a kol.: Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics*. **2012**, *4*, 127-138.
- [16] MELÉNDEZ, E.: Titanium complexes in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2002**, *42*, 309–315.
- [17] BERGAMO, A. a G. SAVA. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton T.* **2007**, *13*, 1267-1272.
- [18] DONG, X. a kol.: Promotive Effect of the Platinum Moiety on the DNA Cleavage Activity of Copper-Based Artificial Nucleases. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2541-2549.
- [19] MIGUEL, R. B. a kol.: Inhibition of cyclin-dependent kinase CDK1 by oxindolimine ligands and corresponding copper and zinc complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 1205-1217.
- [20] MANOHARI ABEYSINGHE, P. a kol.: Antitumour bis(cyclopentadienyl) metal complexes: titanocene and molybdocene dichloride and derivatives. *Dalton Trans.* **2007**, *32*, 3474-3482.
- [21] LÜMMEN, G. a kol.: Phase II trial of titanocene dichloride in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemoth. Pharm.* **1998**, *42*, 415-417.
- [22] KRÖGER, N. a kol.: Phase II Clinical Trial of Titanocene Dichloride in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Onkologie.* **2000**, *23*, 60-62.
- [23] BANNON, J. H. a kol.: Substituted titanocenes induce caspase-dependent apoptosis in human epidermoid carcinoma cells in vitro and exhibit antitumour activity in vivo. *Brit. J. Cancer*, **2007**, *97*, 1234-1241.
- [24] BERNERS-PRICE, S. J. a kol.: Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics* **2011**, *3*, 863-873.
- [25] CASINI, A. a kol.: Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold–protein interactions for their mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 564-575.
- [26] MARZANO, C. a kol.: Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 872-881.
- [27] WENZEL, M. a kol.: Multinuclear Cytotoxic Metallodrugs: Physicochemical Characterization and Biological Properties of Novel Heteronuclear Gold–Titanium Complexes. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 9472-9480.
- [28] BRESLIIN, S. a kol.: Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today.* **2013**, *18*, 240-249.
- [29] SANTINI, M. T. a kol.: Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. *Pathobiology.* **1999**, *67*, 148-157.
- [30] FRIEDRICH, J. a kol.: Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols.* **2009**, *4*, 309-324.

- [31] MA, R. a kol.: Efficient co-delivery of a Pt(IV) prodrug and a p53 activator to enhance the anticancer activity of cisplatin. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 7859-7862.
- [32] HULKOWER, K. I. a kol.: Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics.* **2011**, 3, 107-124.
- [33] RAMU, V. a kol.: A Cytostatic Ruthenium(II)-Platinum(II) Bis(terpyridyl) Anticancer Complex That Blocks Entry into S Phase by Up-regulating p27 KIP1. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 9185-9197.
- [34] MALUMBRES, M. a kol.: To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2001**, 1, 222-231.
- [35] PRUSSIN, A. J. a kol.: DNA interaction studies of tridentate bridged Ru(II)-Pt(II) mixed-metal supramolecules. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 427-431.
- [36] ZHAO, S. a kol.: Synthesis and Study of the Spectroscopic and Redox Properties of Ru<sup>II</sup>, Pt<sup>II</sup> Mixed-Metal Complexes Bridged by 2,3,5,6-Tetrakis(2-pyridyl)pyrazine *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 6144-6152.
- [37] VERGARA, E. a kol.: Thiolato gold(I) complexes containing water-soluble phosphane ligands: a characterization of their chemical and biological properties. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 10927-10935.
- [38] SERRATRICE, M. a kol.: Cytotoxic properties of a new organometallic platinum(II) complex and its gold(I) heterobimetallic derivatives. *Dalton Trans.* **2016**, 45, 579-590.
- [39] SERRATRICE, M. a kol.: Synthesis, Structural Characterization, Solution Behavior, and in Vitro Antiproliferative Properties of a Series of Gold Complexes with 2-(2'-Pyridyl)benzimidazole as Ligand: Comparisons of Gold(III) versus Gold(I) and Mononuclear versus Binuclear Derivatives. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 3161-3171.
- [40] STERNBERG E. D. a kol.: Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron.* **1998**, 54, 4151-4202.
- [41] NAIK, A. a kol.: Visible-Light-Induced Annihilation of Tumor Cells with Platinum-Porphyrin Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6938-6941.
- [42] LEONIDOVA, A. a kol.: Towards cancer cell-specific phototoxic organometallic rhenium(I) complexes. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 4287-4294.
- [43] MEDINA, R. M. a kol.: Influence of (Hydroxymethyl)pyridine and Pyridine-carboxylic Acids, in *trans*-Position to the Isopropylamine and Ammine Ligands, on the Cytotoxicity of Platinum Complexes. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5, 2090-2100.
- [44] MACAZAGA, M. J. a kol.: Platinum(IV) Complexes of 3- and 4-Picolinic Acids Containing Ammine or Isopropylamine Ligands - Synthesis, Characterization, X-ray Structures, and Evaluation of Their Cytotoxic Activity against Cancer Cell Lines. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 30, 4762-4769.

- [45] KIRMSE, W.: Organic Elemental Analysis Ultramicro, Micro and Trace Methods. *1st ed.* Oxford: Elsevier Science, **1983**. ISBN 9780323160896.
- [46] KLOUDA, P.: Moderní analytické metody. *2. upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, **2003**. ISBN 80-86369-07-2.
- [47] DA SILVA, C. M., a kol.: Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *J. Adv. Res.* **2011**, *2*, 1-8.
- [48] JONES, G.: The Knoevenagel condensation. *Org. Reactions.* **1967**, 246-249.
- [49] RYABUKHIN, S. V. a kol.: Combinatorial Knoevenagel Reactions. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 1073-1078.
- [50] CLAYDEN, J. a kol.: Organic chemistry. *2nd ed.* New York: Oxford University Press, **2012**. ISBN 978-0-19-927029-3.
- [51] SIDDIQUI, Z. N. a kol.: Sulfuric acid-modified PEG-6000 (PEG-OSO<sub>3</sub>H): a biodegradable, reusable solid acid catalyst for highly efficient and eco-friendly synthesis of novel bis-Knoevenagel products under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3759-3764.
- [52] SUMATHI, S. a kol.: Synthesis and studies on Cu(II), Co(II), Ni(II) complexes of Knoevenagel  $\beta$ -diketone ligands. *Spectrochim. Acta A.* **2012**, *97*, 377-383.
- [53] ISAAD, J. a kol.: BODIPY modified silica coated magnetite nanoparticles as fluorescent hybrid material for Cu (II) detection in aqueous medium. *Dyes Pigments.* **2013**, *99*, 878-886.
- [54] KUNO, A. a kol.: Studies on Cerebral Protective Agents. I. Novel 4-Arylpyrimidine Derivatives with Anti-anoxic and Anti-lipid Peroxidation Activities. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1452-1461.
- [55] NAGARAJ, K. a kol.: Synthesis, Micellization Behaviour, DNA/RNA Binding and Biological Studies of a Surfactant Cobalt(III) Complex With Dipyrido[3,2-a: 2',4'-c](6,7,8,9-tetrahydro)phenazine. *J. Fluoresc.* **2014**, *24*, 1701-1714.
- [56] CHAO, H. a kol.: Mono-, di- and tetra-nuclear ruthenium(II) complexes containing 2,2'-p-phenylenebis(imidazo[4,5-f]phenanthroline): synthesis, characterization and third-order non-linear optical properties. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, *12*, 1920-1926.
- [57] RAMAN, N. a kol.: Lasing the DNA fragments through  $\beta$ -diketimine framed Knoevenagel condensed Cu(II) and Zn(II) complexes – An in vitro and in vivo approach. *Spectrochim. Acta A.* **2014**, *118*, 867-882.
- [58] BACKSTROM, R. J. a kol.: Substituted beta-diketones and their use. Finsko. EP0440324 (A2). 7.8.1991.
- [59] BIRKOFER, L. a kol.: Addition von silylierten Enolen an Benzoylchlorid und Benzaldehyd. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 2518-2520.



[60] MILATA, V. a kol.: Vybrané metódy molekulovej spektroskopie. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2007. ISBN 9788022726184.