

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANORGANICKÉ CHEMIE



**INHIBITORY MDR PROTEINŮ JAKO VHODNÉ LIGANDY PRO PŘÍPRAVU
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH KOORDINAČNÍCH SLOUČENIN**

Bakalářská práce

Autor: Petr Halaš

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Bioanorganická chemie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Ján Vančo, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 3.5.2018

Rád bych poděkoval vedoucímu své práce, doc. PharmDr. Jánů Vančovi, Ph.D. za vedení a asistenci při řešení této bakalářské práce. Dále chci poděkovat kolektivu zaměstnanců RCPTM a Katedry anorganické chemie, a to především Mgr. Peteru Antalovi, Ph.D. za provedení TGA/DSC experimentů, Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za provedení měření infračervených spekter a paní Pavle Richterové za provedení analýz elementárního složení připravených látek. Rovněž chci poděkovat vedoucímu Oddělení biologicky aktivních komplexů RCPTM a Katedry anorganické chemie, prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D., za možnost vypracovat předloženou práci na půdě místního pracoviště.

Já, Petr Halaš, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci sepsal samostatně pod odborným dohledem doc. PharmDr. Jána Vanča, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl 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 3.5.2018

.....

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Petr Halaš

Název práce: Inhibitory MDR proteinů jako vhodné ligandy pro přípravu biologicky aktivních koordinačních sloučenin

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UP

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Ján Vančo, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývá MDR proteiny, historií jejich objevu a vývoje jejich klasifikace a jejich inhibitorů. Jedním ze zaměření této práce je také využití inhibitorů MDR proteinů, jako vhodných ko-ligandů pro přípravu komplexních sloučenin s biologicky zajímavým fragmentem ze skupiny cytostatik zvaných Casiopéinas. V experimentální části jsou pak popsány postupy jejich syntéz a charakterizace za pomoci vybraných fyzikálně-chemických metod (elementární analýzy, FTIR spektroskopie ve střední a daleké spektrální oblasti, hmotnostní spektrometrií a u vybraných zástupců dvou skupin látek i TGA/DSC analýzou). Celkem byly připraveny tři referenční měďnaté komplexy bez MDR inhibitorů a sedm ternárních měďnatých komplexů s vybranými inhibitory MDR proteinů, kyselinou nalidixovou, probenecidem a gemfibrozilem, ze kterých pět dosud nebylo popsáno v literatuře. Připravené látky mají perspektivu využití nejen jako chemické nosiče inhibitorů MDR proteinů, ale díky biologicky aktivnímu fragmentu $\{\text{Cu}(\text{phen}/\text{bpy})\}^{2+}$ také potenciál vlastní cytotoxicity vůči nádorovým buňkám.

Klíčová slova: MDR, protein, ligand, komplex, inhibitor

Počet stran: 64

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Petr Halaš

Title: Inhibitors of MDR proteins as suitable ligands for preparation of biologically active coordination compounds

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of inorganic chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: doc. PharmDr. Ján Vančo, Ph.D.

Year of presentation: 2018

Abstract: This bachelor thesis is focused on MDR proteins, history of their discovery and development of their classification and their inhibitors. One of the aims of this thesis is also application of inhibitors of MDR proteins, as suitable co-ligands for the preparation of copper(II) complexes with biologically promising fragment inspired by the group of cytostatic agents called Casiopeínas. Experimental part describes methods of their preparations and characterizations by selected physical and chemical methods (*i.e.* elemental analysis, FTIR and Far spectroscopy, mass spectrometry and for selected representative complexes from two different groups by TGA/DSC analysis as well). In total, three reference copper(II) complexes without MDR inhibitors and seven ternary copper complexes with selected inhibitors of MDR proteins, *i.e.* nalidixic acid, probenecid and gemfibrozil, were prepared, five of which have not been described in the literature yet. Prepared substances have prospects to be useful not only as chemical carriers of MDR protein inhibitors, but also due to the potential cytotoxicity against tumor cells due to the presence of biologically active structural fragment $\{\text{Cu}(\text{phen}/\text{bpy})^{2+}\}$.

Keywords: MDR, protein, ligand, complex, inhibitor

Number of pages: 64

Language: Czech

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	9
2. Cíle práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Historie studia MDR proteinů	11
3.2. Obecná charakterizace MRPs	11
3.3. Charakterizace jednotlivých MRPs	12
3.3.1. MRP1	12
3.3.2. MRP2	13
3.3.3. MRP3	13
3.3.4. MRP4	13
3.3.5. MRP5	14
3.3.6. MRP6	15
3.3.7. MRP7	15
3.3.8. MRP8	16
3.3.9. MRP9	16
3.4. Další MDR proteiny ze skupiny ABC – transportérů	16
3.4.1. ABCB1	17
3.4.2. ABCG2	17
3.4.3. ABCA2	17
3.4.4. ABCB4	17
3.4.5. ABCB5	18
3.4.6. ABCB11	18
3.5. Krátká sumarizace významu MDR proteinů v protinádorové léčbě	18
3.6. Inhibitory MDR proteinů	19
3.7. Posouzení vhodnosti známých inhibitorů MDR proteinů jako ligandů	20
3.7.1. Kyselina nalidixová	20
3.7.2. Probenecid	21
3.7.3. Gemfibrozil	21
3.8. Výběr vhodných koligandů	22
3.8.1. Casiopéinas	22
4. Experimentální část	24
4.1. Použité metody pro charakterizaci připravených sloučenin	24
4.2. Seznam použitých chemikálií	24
4.3. Příprava referenčních Cu(II) koordinačních sloučenin s vybranými N ^o N ligandy	25
4.3.1. Příprava dihydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)měďnatého komplexu (PH1)	25

4.3.2. Příprava trihydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)měďnatého komplexu (PH2).....	25
4.3.3. Příprava hemihydrátu octanu (1,10-fenanthrolin)měďnatého komplexu (PH5)	26
4.4. Příprava ternárních měďnatých komplexů s vybranými inhibitory MDR proteinů	27
4.4.1. Příprava monohydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naftyridin-3-karboxyláto)měďnatého komplexu (PH3)	27
4.4.2. Příprava pentahydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naftyridin-3-karboxyláto)měďnatého komplexu (PH4)	28
4.4.3. Příprava dihydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)bis(4-((dipropylamino)sulfonyl)-benzoáto)měďnatého komplexu (PH7)	29
4.4.4. Příprava monohydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)bis(4-((dipropylamino)sulfonyl)-benzoáto)měďnatého komplexu (PH6)	30
4.4.5. Příprava trihydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH8)	30
4.4.6. Příprava monohydrátu bis(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH9) a monohydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH9')	31
5. Výsledky a diskuse.....	33
5.1. Spektrální charakterizace připravených látek.....	33
5.1.1. Infračervená spektroskopie	33
5.1.2. Hmotnostní spektrometrie	46
5.2. TGA/DSC analýza vybraných látek.....	53
6. Závěr	55
Seznam použité literatury.....	56

Seznam zkratek

MDR – multidrug resistance

MRP – multidrug-resistance associated protein

P-gp – P-glykoprotein

ABC – ATP-binding cassette

TMD – transmembrane domain

NBD – nucleotide-binding domain

PMEA – 9-(2-fosfonylmethoxyethyl)adenin

AZTMP – azidothymidin monofosfát

6MP – 6-merkaptopurin

TG – thioguanin

E₂17βG – estradiol 17-(β-D-glukuronid)

HEK – human embryonic kidney

CHO – chinese hamster ovary

LTC₄ – leukotrien-C₄

DNP-SG – S-(2,4-dinitrofenyl)glutathion

MSD – membrane spanning domain

EST – expressed sequence tag

DHEAS – dehydroepiandrosteron 3-sulfát

BCRP – breast cancer resistance protein

AZT – zidovudin

3TC – lamivudin

NSAID – nesteroidní protizánětlivé léčivo

Hnal – kyselina nalidixová

Hprob – probenecid

Hgem – gemfibrozil

DMSO – dimethylsulfoxid

DACH – diaminocyklohexan

phen – 1,10-fenanthrolin

bpy – 2,2'-bipyridin

1. Úvod

Jedno z nejzávažnějších civilizačních onemocnění je rakovina. Při léčbě nádorových onemocnění je chemoterapie stále jednou z neúčinnějších metod. Její princip spočívá v podání cytotoxické látky, která ovlivňuje biologické pochody v buňkách, za účelem zničit nebo zneškodnit zejména nádorové buňky. Chemoterapeutiky mohou být látky jak organického, tak i anorganického původu a mechanismy jejich účinku mohou být naprosto odlišné. Je třeba zmínit, že chemoterapie nemusí být založena pouze na použití jednoho cytostatika, ale často zahrnuje kombinaci skupiny různorodých látek, které společně ničí nádor. Právě kombinace vhodných léčiv může mít za následek výrazné zvýšení efektivity. Jedním z problémů při léčbě rakoviny jsou takzvané MDR (z angl. multidrug resistance – rezistence proti široké škále léčiv) proteiny, resp. jejich účinek na transport a metabolismus protinádorových léčiv v buňce. Jejich funkcí je transport látek mezi intracelulárním a mezibuněčným prostorem, přičemž se většinou jedná o organické anionty jako aniont glutathionu nebo jeho konjugáty. Zmínky o těchto proteinech se začaly objevovat v druhé polovině 20. století a již z počátku bylo zjištěno, že jsou schopny aktivně vylučovat protinádorová léčiva ven z buňky [1]. Tato schopnost buněk bránit se cytotoxickým látkám ve výsledku způsobuje sníženou efektivitu cytostatik a právě jedním z přístupů, jak zdokonalit chemoterapii, je inhibice těchto MDR proteinů vhodnými látkami, podanými v rámci kombinované léčby.

Jedním z příkladů, kdy se v praxi povedlo potlačit vliv MDR proteinů na efektivitu protinádorového působení chemoterapeutika 6-merkaptopurinu, bylo jeho současné podání spolu se známým antibiotikem ze skupiny chinolonů, kyselinou nalidixovou, buňkám embryonální buněčné linie HEK293 transfekovaným DNA konstruktem, vedoucí k overexpresi MRP4 proteinu [2].

Téma práce i její výstupy úzce navazují na výzkumné zaměření Oddělení biologicky aktivních komplexů RCPTM a Katedry anorganické chemie, orientovaného na design, přípravu a studium biologicky aktivních koordinačních sloučenin s významnou mírou uplatnitelnosti jako potenciálních léčiv vážných lidských nemocí, zejména pak nádorových a metabolických onemocnění. V souvislosti s vazbou na uvedené výzkumné aktivity si dovoluje autor práce poděkovat za finanční podporu svých experimentů z prostředků projektů NPU I LO1305, IGA PřF 2016_007, IGA PřF 2017_018 a IGA PřF 2018_011.

2. Cíle práce

Středobodem této bakalářské práce je téma možnosti využití koordinačních sloučenin jako inhibitorů MDR proteinů se zaměřením především na protinádorovou terapii. Tomu byla také přizpůsobena literární rešerše tvořící hlavní součást teoretické části práce. Rešerše byla dále orientována na význam MDR proteinů pro farmakoterapii, zejména nádorových onemocnění, a inhibitory MDR proteinů a jejich možnosti využití jako ligandů v koordinačních sloučeninách

Cílem experimentální části této práce bylo použít vybrané inhibitory MDR proteinů jako ligandy pro přípravu série koordinačních sloučenin s centrálním atomem mědi nesoucích biologicky zajímavý fragment (2,2'-bipyridinu nebo 1,10-fenanthrolinu). Připravené sloučeniny pak byly charakterizovány jako chemická individua za pomoci sady dostupných fyzikálně-chemických metod.

3. Teoretická část

3.1. Historie studia MDR proteinů

Resistence buněk proti široké škále léčiv byla zpozorována již v roce 1973 dánským doktorem Danøem, který zjistil že buňky Ehrlichova ascitu jsou schopny pomocí molekulárních pump snižovat koncentraci intracelulárního daunorubicinu aktivní extruzí [1]. Další výzkum [3] z roku 1976 ukázal, že v membránách těchto buněk se nachází velký glykoprotein, dnes také známý jako P-glykoprotein (dále jen P-gp) nebo MDR1 P-gp (nezaměňovat s MRP1), který je schopný čerpat léčiva ven z buňky proti koncentračnímu gradientu za hydrolyzy ATP [4,5].

Další pumpa v MDR (z angl. multidrug resistance – odolnost vůči široké škále léčiv) buňkách byla nalezena Colem a kolektivem roku 1992, která byla pojmenována MRP. Později další vědecké skupiny [6,7] objevili, že lidská DNA obsahuje mnoho dalších genů spojených s MRPs a v průběhu času začali vědci objevovat nové členy rozrůstající se skupiny těchto proteinů [8,9].

V roce 2011 publikoval A. K. Tiwari přehledový článek [10], ve kterém je zmíněno již celkem 14 MDR proteinů ze skupiny ABC (z angl. ATP-binding cassette) transportérů, z nichž je 8 označeno právě jako MRP.

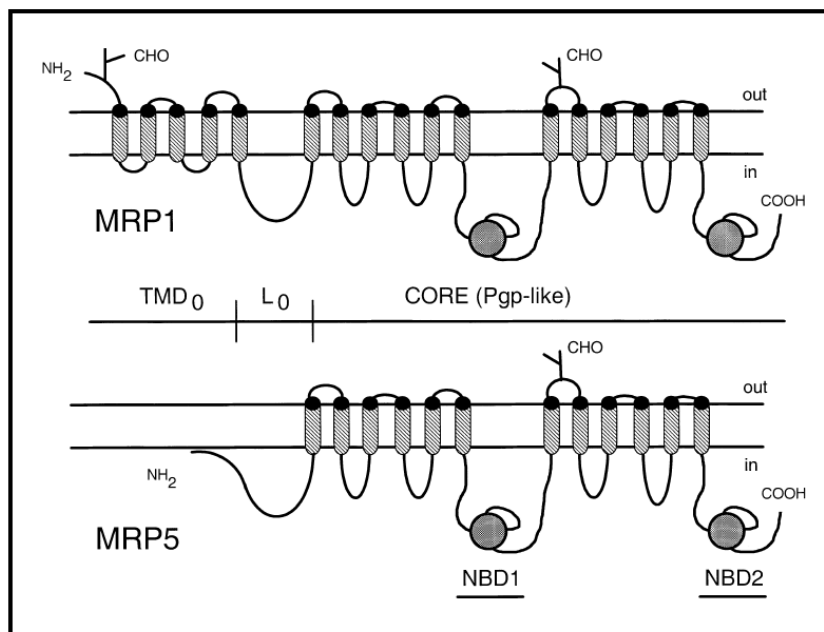
3.2. Obecná charakterizace MRPs

Jelikož se MRPs řadí mezi ABC proteiny, jsou také někdy označovány zkratkami ve formátu ABCCx, kde x je číslo a C značí, že spadají do C-skupiny ABC proteinů. Toto pojmenování pochází z roku 1996 od Allikmetse a kol [8]. Často používané značení je také MOAT (z angl. multispecific organic anion transporter), jelikož se jedná o transportéry organických aniontů. Další zavedené názvy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Značení MRPs [11,12].

Člen	Další používané názvy
MRP1	ABCC1, MRP
MRP2	ABCC2, cMOAT, cMRP
MRP3	ABCC3, MOAT-D, cMOAT-2
MRP4	ABCC4, MOAT-B
MRP5	ABCC5, MOAT-C, pABC11
MRP6	ABCC6, MOAT-E, MLP-1
MRP7	ABCC10
MRP8	ABCC11
MRP9	ABCC12

MRPs můžeme dále dělit na základě složení, resp. zdali obsahují N-koncovou doménu TMD₀ (Transmembrane domain, někdy označována Membrane spanning domain), nebo ne [11]. Např. MRP1 až MRP3 tuto doménu obsahují, ale MRP5 a P-gp nikoliv, jak je naznačeno na Obrázku 1 [13,14].



Obrázek 1: Znázornění topologie domén transmembránového proteinu MRP1 a MRP5; MRP5 neobsahuje TMD₀ doménu, NBD značí nukleotid vázající doménu (z angl. nucleotide-binding domain). Převzato od Borsta a kolektivu [11].

3.3. Charakterizace jednotlivých MRPs

3.3.1. MRP1

MRP1 je v těle všudypřítomný a je jedním z hlavních transporterů leukotrienu C₄ [15–18]. Výzkum ukázal, že obecně transportuje organické anionty [19–21], např. konjugáty léčiv zejména s glutathionem, glukuronáty nebo sulfáty. Tento protein je schopný extrudovat léčiva ven z buňky jako jsou methotrexát nebo arsenitan, který konkrétně tvoří komplex se třemi molekulami glutathionu [11].

Spolu s MRP2 je také schopný transportovat alkaloidy z *Vinca Minor* a anthracykliny a je zároveň důležité zmínit, že ke vzniku resistance musí být přítomen glutathion. To bylo prokázáno vědeckými skupinami G. J. Zamana [22] a C. H. Versantvoorta [23], které pozorovaly vymizení MRP1 způsobené rezistence při vyčerpání vnitrobuněčného glutathionu. U MRP2 byl tento fakt prokázán na ledvinových buňkách transfekovaných MRP2 konstruktem,

kdy docházelo ke zvýšenému transportu vinblastinu, který byl úměrný s exportem glutathionu [11].

Další výzkum ukázal, že k transportu dochází pouze v přítomnosti redukované formy glutathionu a vzhledem k tomu, že se alkaloidy *Vinca Minor* a anthracykliny v lidském těle nekonjugují s kyselými látkami (jako glutathion), je jedním z možných mechanismů kotransport, resp. symport s glutathionem [24–27].

3.3.2. MRP2

MRP2 se nachází ve tkáních, jako jsou střeva, játra a ledviny a jeho biologickou funkcí je transport glukuronidů bilirubinu a dalších organických aniontů z jater do žluče [11]. Hooijberg a kol. zjistili [28], že zvýšená exprese MRP2 v buňkách vaječného karcinomu transfekovaných MRP2 genem vedla k odolnosti vůči methotrexátu. V dalším výzkumu [29] bylo potvrzeno, že je také zodpovědný za rezistenci nádorových buněk proti cisplatině (na rozdíl od MRP1 [11]), etoposidu, doxorubicinu a epirubicinu.

Jak již bylo výše zmíněno (viz. MRP1), jedná se také o transportér *Vinca* alkaloidů a anthracyklinů.

3.3.3. MRP3

Tento protein je exprimovaný především v játrech, nadledvinách, pankreatu, ledvinách a střevech [11]. Jedná se o transportér organických aniontů, konkrétně preferuje glukuronátové konjugáty oproti glutathionovým. K transportu tělu přirozených produktů není nutná přítomnost glutathionu. HeLa buňky s malým množstvím MRP3 vykazovaly odolnost vůči etoposidu a teniposidu a také krátkodobým expozicím methotrexátu [30,31].

Jeho pravděpodobná funkce je ochrana hepatocytů tím, že poskytuje alternativní cestu pro vylučování žlučových kyselin a glukuronidních konjugátů (např. při cholestázi) [32]. Tato hypotéza byla podpořena zjištěním několika vědeckých skupin [33–35], že exprese tohoto proteinu souvisí s mechanismy, které řídí homeostázi spojenou s produkcí žlučových kyselin.

3.3.4. MRP4

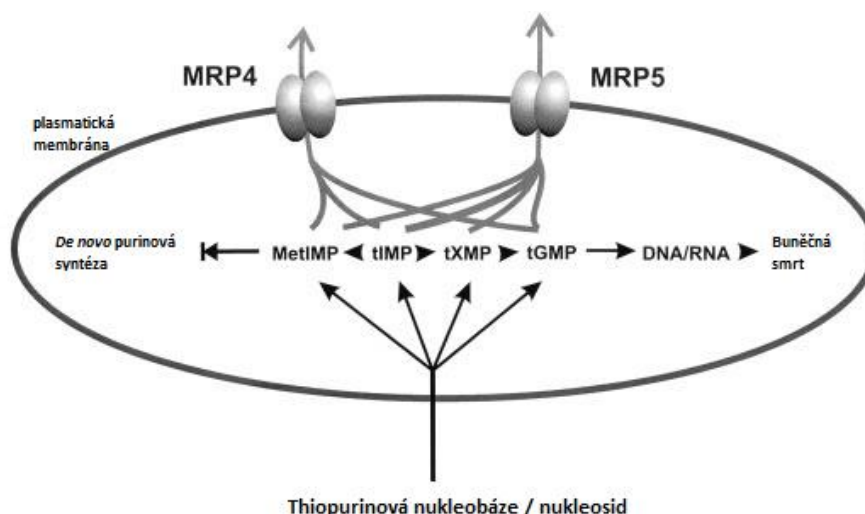
MRP4 můžeme najít mimo jiné v prostatě, vaječnicích, plicích a pankreatu [11]. Jeho transportní profil zahrnuje foláty, monoaniontové žlučové kyseliny, glutathionové a glukuronátové konjugáty a prostaglandiny [36–40].

Vědecká skupina J. D. Schuetze objevila [41] schopnost tohoto proteinu transportovat nukleotidové analogy, používané při léčbě HIV. Konkrétně testovali inhibitory reverzní

transkriptasy, jako jsou 9-(2-fosfonymethoxyethyl)adenin (PMEA) a azidothymidin monofosfát (AZTMP), na T-lymfoidní buněčné linii CEM-r1 exprimující MRP4 a CEMss (linie citlivá na PMEa). Bylo zjištěno, že se hodnoty IC₅₀ a ED₅₀ některých uvedených léčiv u jednotlivých linií liší více než stonásobně.

Dále byla skupina cytostatik transportovaných MRP4 rozšířena Z. S. Chenem a kol. [38] o 6-merkaptopurin (6MP) a 6-thioguanin (TG), které jsou používány při léčbě akutní lymfoblastické leukemie. Jejich výzkum také ukázal, že dalšími substráty MRP4 jsou cyklické nukleotidy cGMP a cAMP a konjugát glukuronidu estradiol 17-(β-D-glukuronid) (E₂17βG).

Vědecká skupina P. R. Wielinga dále zkoumala [42] transport metabolitů těchto léčiv, za účelem lepšího pochopení mechanismu resistance. Bylo zjištěno, že oba proteiny MRP4 a MRP5 vylučují metabolity 6MP - thioinosinmonofosfát, ale thioxanthosinmonofosfát byl vylučován pouze MRP5 proteinem. Při testování TG docházelo k transportu thioguanosinmonofosfátu oběma proteiny. Na Obrázku 2 je znázorněno schéma buněčného metabolismu thiopurinových nukleobází a nukleosidů.



Obrázek 2: Znázornění transportu metabolitů thiopurinových léčiv; MetIMP inhibuje *de novo* purinovou syntézu. Převzato od Wielinga a kolektivu [42].

3.3.5. MRP5

MRP5 je v těle všudypřítomný a jedná se opět o transportér organických aniontů, resp. glutathionových konjugátů [43]. Jak již bylo výše zmíněno (viz. MRP4), je částečně zodpovědný za resistenci vůči nukleotidovým analogům [42], avšak nezpůsobuje odolnost vůči dalším protirakovinným léčivům, jako jsou methotrexát, anthracykliny nebo alkaloidy *Vinca Minor* [43,44].

Vlivem MRP5 na resistenci vůči cytostatikům se také zabývali McAleer a kolektiv [44] a zjistili, že HEK293 (z angl. human embryonic kidney) buňky transfekované MRP5 konstruktem vykazují odolnost vůči těžkým kovům, jako jsou například chlorid kademnatý nebo vinan draselno-antimony.

Vědecká skupina Gabriele Jedlitschky ukázala [45], že MRP5 slouží jako transportér cyklických nukleotidů, např. cGMP a s menší účinností pak cAMP.

3.3.6. MRP6

Tento protein byl zařazen zprvu do MRP rodiny na základě primární struktury [46,47]. Bylo ale zjištěno, že mutace v jeho genu je příčinou dědičné choroby *Pseudoxanthoma elasticum*, která ovlivňuje ukládání elastinových vláken především v kůži, očích a kardiovaskulárním systému [48]. Dále také obsahuje N-koncovou doménu TMD₀ [49].

Vliv na resistenci proti léčivům byl dobře prozkoumán vědeckou skupinou Belinského [50], která testovala na CHO (z angl. Chinese hamster ovary) buňkách prototypické konjugáty glutathionu a glukuronátu, jako jsou leukotrien-C₄ (LTC₄), S-(2,4-dinitrofenyl)glutathion (DNP-SG) a 17β-estradiol 17-(β-D-glukuronid) (E₂17βG). Zvýšený transport byl zpozorován u LTC₄ a DNP-SG, avšak glukuronátový konjugát estradiolu E₂17βG nebyl tímto proteinem nijak ovlivněn. Toto zjištění indikuje, že preferuje glutathionové konjugáty jako substrát. Dále MRP6 vykazoval vliv na odolnost vůči cytostatikům, jako jsou etoposid, daunorubicin a cisplatina, ale ne proti methotrexátu nebo *Vinca* alkaloidům.

3.3.7. MRP7

MRP7 byl poprvé charakterizován vědeckou skupinou E. Hopperové [51], která zjistila, že obsahuje TMD₀ doménu (v článku označováno jako MSD-0), avšak jako jediný z této skupiny neobsahuje N-glykosylační místo na svém N-konci. Největší exprese tohoto proteinu je v pankreatu [52].

T. Chen a kolektiv dále zjistili, že u transfekovaných HEK293 buněk je MRP7 schopný efektivně transportovat pouze glukuronát estradiolu E₂17βG, nikoliv však konjugát glutathionu s 2,4-dinitrofenylem (DNP-SG). U LTC₄ byly výsledky nekonzistentní a byl pozorován jen mírný transport [53].

Další testování [54] u již konkrétních léčiv ukázalo, že je MRP7 zodpovědný za resistenci nádorových buněk hlavně vůči docetaxelu, paclitaxelu, *Vinca* alkaloidům a v menší míře vůči např. doxorubicinu a etoposidu.

V roce 2009 byla doplněna skupina cytostatik transportovaných MRP7 o některé nukleosidové a nukleobázové analogy a epothilon B. Zároveň bylo zjištěno, že na rozdíl od MRP1 a MRP2 nepotřebuje MRP7 přítomnost glutathionu [55].

3.3.8. MRP8

Tento protein byl poprvé identifikován T. Berou a kolektivem za použití EST (z angl. expressed sequence tag) databáze a bylo zjištěno, že je velice podobný MRP5 a vysoce exprimován v buňkách rakoviny prsu [56].

Vědecká skupina M. Bortfelda dále prokázala, že hraje roli při uvolňování steroidních sulfátů, jako je dehydroepiandrosteron 3-sulfát (DHEAS) [57].

Co se transportního profilu týče, MRP8 je podobný spíše MRP4 proteinu. Je schopný transportovat monoaniontové žlučové kyseliny, avšak na rozdíl od MRP4 bez nutnosti přítomnosti glutathionu [58], dále též cyklické nukleotidy cAMP a cGMP. Léčiva extrudována tímto proteinem zahrnují nukleotidové analogy fluoropyrimidiny a PMEAs [59] a methotrexát [58].

3.3.9. MRP9

Jedná se o posledního člena MRP rodiny, který zatím nebyl naklonován. Víme pouze, že je exprimován v prsu a varlatech [60]; žádný výzkum ohledně jeho substrátové specificity či protiléčivové rezistence nebyl doposud publikován [61].

3.4. Další MDR proteiny ze skupiny ABC – transportérů

Vedle MRPs, tvořících největší podskupinu MDR proteinů ze skupiny ABC – transportérů, je v literatuře uvedeno několik dalších známých MDR proteinů z této skupiny. Jejich zaužívané názvy jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Značení dalších MDR proteinů [10].

Člen	Další používaná označení
ABCA2	ABC2, STGD
ABCB1	MDR1, P-gp, PGY1
ABCB4	PGY2, MDR3
ABCB5	MDR5
ABCB11	BSEP, SPGP
ABCG2	BCRP, MXR, ABCP

3.4.1. ABCB1

ABCB1, neboli P-gp, byl první objevený protein zodpovědný za extruzi léčiv. Nejvyšší odolnost způsobuje vůči léčivům, jako jsou taxany, epipodofylotoxiny, anthracykliny a *Vinca* alkaloidy [62,63]. Dále bylo zjištěno, že transportuje i methotrexát, i když je tento jev pozorovatelný pouze při jeho pomalém vstupu do buňky [64].

Mezi jeho fyziologické funkce v organismu patří transport cytokinů, především interleukinu 2 a 4 a gama interferonu [65,66], migrace dendritických buněk a T-lymfocytů [67] a inhibice apoptózy [68].

3.4.2. ABCG2

Tento protein bývá také často značen jako BCRP z angl. breast cancer resistance protein. Má vysokou afinitu k organickým aniontům, jako jsou estron-3-sulfát, DHEAS [69] a v menší míře také ke glutathionovým a glukuronidovým konjugátům [70].

Honjo a kol. [69] ukázali schopnost tohoto proteinu (resp. jeho mutantů R482G a R482T [71]) efektivně transportovat anthracykliny. Na druhou stranu pouze původní „wild-type“ ABCG2 byl schopen extrudovat methotrexát [70,72].

Další studie [73] také objevil resistenci ABCG2 vůči topoisomerasovým inhibitorům (topotekan), mitoxantronu a některým kamptothecinům, jako je 9-amino-kamptothecin. Nezpůsobil však významnou rezistenci proti cisplatině, doxorubicinu, samotnému camptothecinu, paclitaxelu, 5-fluorouracilu a *Vinca* alkaloidům [74].

Vědecká skupina X. Wang [75] dále zjistila vliv ABCG2 na odolnost vůči nukleosidovým analogům zidovudinu (AZT) a lamivudinu (3TC).

3.4.3. ABCA2

Vliv tohoto proteinu na MDR nebyl zatím dopodrobna prozkoumán. Doposud bylo pouze objeven vliv ABCA2 na resistenci vůči estramustinu [76] a mitoxantronu [77].

V organismu hraje roli jako regulátor cholesterolové homeostáze a LDLR (z angl. low-density lipoprotein receptor) metabolismu [78].

3.4.4. ABCB4

Tento protein bývá často značený MDR3 a je vysoce selektivní na fosfatidylcholin na rozdíl od MDR1 P-gp, který má širokou škálu substrátů. Tato vysoká selektivita pouze k jednomu substrátu naznačuje, že by neměl být zodpovědný za resistenci vůči široké škále léčiv [79] a přesto je inhibován verapamilem, což je inhibitor a substrát MDR1 [79,80].

A. J. Smith a kol. objevili schopnost tohoto proteinu transportovat cytostatika - paklitaxel, daunorubicin a vinblastin, i když většinou v menší míře, než MDR1 P-gp [81].

3.4.5. ABCB5

ABCB5 bývá vysoce exprimovaný v melanomových buňkách a je zodpovědný za jejich odolnost vůči 5-fluorouracilu, kamptothecinu a jeho analogům [82]. Dále je také pravděpodobné, že transportuje doxorubicin [83].

3.4.6. ABCB11

ABCB11, někdy značený SPGP („sesterský“ gen P-gp), je pumpou solí žlučových kyselin a není moc známo o jeho účasti na MDR [84]. Bylo pouze zjištěno, že je zodpovědný za nízkou odolnost buněk vůči taxanům [85].

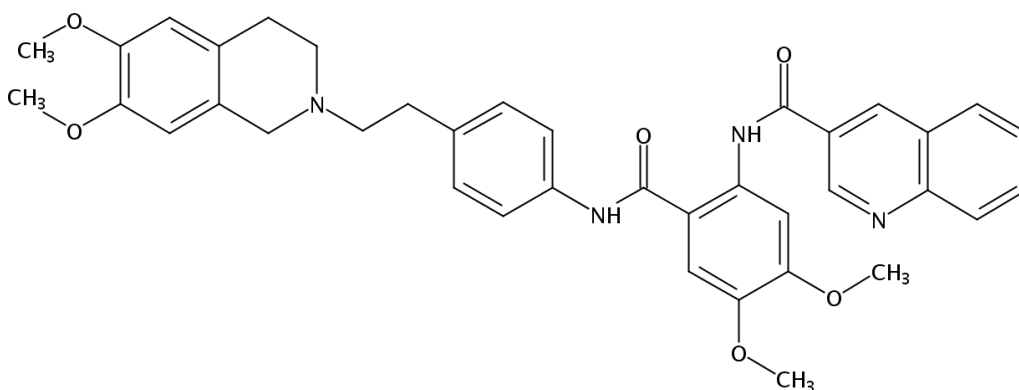
3.5. Krátká sumarizace významu MDR proteinů v protinádorové léčbě

Z uvedeného přehledu je možné odvodit, že účinnost mnoha používaných cytostatik je velmi nepříznivě ovlivněna při léčbě rakovinných onemocnění právě MDR proteiny. Bohužel si nádorové buňky často v průběhu léčby vyvinou tuto odolnost zvýšenou expresí MDR proteinů [74]. Jedním z možných řešení je proto právě jejich inhibice.

3.6. Inhibitory MDR proteinů

Výzkum při hledání vhodných inhibitorů je zaměřen zejména na MRP1 a MRP2 proteiny [11]. Pro další zmíněné proteiny nebyly inhibitory nebo modulátory do tak značné hloubky studovány.

V případě MDR1 P-gp již byly nalezeny efektivní inhibitory. Do první generace ABCB1 inhibitorů řadíme například cyklosporin A (CSA), verapamil a chinin [86–90], v klinických testech však selhaly [10]. V druhé generaci se podařilo nadesignovat [91] a připravit valsopodar, analog CSA a biricodar. Tyto inhibitory již nebyly tak toxické a měli mnohem lepší biodostupnost [92]. Inhibitory třetí generace jako tariquidar dokonce inhibují i další ABC transportéry [86,93].



Obrázek 3: Vzorec tariquidaru, zástupce třetí generace MDR inhibitorů.

Pro kompetitivní inhibici MRP1 a MRP2 je možné použít například leuktorien C4 a *S*-decylglutathion, což jsou substráty s vysokou afinitou k těmto proteinům a léčivo MK571, což je antagonist leukotrienu D₄ [24,94]. Dalšími blokátory MRP1 jsou organické kyseliny, které byly původně vyvinuty k inhibici transportu kyseliny močové, jako sulfinyprazon, benzbromaron a probenecid [11,95].

G. Reid a kolektiv dále testovali inhibici nesteroidními protizánětlivými léčivy (NSAIDs) a vliv úrovně prostaglandinů [39]. Zjistili, že MRP4 je silně inhibován všemi testovanými prostaglandiny, na rozdíl od MRP3 a MRP1, které inhibovány nebyly. Transport u MRP2 byl dokonce stimulován. Dále ukázali, že NSAIDs jako indomethacin, indoprofen, ketoprofen a flurbiprofen inhibují MRP4 a MRP1, oproti tomu diklofenak, celekoxib a rofekoxib inhibovaly slabě.

Novější výzkumy uvádí také jako vhodné inhibitory MRP1 deriváty pyrrolopyrimidinu [96] nebo tricyklické isoxazoly s cyklohexylovými můstky [97].

V neposlední řadě stojí za zmínku i přírodní modulatory jako jsou polyfenoly, ginsenosidy, flavonoidy, kurkumin a extrakty z aronie nebo moruše, které zvyšují chemosensitivitu k ABCB1, ABCC1 a ABCG2 [98–101]. G. G. Rocha [102] uvádí také jako vhodný inhibitor MRP1 triterpen izolovaný z cekropie, 3 β -acetyl tormentovou kyselinu (3ATA), která v menší míře moduluje i aktivitu MRP2 až MRP4.

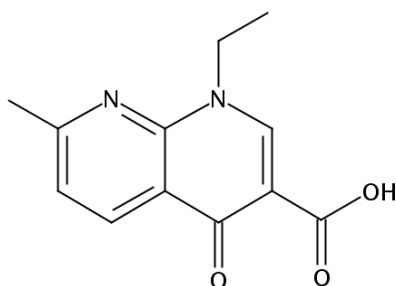
3.7. Posouzení vhodnosti známých inhibitorů MDR proteinů jako ligandů

Při výběru vhodných inhibitorů, jako ligandů jsme se s vedoucím práce zaměřil na ty, jež obsahují -COOH skupinu. Přítomnost dalších atomů schopných koordinace na centrální atom byla při výběru také jedním z faktorů (viz příklad kyseliny nalidixové).

3.7.1. Kyselina nalidixová

Jako první ligand pro přípravu našich jsme vybrali kyselinu nalidixovou. Tato látka se řadí mezi chinolony, které se již v minulosti osvědčily svými antibakteriálními vlastnostmi [103], některé i protinádorovými [104]. V roce 2014 bylo také nově objeveno vědeckou skupinou L. Cheungové [2], že se jedná o inhibitor MRP4. To bylo prokázáno na buněčné linii HEK293 s nadexpresí MRP4, kde přidání kyseliny nalidixové způsobilo zvýšení citlivosti těchto buněk vůči léčivům 6-merkaptopurinu a SN-38.

S kyselinou nalidixovou již byly připraveno několik biologicky zajímavých komplexních sloučenin s protinádorovou aktivitou, např. Ru(II) komplex kyseliny nalidixové o složení $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS}_3)(\text{dmsO}-\kappa\text{S})(\text{nal}-\kappa^2\text{O},\text{O})](\text{PF}_6)\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, kde [9]aneS₃ je 1,4,7-trithiacyklohexan, dmso je dimethylsulfoxid a Hnal je kyselina nalidixová [105]. Jako další sloučeniny s protinádorovou aktivitou byly připraveny ternární platnaté [106] a měďnaté [107] komplexy s diaminocyklohexanem (DACH), konkrétně u $[\text{Cu}(\text{nal})_2(\text{DACH})_2]$ komplexu bylo ukázáno průtokovou cytometrií, že zastavuje buněčný cyklus v S-fázi. Právě ze strukturního motivu $[\text{Cu}(\text{nal})(\text{N}-\text{N})]$ bylo dále vycházeno při přípravě dalších sloučenin v rámci experimentální části práce.



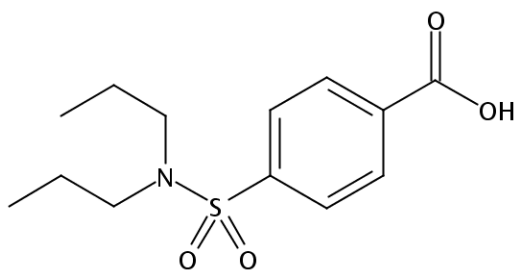
Obrázek 4: Vzorec kyseliny nalidixové; vhodnými donorovými atomy jsou O-atomy karboxylové a oxo-skupiny.

Byly připraveny i komplexy kyseliny nalidixové s některými přechodnými kovy bez dalšího organického koligandu, z nichž např. komplex $[\text{Au}(\text{nal})\text{Cl}_2]$ vykazoval dobrou protinádorovou účinnost vůči HepG-2 linii [108].

3.7.2. Probenecid

Dalším zástupcem ve skupině inhibitorů MDR proteinů, jenž obsahuje vhodné donorové atomy pro vznik komplexů s Cu (II) je probenecid. Jeho inhibiční schopnosti byly prokázány mimo jiné R. Mallantsem [109], kdy byl výrazně snížen export metabolitů tenofoviru DF u potkanů, kterým byl podán probenecid a MRP2-deficitních potkanů.

Komplexy samotného probenecidu s některými přechodnými kovy jako např. $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{prob})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ byly již připraveny a testovány na *in vivo* modelu transplantovaného sarkomu S-180 [110].

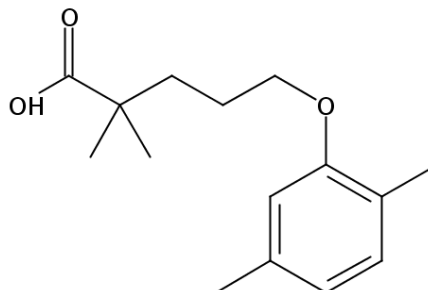


Obrázek 5: Vzorec probenecidu.

3.7.3. Gemfibrozil

Tato látka se řadí mezi fibráty, což je skupina léčiv používaných pro regulaci metabolismu tuků [111]. Studie z roku 2005 prokázala [112], že je schopen inhibovat transport glukuronidového konjugátu estradiolu $\text{E}_217\beta\text{G}$ v HEK buňkách transfekovaných OATP1B1 genem, jenž kóduje transportér organických aniontů, jakými jsou např. estron-3-sulfát [113], nebo léčivo pravastatin [114].

Jeho inhibiční účinek MDR proteinů byla prokázána vědeckou skupinou Jean-Michel Michota [115], která testovala sérii inhibitorů a jejich účinky na myších J774 makrofázích. Gemfibrozil vykazoal při 200 μM koncentraci více než trojnásobně zvýšenou akumulaci ciprofloxacinu.



Obrázek 6: Vzorec gemfibrozilu.

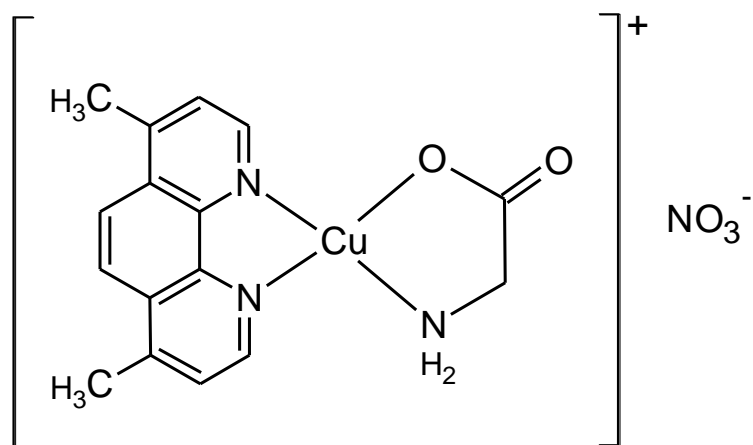
3.8. Výběr vhodných koligandů

Jak již bylo zmíněno v cílech práce, experimentální část bude zaměřena na přípravu komplexních sloučenin s biologicky perspektivním fragmentem (viz kap. 3.8.1.), kde budou vystupovat vybrané inhibitory MDR proteinů jako ko-ligandy.

3.8.1. *Casiopéinas*

Jednou z nejperspektivnějších skupin měďnatých komplexů, co se klinického použití týče, jsou látky s označením *Casiopéinas*[®]. Jedná se o měďnaté komplexy nesoucí strukturní motiv $[\text{Cu}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{O}^{\wedge}\text{O})]\text{NO}_3$, popř. $[\text{Cu}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{N}^{\wedge}\text{O})]\text{NO}_3$, kde jako bidentátní $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligandy vystupují deriváty 2,2'-bipyridinu (*bpy*) nebo 1,10-fenanthrolinu (*phen*) a jako $\text{O}^{\wedge}\text{O}$ a $\text{N}^{\wedge}\text{O}$ ligandy vystupují nejčastěji biogenní L- α -aminokyseliny nebo deprotonovaný acetylaceton nebo salicylaldehyd [116–118].

Jedním z nejvýznamnějších mechanismů účinku této skupiny komplexů je interkalační i neinterkalační vazba na DNA [116,119]. Dále pak tyto komplexy vykazují mitochondriální toxicitu, např. *Casiopéina II-gly* interferuje s mitochondriálními procesy, tím že inhibuje enzymy 2-oxoglutarát, sukcinát a pyruvát dehydrogenasy [120,121], a v konečném důsledku jejich působení dojde k vyslání apoptického signálu, který aktivuje kaspasu 9 a apoptotickou proteasu-aktivující faktor-1 (*apaf-1*) [122]. Dále pak bylo zjištěno, že tento komplex způsobuje i nadměrnou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), což opět vede k buněčné smrti.



Obrázek 7: Vzorec Casiopeína II-gly.

4. Experimentální část

4.1. Použité metody pro charakterizaci připravených sloučenin

Všechny produkty byly charakterizovány kombinací vybraných fyzikálně-chemických technik pro určení, resp. potvrzení očekávaného složení, konkrétně pak metodami prvkové analýzy, infračervené spektroskopie ve střední a daleké oblasti a pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI+MS). Vybrané látky byly podrobeny také termogravimetrickému stanovení/diferenční termické analýze pro potvrzení počtu koordinovaných a krystalicky vázaných molekul solventu. K těmto účelům byly využity následující přístroje:

- Thermo Scientific Flash 2000 Analyzátor – C, H, N, S chemická analýza prvkového složení.
- FT-IR spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 (ATR technika).
- Hmotnostní spektrometr s 3D iontovou pastí Thermo LCQ Fleet s ionizací za atmosférického tlaku (ESI).
- TG/DSC termický analyzátor STA449 F1 (Netzsch) s nízkoteplotní (-150 až 1000 °C) a vysokoteplotní (laboratorní teplota až 1600 °C) pecí a autosamplerem.

4.2. Seznam použitých chemikálií

Název chemikálie	Čistota	Výrobce
Dusičnan měďnatý, trihydrát ($\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Octan měďnatý, monohdrát ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	98%	Sigma-Aldrich
Kyselina nalidixová (Hnal)	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Probenecid (Hprob)	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Gemfibrozil (Hgem)	≥ 98%	Sigma-Aldrich
1,10-fenanthrolin (phen)	≥ 99%	Sigma-Aldrich
2,2'-bipyridin (bpy)	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3)	p.a.	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný (NaOH)	p.a.	Penta
Dimethylformamid (DMF)	p.a.	Lachema
Methanol (MeOH)	p.a.	Lachema
Ethanol (EtOH)	p.a.	Lachema
Acetonitril (MeCN)	p.a.	Lachema

4.3. Příprava referenčních Cu(II) koordinačních sloučenin s vybranými N^oN ligandy

4.3.1. Příprava dihydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)měďnatého komplexu (PH1)

V první kádince byl rozpuštěn 1 mmol 1,10-fenanthrolinu v 10 ml ethanolu a v druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol CuNO₃·3H₂O v 20 ml vody. Roztoky byly smíchány ve varné baňce a zahřívány za stálého míchání při 60 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení zahřívání byl výsledný tmavě modrý roztok zahuštěn na vodní lázni ke krystalizaci a poté ochlazen, přičemž došlo k vyloučení tmavě modrého produktu. Ten byl odsán na fritě a dále rekrystalizován ze směsi acetonitril:voda (3:1, v/v), vyloučené krystaly byly odděleny filtrací, promyty 5 ml ethanolu a vysušeny v exsikátoru nad KOH. Výsledný produkt měl tmavě modrou barvu a práškovou konzistenci. Připravený produkt byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopii a hmotnostní spektrometrií.

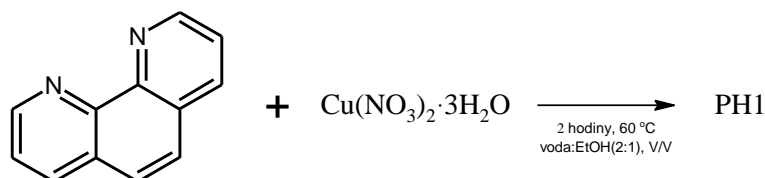


Schéma přípravy komplexu PH1.

Analýza pro [Cu(phen)](NO₃)₂·2H₂O; C₁₂H₁₂N₄O₈Cu, M_r=403.79: C, 35.7, H, 3.0, N, 13.9. Nalezeno: C, 34.9, H, 2.2, N, 13.8; FTIR (ATR, cm⁻¹) 246w, 310w, 332w, 433w, 492w, 508w, 545w, 564w, 588w, 719m, 847m, 1011m, 1225m, 1272s, 1286s, 1301s, 1426s, 1455s, 1480s, 1500s, 3074w, 3117w; ESI+MS (*m/z*, odpovídající částice): 180.29 [phen+H]⁺, 243.14 [Cu(phen)]⁺, 305.11 [Cu(phen)(NO₃)]⁺, 671.77 [Cu₂(phen)₂(NO₃)₃]⁺.

4.3.2. Příprava trihydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)měďnatého komplexu (PH2)

V první kádince byl rozpuštěn 1 mmol 2,2'-bipyridinu v 10 ml ethanolu a v druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol CuNO₃·3H₂O v 20 ml vody. Roztoky byly smíchány ve varné baňce a zahřívány za stálého míchání při 60 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení zahřívání byl výsledný tmavě modrý roztok zahuštěn na vodní lázni ke krystalizaci a poté ochlazen, přičemž došlo k vyloučení tmavě modrého produktu. Ten byl odsán na fritě a dále rekrystalizován ze směsi acetonitril:voda (3:1, v/v), vyloučené krystaly byly odděleny filtrací, promyty 5 ml ethanolu a vysušeny v exsikátoru nad KOH. Výsledný produkt měl tmavě modrou barvu a

práškovou konzistenci. Připravený produkt byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopií a hmotnostní spektrometrií.

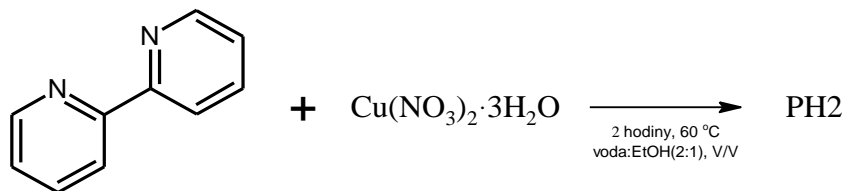


Schéma přípravy komplexu PH2.

Analýza pro $[\text{Cu}(\text{bpy})](\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_9\text{Cu}$, $M_r=397.79$: C, 30.2, H, 3.6, N, 14.1. Nalezeno: C, 30.2, H, 2.4, N, 14.4; FTIR (ATR, cm^{-1}) 258w, 301w, 305w, 331w, 376w, 415w, 648w, 668w, 728m, 748m, 776m, 1000s, 1036w, 1110w, 1159m, 1263vs, 1321w, 1447s, 1472vs, 1482vs, 1572w, 1603w, 3041w, 3068w, 3092w, 3118w; ESI+MS (m/z , odpovídající částice): 156.22 $[\text{bpy}+\text{H}]^+$, 281.12 $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{NO}_3)]^+$, 623.80 $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{NO}_3)_3]^+$.

4.3.3. Příprava hemihydrátu octanu (1,10-fenanthrolin)měďnatého komplexu (PH5)

V první kádince bylo za tepla rozpuštěno 20 mmol $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v co nejmenším objemu směsi voda:ethanol(2:1) a v druhé kádince bylo za tepla rozpuštěno 20 mmol 1,10-fenanthrolinu v co nejmenším objemu ethanolu. Roztoky byly smíchány ve varné baňce a reakční směs byla za míchání zahřívána při 60 °C po dobu 1 hodiny. Po ukončení zahřívání byl zelenomodrý roztok ponechán volně krystalizovat za pokojové teploty. Vyloučený zelenomodrý produkt byl odsán na fritě, promyt 5 ml ethanolu a vysušen v exsikátoru nad KOH bez další rekrystalizace. Připravený produkt práškové konzistence byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopií a hmotnostní spektrometrií.

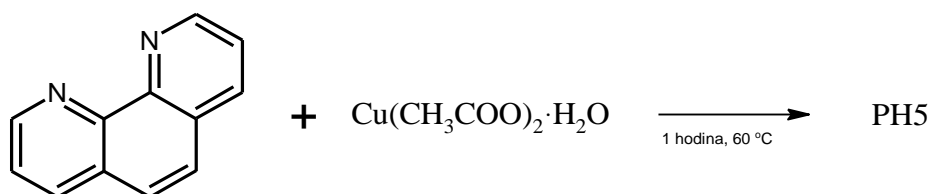


Schéma přípravy komplexu PH5.

Analýza pro $[\text{Cu}(\text{phen})](\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_{4,5}\text{Cu}$, $M_r=370.85$: C, 51.8, H, 4.1, N, 7.6. Nalezeno: C, 51.4, H, 4.0, N, 7.3; FTIR (ATR, cm^{-1}) 226w, 293w, 312w, 328w, 430w, 483w, 516w; ESI+MS (m/z , odpovídající částice): 243.14 $[\text{Cu}(\text{phen})]^+$, 302.11 $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{CH}_3\text{COO})]^+$, 634.97 $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{CH}_3\text{O})]^+$.

4.4. Příprava ternárních měďnatých komplexů s vybranými inhibitory MDR proteinů

4.4.1. Příprava monohydrátu dusičnanu (1,10-fenantrolin)(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naftyridin-3-karboxyláto)měďnatého komplexu (PH3)

Syntéza byla provedena s malými úpravami dle článku od vědecké skupiny G. Mendoza-Díaze.[123]. V první kádince byl do 70 ml vody přidán 1 ml roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l a následně 1 mmol kyseliny nalidixové, čímž byl připraven roztok její soli. pH bylo upraveno na 7 slabým roztokem HNO_3 . V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 1,10-fenantrolinu v 5 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce a ke směsi byl ihned přilít připravený roztok nalidixátu sodného. Směs modré barvy byla míchána při 60 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení zahřívání byla ponechána volně krystalizovat za pokojové teploty. Následně byl produkt odsán na fritě a promyt 5 ml ethanolu. Po rekrystalizaci z vody a odsátí na fritě byl výsledný modrý produkt práškové konzistence vysušen v exsikátoru nad KOH. Dále byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopii a hmotnostní spektrometrií.

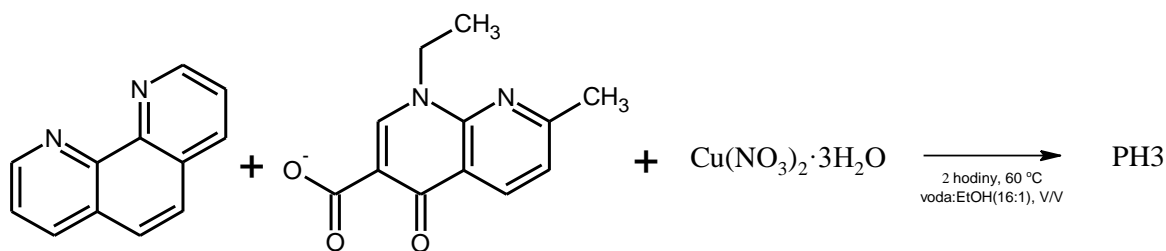


Schéma přípravy komplexu PH3.

Analýza pro $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{nal})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_7\text{Cu}$, $M_r=555.01$: C, 51.9, H, 3.8, N, 12.6. Nalezeno: C, 51.4, H, 3.7, N, 12.3; FTIR (ATR, cm^{-1}) 257w, 301w, 315w, 366w, 431w, 451w, 469w, 491w, 501w, 521w, 544w, 565w, 720w, 776w, 806w, 850w, 1039w, 1107w, 1129w, 1225m, 1255m, 1289vs, 1309vs, 1341s, 1383s, 1446s, 1493s, 1517s, 1558s, 1584s, 1602vs,

2941w, 2992w, 3065w, 3087w, 3387w, 3522w; ESI+MS (m/z , odpovídající částice): 474.27 [Cu(phen)(nal)]⁺, 831.56 [Cu₂(phen)(nal)₂(NO₃)]⁺, 1011.68 [Cu₂(phen)₂(nal)₂(NO₃)]⁺.

4.4.2. Příprava pentahydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)(1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naftyridin-3-karboxyláto)měďnatého komplexu (PH4)

Syntéza byla provedena s malými úpravami dle článku od vědecké skupiny G. Mendoza-Díaze [123]. V první kádince byl do 70 ml vody přidán 1 ml roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l a následně 1 mmol kyseliny nalidixové, čímž byl připraven roztok její soli. pH bylo upraveno na 7 slabým roztokem HNO₃. V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol Cu(NO₃)₃·3H₂O v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 2,2'-bipyridinu v 5 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce a ke směsi byl ihned přilít připravený roztok nalidixátu sodného. Směs modré barvy byla míchána při 60 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení zahřívání byla ponechána volně krystalizovat za pokojové teploty. Následně byl produkt odsán na fritě a promyt 5 ml ethanolu. Po rekrystalizaci z vody a odsátí na fritě byl výsledný modrý produkt práškové konzistence vysušen v exsikátoru nad KOH. Dále byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopii a hmotnostní spektrometrií.

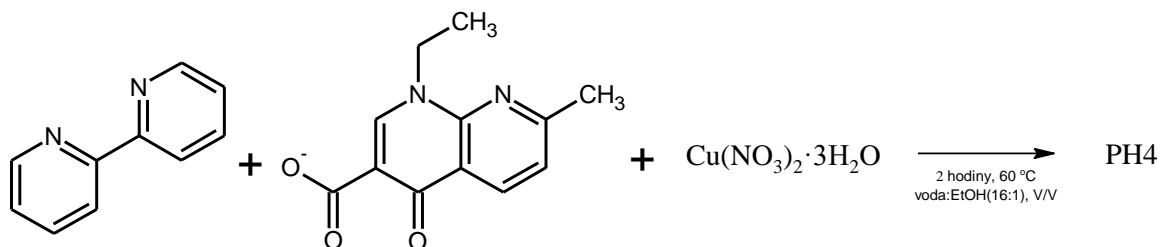


Schéma přípravy komplexu PH4.

Analýza pro [Cu(bpy)(nal)](NO₃)·5H₂O; C₂₂H₂₉N₅O₁₁Cu, M_r=603.04: C, 43.8, H, 4.9, N, 11.6. Nalezeno: C, 43.9, H, 4.5, N, 11.3; FTIR (ATR, cm⁻¹) 286w, 312w, 360w, 371w, 420w, 443w, 449w, 473w, 482w, 499w, 521w, 546w, 563w, 732w, 774w, 788w, 810w, 1032w, 1053w, 1104w, 1127w, 1153w, 1227m, 1257m, 1292m, 1319m, 1346s, 1444m, 1497m, 1517m, 1558m, 1602vs, 1624vs, 3076w, 3109w, 3011w; ESI+MS (m/z , odpovídající částice): 450.25 [Cu(bpy)(nal)]⁺, 805.62 [Cu₂(bpy)(nal)₂(NO₃)]⁺.

4.4.3. Příprava dihydrátu dusičnanu (1,10-fenanthrolin)bis(4-((dipropylamino)sulfonyl)-benzoáto)měďnatého komplexu (PH7)

Syntéza byla provedena s malými úpravami dle článku od vědecké skupiny G. Mendoza-Díaze [123]. Do první kádinky se 70 ml vody byl přidán 1 mmol NaHCO₃ a 1 mmol probenecidu, čímž byl připraven roztok jeho soli. pH bylo upraveno na 7 slabým roztokem HNO₃. V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol Cu(NO₃)₂·3H₂O v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 1,10-fenanthrolinu v 5 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce a ke směsi ihned přilít roztok sodné soli probenecidu. Po několika minutách zahřívání při 60 °C se zakalil roztok do hněda, kdy došlo pravděpodobně k redukci Cu(II) na oxid měďný nebo elementární měď.

Pro přípravu byl zvolen jiný postup. Použitá voda a ethanol byly probublány argonem a reakční baňka byla sycena argonem z naplněného balónku. 1 mmol probenecidu byl rozpuštěn v 35 ml ethanolu, za účelem rychlejšího rozpuštění a zneutralizován 35 ml vodného roztoku 1 mmol NaHCO₃. Roztok sodné soli probenecidu byl přilít do varné baňky ke směsi dusičnanu měďnatého a 1,10-fenanthrolinu, jejíž příprava byla stejná jako při prvním neúspěšném postupu. Směs modré barvy byla míchána den za laboratorní teploty a ponechána volně krystalizovat. Vyloučený produkt byl odsán na fritě a rekrystalizován ze směsi acetonitril:voda (3:1, v/v). Výsledný modrozelený práškový produkt byl opět odsán na fritě, promyt 5 ml ethanolu a vysušen v exsikátoru nad KOH. Následně byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopií a hmotnostní spektrometrií.

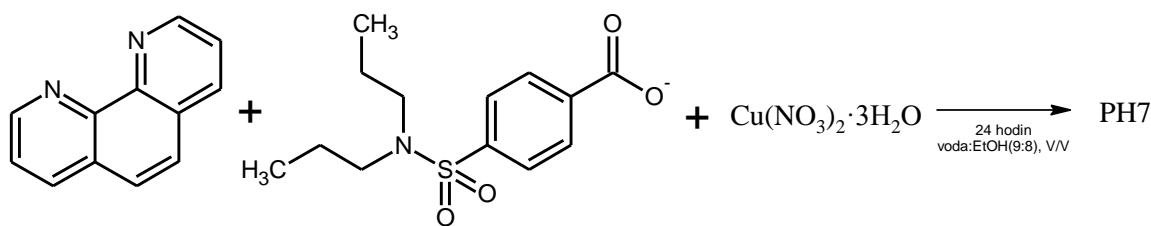


Schéma přípravy komplexu PH7.

Analýza pro [Cu(phen)(prob)₂]-2H₂O; C₃₄H₄₈N₄O₁₀CuS₂, M_r=848,48: C, 53.8, H, 5.7, N, 6.6, S, 7.6. Nalezeno: C, 53.9, H, 5.5, N, 6.9, S, 6.9; FTIR (ATR, cm⁻¹) 230w, 428w, 445w, 475w, 534w, 564w, 581w, 607w, 689w, 722m, 736m, 773w, 849w, 872w, 1086m, 1132m, 1161s, 1188w, 1295m, 1336vs, 1382vs, 1402s, 1427m, 1467w, 1520w, 1552s, 1593vs, 1607m, 2874m, 2933m, 3065w, 3344w; ESI+MS (*m/z*, odpovídající částice): 527.30 [Cu(phen)(prob)]⁺, 707.11 [Cu(phen)₂(prob)]⁺, 1087.28 [Cu₂(phen)₂(prob)₂(H₂O)]⁺.

4.4.4. Příprava monohydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)bis(4-((dipropylamino)sulfonyl)benzoáto)měďnatého komplexu (PH6)

Použitá voda a ethanol byly probublány argonem a reakční baňka byla sycena argonem z naplněného balónku. V první kádince byl rozpuštěn 1 mmol probenecidu v 35 ml ethanolu a zneutralizován 35 ml vodného roztoku 1 mmol NaHCO₃. V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol CuNO₃·3H₂O v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 2,2'-bipyridinu v 5 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce a ke směsi ihned přilít roztok sodné soli probenecidu. Směs modré barvy byla míchána den za laboratorní teploty a ponechána volně krystalizovat. Vyloučený produkt byl odsán na fritě a rekrystalizován ze směsi acetonitril:voda (3:1, v/v). Výsledný modrozelený práškový produkt byl opět odsán na fritě, promyt 5 ml ethanolu a vysušen v exsikatoru nad KOH. Následně byl charakterizován elementární analýzou, IČ spektroskopií a hmotnostní spektrometrií.

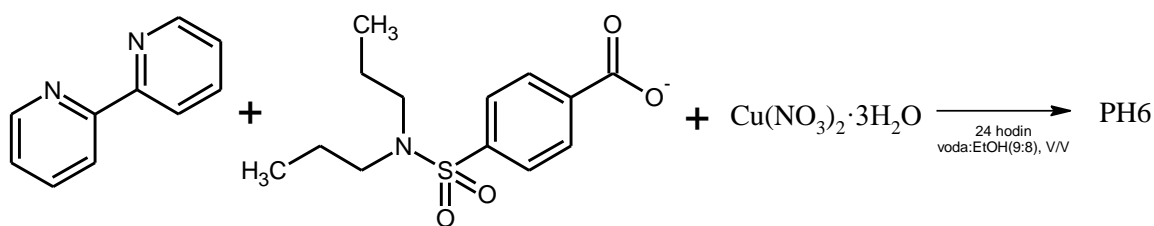


Schéma přípravy komplexu PH6.

Analýza pro [Cu(bpy)(prob)₂]₂·H₂O; C₃₆H₄₆N₄O₉CuS₂, M_r=806.45: C, 53.6, H, 5.8, N, 7.0, S, 8.0. Nalezeno: C, 53.4, H, 6.0, N, 6.6, S, 7.7; FTIR (ATR, cm⁻¹) 270w, 414w, 472w, 481w, 561w, 608w, 698w, 731w, 762w, 876w, 983w, 1086w, 1134m, 1157m, 1338s, 1367s, 1444w, 1469w, 1561m, 1607vs, 2872w, 2933w, 2965w, 3108w; ESI+MS (*m/z*, odpovídající částice): 503.30 [Cu(bpy)(prob)]⁺, 1039.19 [Cu₂(bpy)₂(prob)₂(H₂O)]⁺.

4.4.5. Příprava trihydrátu dusičnanu (1,10-fenantrolin)(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH8)

Použitá voda a ethanol byly probublány argonem a reakční baňka byla sycena argonem z naplněného balónku. V první kádince byl 1 mmol gemfibrozilu rozpuštěn v 35 ml ethanolu a zneutralizován 35 ml vodného roztoku 1 mmol NaHCO₃. V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol CuNO₃·3H₂O v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 1,10-fenantrolinu v 10 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce

a ke směsi byl přilít roztok sodné soli gemfibrozilu. Směs byla míchána den za laboratorní teploty a ponechána volně krystalizovat. Během krystalizace se vytvořil na hladině matečného roztoku lepkavý modrozelený povlak, který byl odstraněn skleněnou tyčinkou. Produkt byl odsán na fritě a rekrystalizován ze směsi DMF:voda(5:2). Modrozelený práškovitý produkt byl opět odsán na fritě a promyt 5 ml ethanolu. Po vysušení v exsikatoru nad KOH byla látka charakterizována elementární analýzou, IČ spektroskopii a hmotnostní spektrometrií.

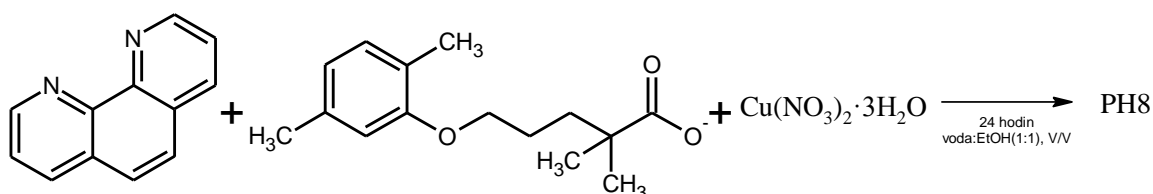


Schéma přípravy komplexu PH8.

Analýza pro $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gem})]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$, $M_r=609.13$: C, 53.2, H, 5.8, N, 6.9. Nalezeno: C, 53.6, H, 5.1, N, 6.6; FTIR (ATR, cm^{-1}) 308w, 321w, 432w, 449w, 464w, 500w, 588w, 722w, 777w, 815w, 849w, 933w, 1040w, 1107w, 1130w, 1146w, 1225w, 1262m, 1310m, 1376m, 1413s, 1478w, 1509m, 1539vs, 1583w, 1610w, 2890m, 2980m, 3064m, 3305m, 3434m, 3483m; ESI+MS (m/z , odpovídající částice): 492.26 $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gem})]^+$, 828.19 $[\text{Cu}_2(\text{phen})(\text{gem})_2+\text{Na}]^+$, 1015.38 $[\text{Cu}(\text{phen})_3(\text{gem})_3+\text{Na}]^+$.

4.4.6. Příprava monohydrátu bis(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH9) a monohydrátu dusičnanu (2,2'-bipyridin)(5-(2,5-dimethylfenoxy)-2,2-dimethyl-pentanoáto)měďnatého komplexu (PH9')

V první kádince byl 1 mmol gemfibrozilu rozpuštěn v 35 ml ethanolu a zneutralizován 35 ml vodného roztoku 1 mmol NaHCO_3 . V druhé kádince byl rozpuštěn 1 mmol $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody a v třetí kádince byl rozpuštěn 1 mmol 2,2'-bipyridinu v 10 ml ethanolu. Roztoky z druhé a třetí kádinky byly smíchány ve varné baňce a ke směsi byl přilít roztok sodné soli gemfibrozilu. Směs byla míchána den za laboratorní teploty a ponechána volně krystalizovat. Během krystalizace se vytvořil na hladině matečného roztoku lepkavý povlak a žádná krystalická látka se z roztoku nevyloučila.

Jako alternativní postup bylo vycházeno z nasycených roztoků. Sůl gemfibrozilu byla připravena smícháním nasyceného roztoků 1 mmol gemfibrozilu v methanolu a 1 mmol

NaHCO₃ v 5 ml vody. Nasycený methanolický roztok 1 mmol 2,2'-bipyridinu byl smíchán ve varné baňce s nasyceným methanolickým roztokem 1 mmol Cu(NO₃)₂·3H₂O. K této směsi byl ihned přilít roztok sodné soli gemfibrozilu. Téměř okamžitě se vysrážela tyrkysová látka. Reakční směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Sraženina byla ihned poté fritou odsáta, promyta 5 ml ethanolu a vysušena v exsikátoru nad KOH (PH9). Matečný roztok byl ponechán volně krystalizovat. Z toho následně vypadly tmavší modrozelené krystaly jako druhý podíl. Ty byly opět odsáty na fritě, promyty 5 ml ethanolu a vysušeny v exsikátoru nad KOH (PH9'). Oba podíly byly charakterizovány elementární analýzou, IČ spektroskopii a hmotnostní spektrometrií.

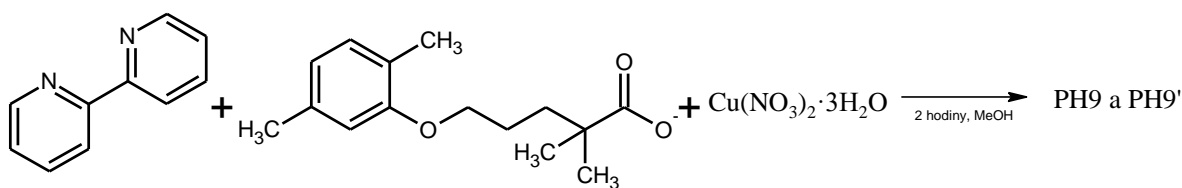


Schéma přípravy komplexu PH9 a PH9'.

Analýza pro [Cu(gem)₂]·H₂O (**PH9**); C₃₀H₄₄O₇Cu, M_r=580.22: C, 62.1, H, 7.6, N, 0. Nalezeno: C, 61.9, H, 7.6, N, 0.7; FTIR (ATR, cm⁻¹) 246w, 320w, 445w, 494w, 586w, 628w, 803w, 1036w, 1128m, 1155m, 1252m, 1282m, 1308w, 1375m, 1413m, 1474m, 1507m, 1578vs, 2861w, 2925w, 2952w, 3401w; ESI+MS (*m/z*, odpovídající částice): 468.27 [Cu(bpy)(gem)]⁺, 811.19 [Cu₂(gem)₃+2H⁺]⁺, 1030.92 [Cu(bpy)(gem)₃]⁺.

Analýza pro [Cu(bpy)(gem)]NO₃·H₂O (**PH9'**); C₂₅H₃₁N₃O₇Cu, M_r=549.08: C, 54.7, H, 5.7, N, 7.7. Nalezeno: C, 55.1, H, 5.9, N, 7.6; FTIR (ATR, cm⁻¹) 283w, 297w, 419w, 443w, 584w, 729w, 770w, 1033w, 1127m, 1157m, 1252m, 1305m, 1411m, 1446m, 1473m, 1508w, 1565m, 1595vs, 2868w, 2919w, 2959w, 3062w; ESI+MS (*m/z*, odpovídající částice): 468.25 [Cu(bpy)(gem)]⁺, 780.09 [Cu₂(bpy)(gem)₂]⁺, 1000.11 [Cu₂(bpy)₂(gem)₂(NO₃)]⁺.

5. Výsledky a diskuse

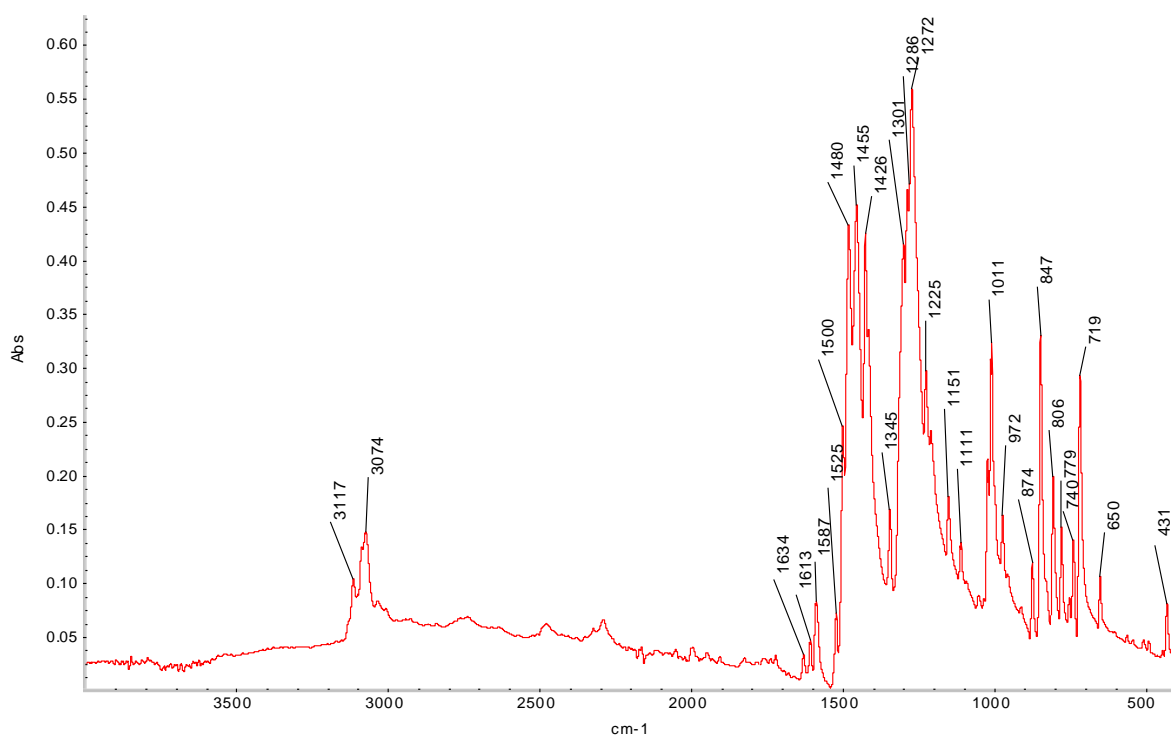
5.1. Spektrální charakterizace připravených látek

Všechny produkty byly charakterizovány kombinací vybraných fyzikálně-chemických technik pro určení, resp. potvrzení očekávaného složení, konkrétně pak metodami prvkové analýzy, infračervené spektroskopie ve střední a daleké oblasti a pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI+MS). Vybrané látky byly podrobeny také termogravimetrickému stanovení/diferenční skenovací kalorimetrii pro potvrzení počtu koordinovaných a krystalicky vázaných molekul solventu.

5.1.1. Infračervená spektroskopie

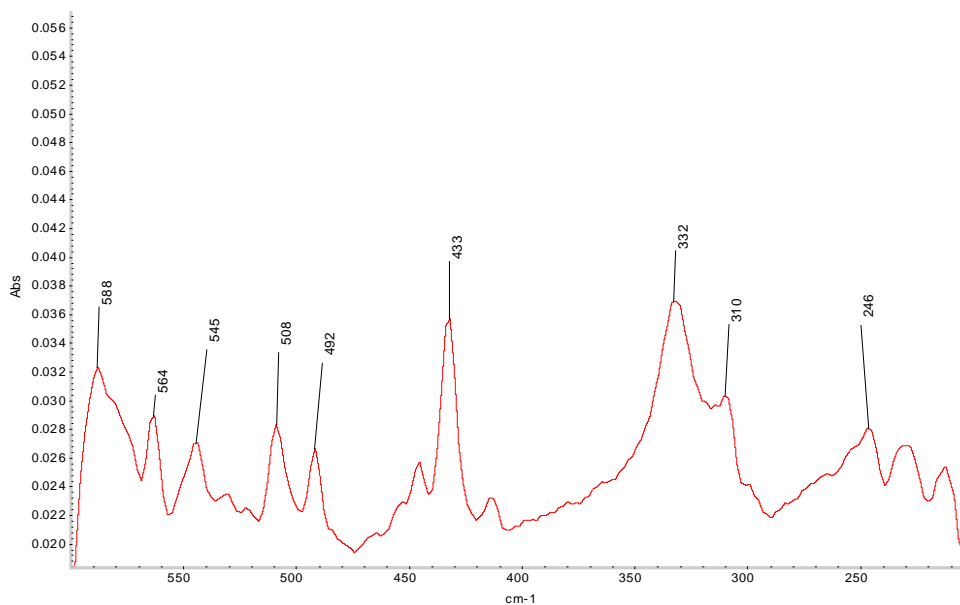
Spektrální charakteristika v infračervené oblasti byla vykonána jak v daleké spektrální oblasti v rozmezí 210–600 cm^{-1} (Far), tak ve střední spektrální oblasti v rozmezí 400–4000 cm^{-1} . Podrobná analýza pořízených spekter pro jednotlivé látky je uvedena níže:

[Cu(phen)](NO₃)₂·2H₂O (PH1)



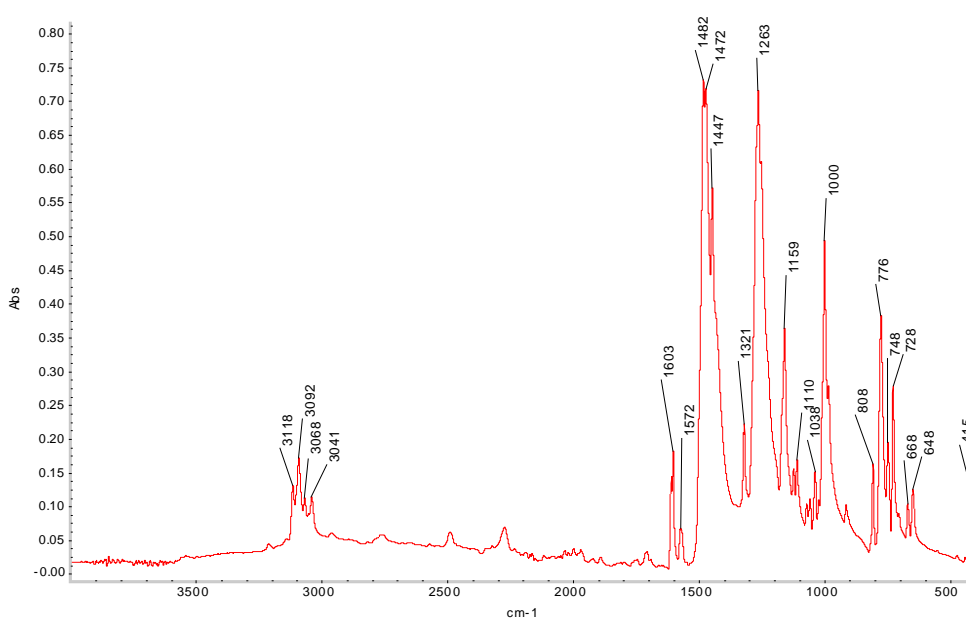
Výsledky IR spektroskopie komplexu PH1 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ v oblasti 3117 cm^{-1} , dále pak ostrý pík $\nu(\text{O-H})$ při 3074 cm^{-1}

odpovídající vzniku silné vodíkové vazby, dále pak skupinu valenčních vibrací $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ při 1613 cm^{-1} a $\nu(\text{C}=\text{C})$ v oblasti $1426\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ aromatického systému koordinovaného 1,10-fenantrolinu a v oblasti $1225\text{--}1301\text{ cm}^{-1}$ skupinu signálů odpovídajících deformačním vibracím $\delta(\text{C}\text{--}\text{H})$ a skeletálním vibracím C-C-N, C-C-C a C-C-H systémů [124].

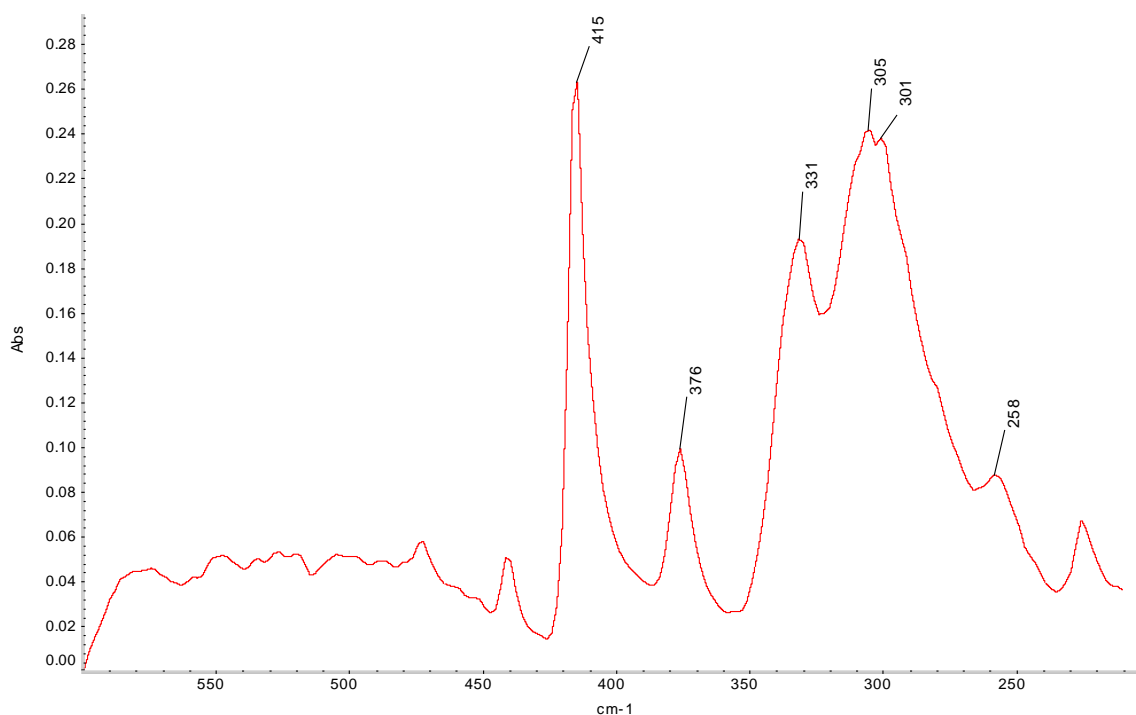


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH1 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace Cu–N při 310 cm^{-1}) a Cu–O koordinací molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 433 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(bpy)](NO₃)₂·3H₂O (PH2)

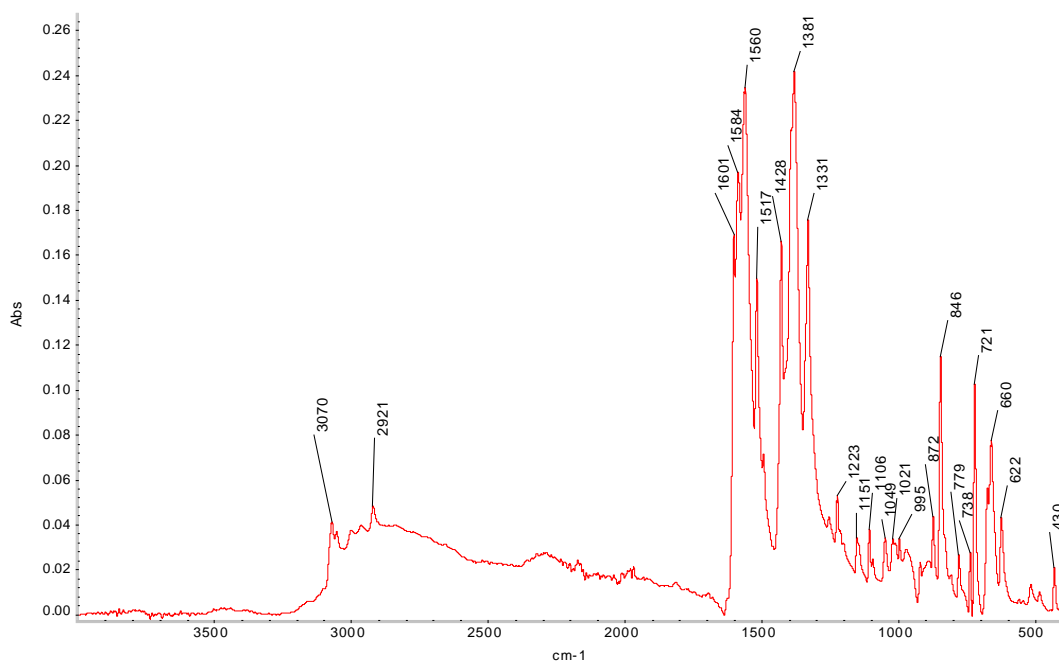


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH2 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ v oblasti 3118 cm^{-1} , dále pak ostrý pík $\nu(\text{O-H})$ při 3092 cm^{-1} odpovídající vzniku silné vodíkové vazby, dále pak skupinu valenčních vibrací $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ při 1603 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{C})$ v oblasti $1447\text{--}1482 \text{ cm}^{-1}$ aromatického systému koordinovaného 2,2'-bipyridinu a v oblasti $1263\text{--}1159 \text{ cm}^{-1}$ skupinu signálů odpovídajících deformačním vibracím $\delta(\text{C-H})$ a skeletálním vibracím C-C-N, C-C-C a C-C-H systémů [124,126].

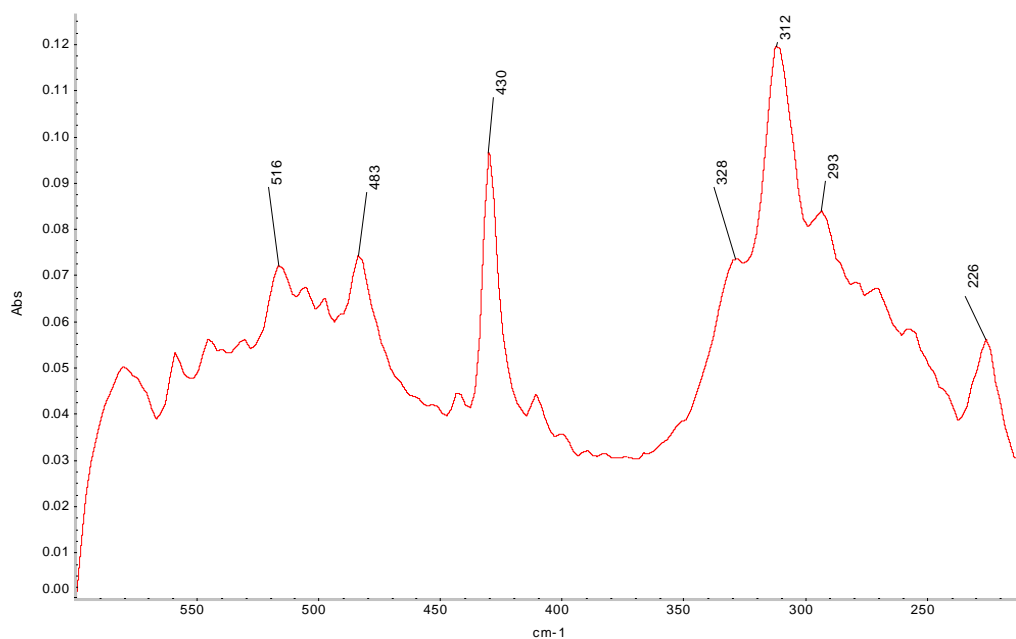


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH2 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace Cu–N při 305 a 301 cm^{-1}) a Cu–O koordinací molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 415 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(phen)](CH₃COO)₂·0,5H₂O (PH5)

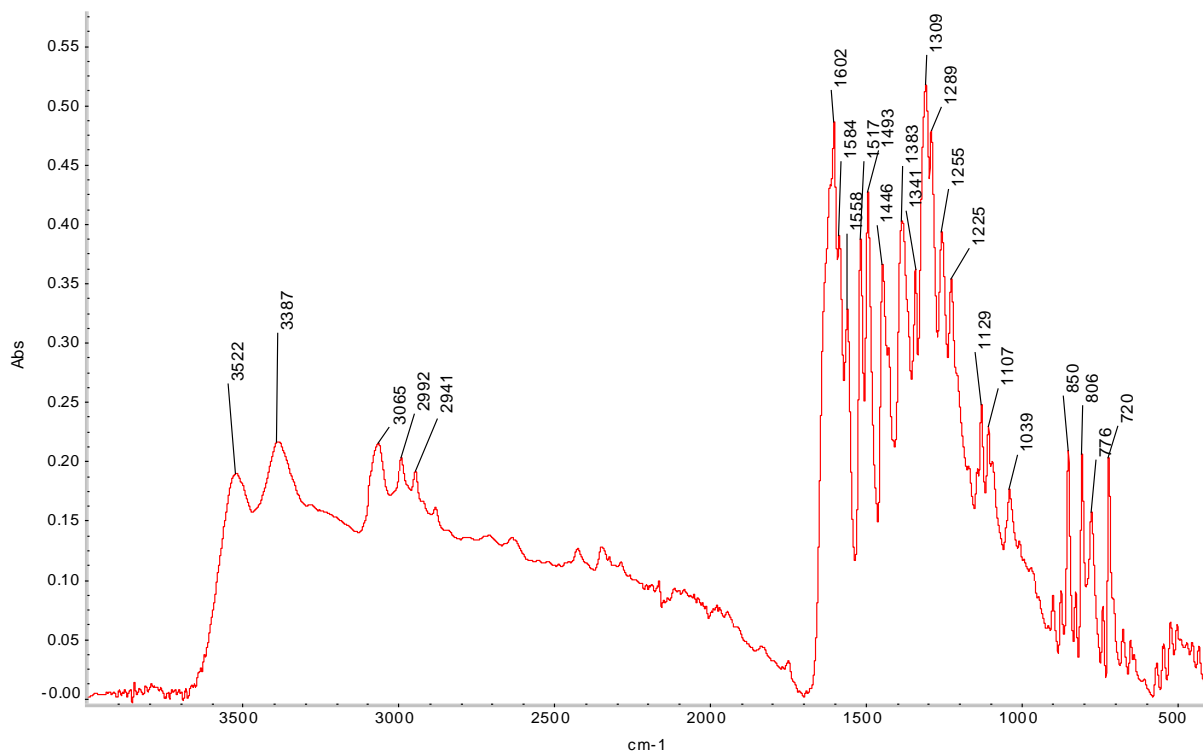


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH5 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací alifatických skupin octanu $\nu(\text{C}-\text{C})$ v oblasti 2921 cm^{-1} , valenčních vibrací karboxylátu při 1560 a 1381 cm^{-1} , dále pak ostrý pík $\nu(\text{O}-\text{H})$ při 3070 cm^{-1} odpovídající vzniku silné vodíkové vazby, dále pak skupinu valenčních vibrací $\nu(\text{C}=\text{N})$ při 1601 cm^{-1} aromatického systému koordinovaného 1,10-fenanthrolinu a deformačních vibrací octanu $\delta(\text{CH}_3)$ při 1428 cm^{-1} [124].

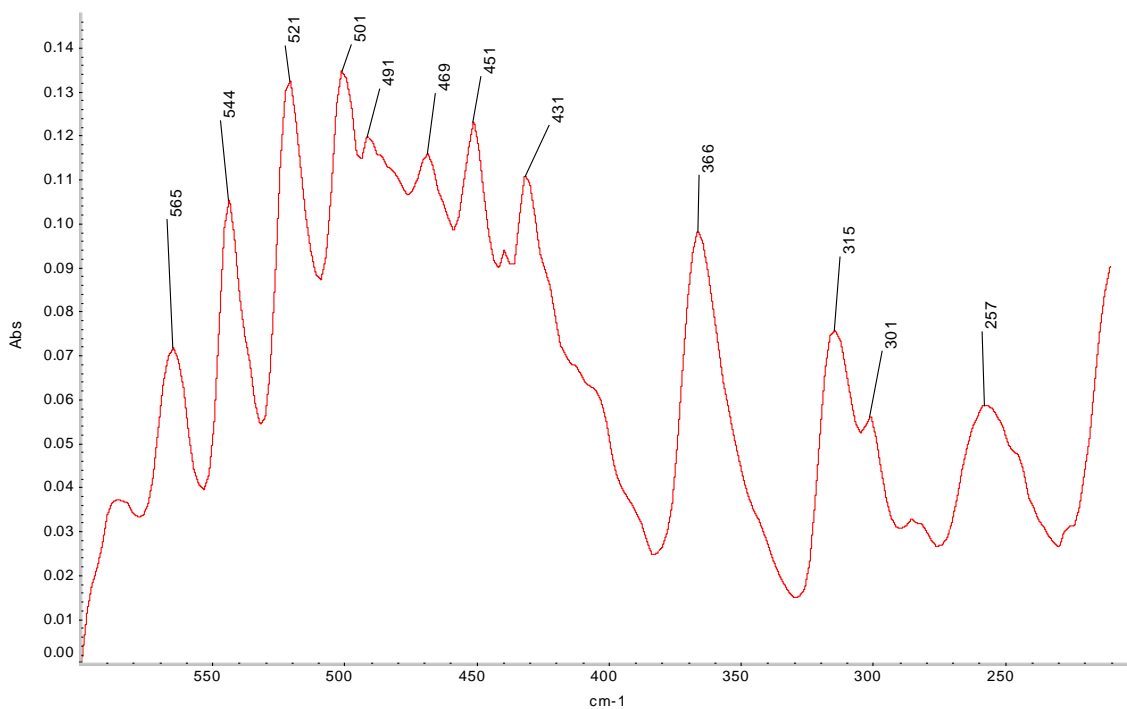


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH5 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace Cu–N při 293 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekuly octanu nebo vody (valenční vibrace Cu–O při 430 cm^{-1}) [124].

[Cu(phen)(nal)](NO₃)·H₂O (PH3)

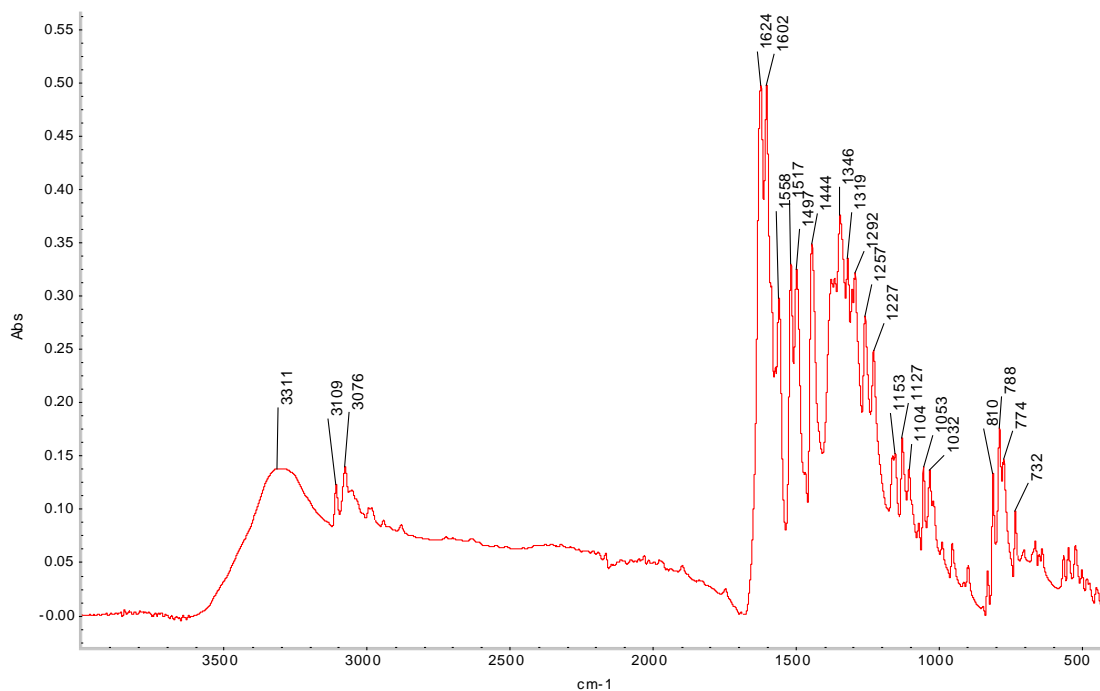


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH3 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylové skupiny v aromatickém skeletu $\nu(\text{C}=\text{O})$ v oblasti 1602 cm^{-1} , valenčních vibrací karboxylátu při 1610 sh (asymetrické) a 1493 cm^{-1} (symetrické). Z posunu vlnočtů karboxylových skupin aromatického skeletu (z 1617 cm^{-1} ve volném ligandu) a karboxylátu (z 1712 cm^{-1} ve volném ligandu) lze usoudit, že se obě zapojují do koordinace – to naznačuje, že se kyselina nalidixová chová jako chelátový ligand. Dále pík při 1446 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím aromatického kruhu kyseliny nalidixové, píky při 1518 a 1383 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ aromatického systému kyseliny nalidixové a 1,10-fenanthrolinu. Valenčním $\nu(\text{C}-\text{H})$ vibracím alifatických skupin náleží oblast při 2992 a 2941 cm^{-1} [127].

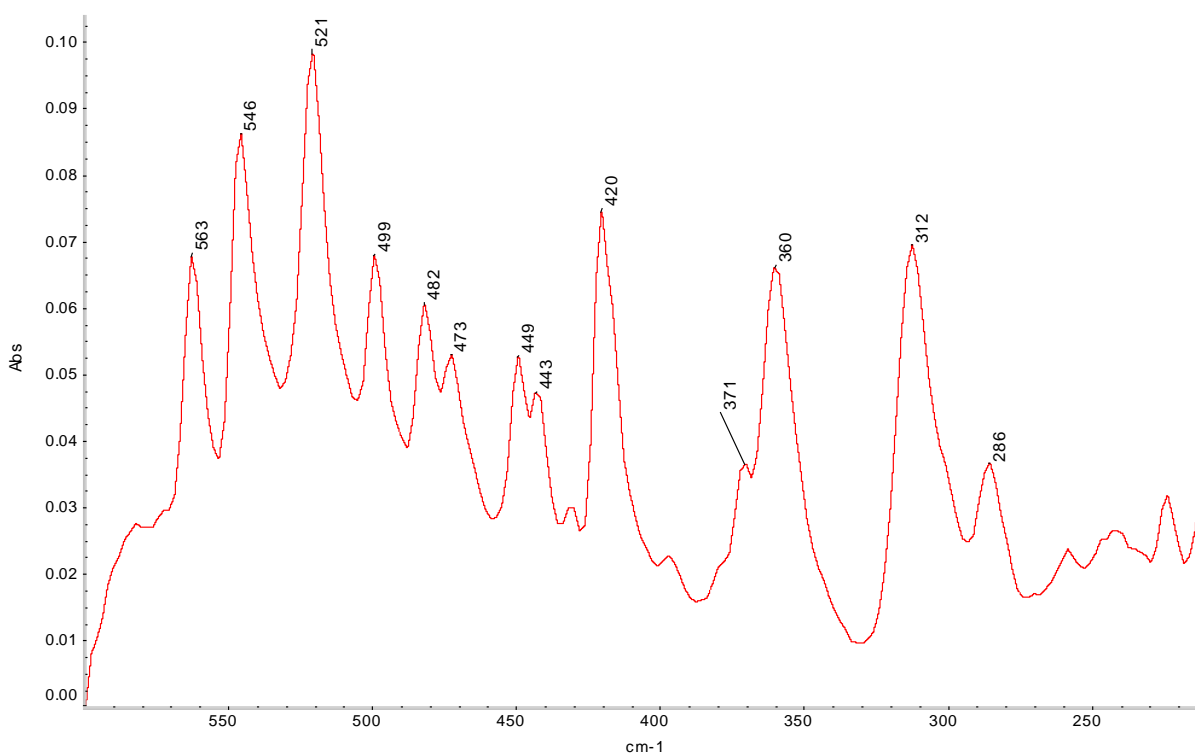


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH3 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace Cu–N při 301 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekul nalidixátu (valenční vibrace Cu–O při 366 cm^{-1}) nebo vody (valenční vibrace Cu–O při 431 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(bpy)(nal)](NO₃)·5H₂O (PH4)

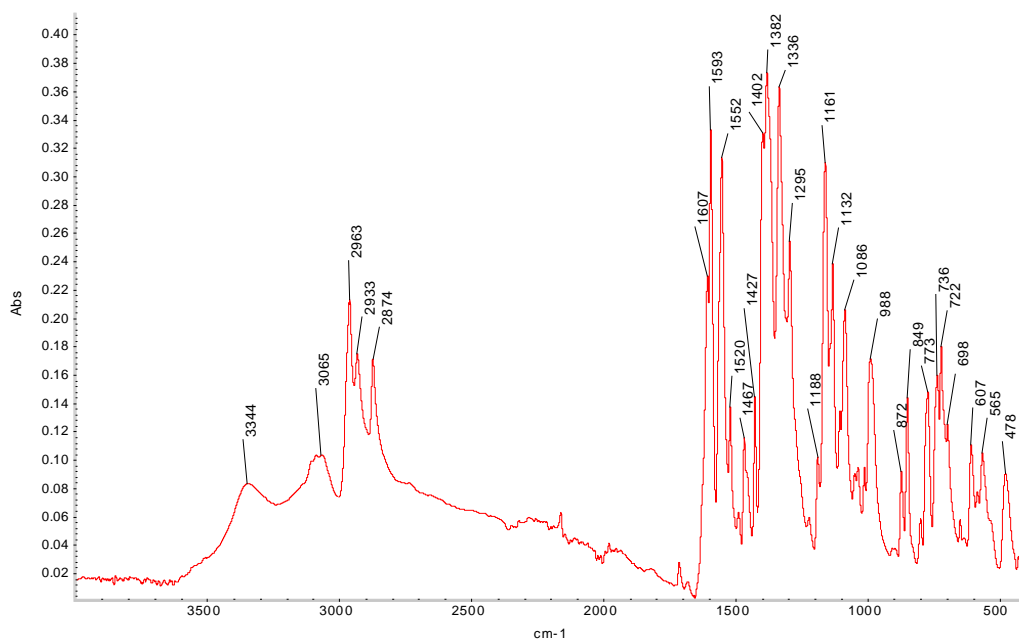


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH4 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karbonylové skupiny v aromatickém skeletu $\nu(\text{C}=\text{O})$ v oblasti 1602 cm^{-1} , valenčních vibrací karboxylátu při 1624 (asymetrické) a 1497 cm^{-1} (symetrické). Z posunu vlnočtů karbonylových skupin aromatického skeletu (z 1617 cm^{-1} ve volném ligandu) a karboxylátu (z 1712 cm^{-1} ve volném ligandu) lze usoudit, že se obě zapojují do koordinace – to naznačuje, že se kyselina nalidixová chová jako chelátový ligand. Dále pík při 1444 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím aromatického kruhu jak kyseliny nalidixové, tak 2,2-bipyridinu, pík při 1517 cm^{-1} a neoznačený pík v oblasti mezi 1346 a 1444 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ aromatického systému kyseliny nalidixové. Valenčním $\nu(\text{C}-\text{H})$ vibracím alifatických skupin náleží skupina neoznačených píků před 3076 cm^{-1} . Pík při 3109 cm^{-1} patří $\nu(\text{C}-\text{H})$ valenční vibraci aromatického kruhu 2,2'-bipyridinu [126,127].

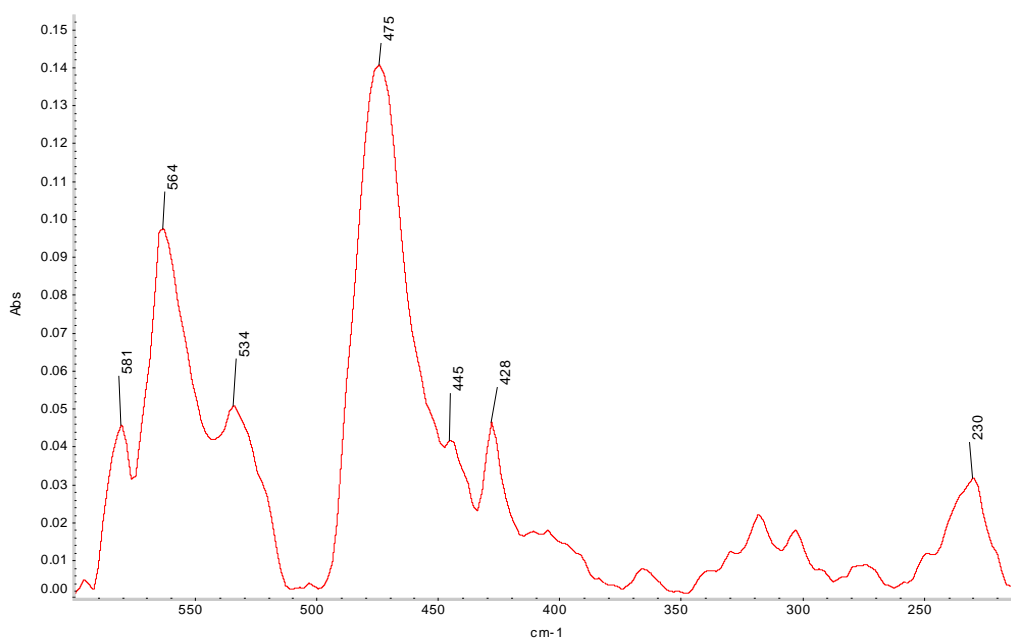


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH4 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace Cu–N při 312 a 286 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekul nalidixátu (valenční vibrace Cu–O při 360 cm^{-1}) nebo vody (valenční vibrace Cu–O při 420 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(phen)(prob)₂] \cdot 2H₂O (PH7)

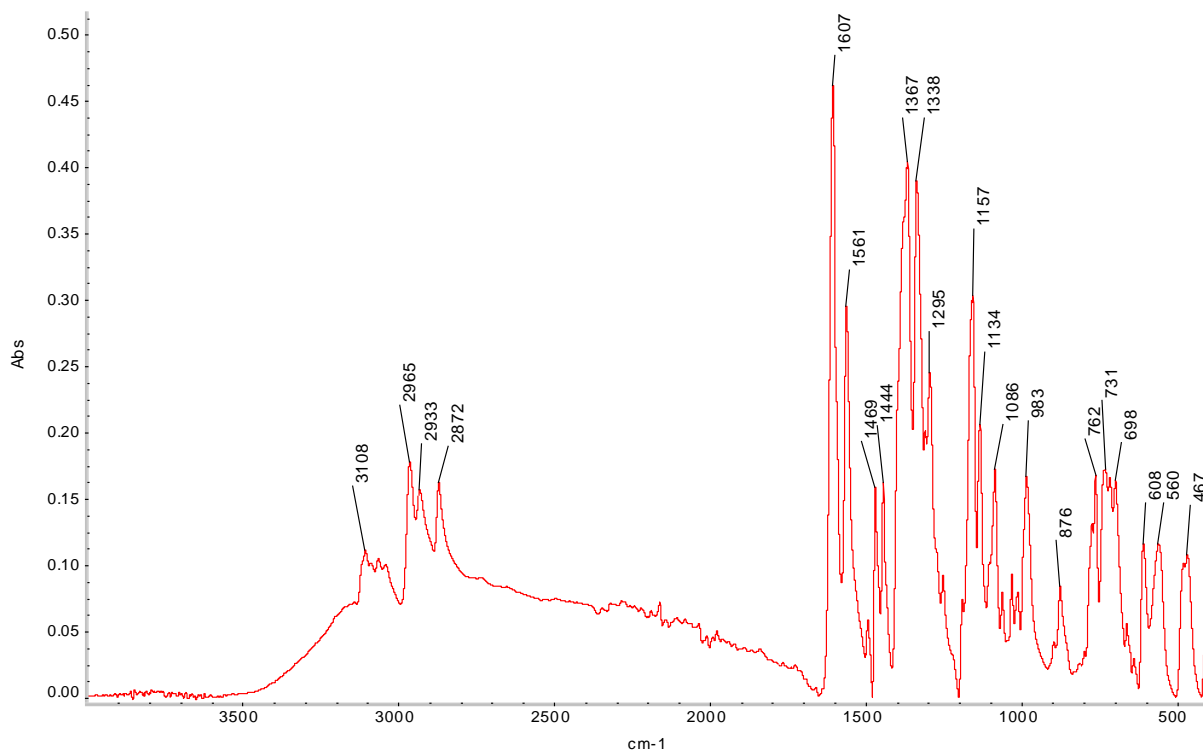


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH7 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylátu při 1593 (asymetrické) a 1552 cm⁻¹ (symetrické). Z tak malého rozdílu jejich vlnočtů se dá usoudit, že se jedná o chelátový typ [124]. Dále pík při 1295 cm⁻¹ odpovídá asymetrickým valenčním vibracím ν (SO₂), skupina píků 2963, 2933 a 2874 cm⁻¹ pak náleží valenčním ν (CH) vibracím alifatických skupin. ν (CH) vibracím aromatického kruhu je možné přiřadit 3065 cm⁻¹. Typickým vibracím aromatického kruhu 1,10-fenanthrolinu náleží píky při 1520 a 1382 cm⁻¹. Pík při 1161 cm⁻¹ náleží deformačním vibracím δ (CH) a δ (OH) a vibrace při 3344 cm⁻¹ patří ν (OH) vibraci molekuly vody [128].

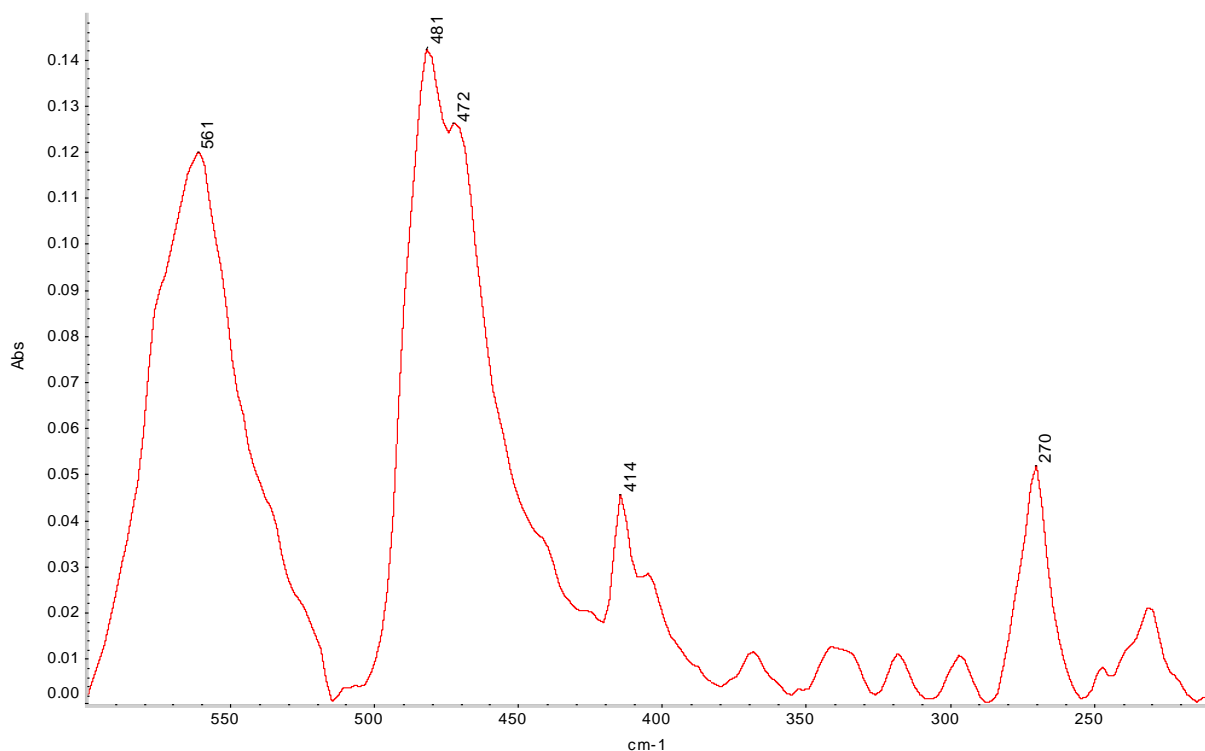


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH7 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (skupina neoznačených píků kolem 300 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 428 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(bpy)(prob)₂·H₂O (PH6)

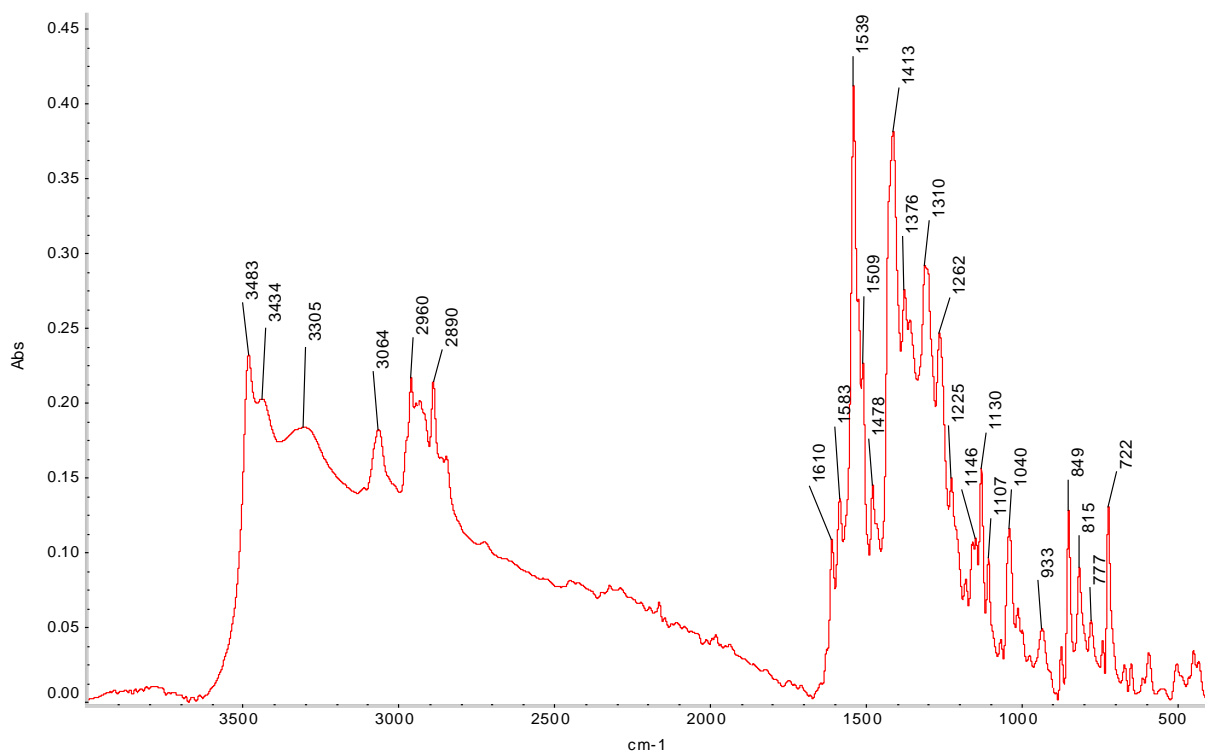


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH6 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylátu při 1607 (asymetrické) a 1561 cm^{-1} (symetrické). Rozdíl jejich vlnočtů naznačuje, že se jedná o chelátový typ [124]. Dále pík při 1295 cm^{-1} odpovídá asymetrickým valenčním vibracím $\nu(\text{SO}_2)$, skupina píků 2965 , 2933 a 2872 cm^{-1} pak náleží valenčním $\nu(\text{CH})$ vibracím alifatických skupin. $\nu(\text{CH})$ vibracím aromatického kruhu je možné přiřadit 3108 cm^{-1} . Pík při 1157 cm^{-1} náleží deformačním vibracím $\delta(\text{CH})$ a $\delta(\text{OH})$ a vibrace při 3344 cm^{-1} patří $\nu(\text{OH})$ vibraci molekuly vody. Ve spektru je možné spatřit vibrace při 1444 a 3108 cm^{-1} , které náleží valenčním vibracím aromatického kruhu 2,2'-bipyridinu [126,128].

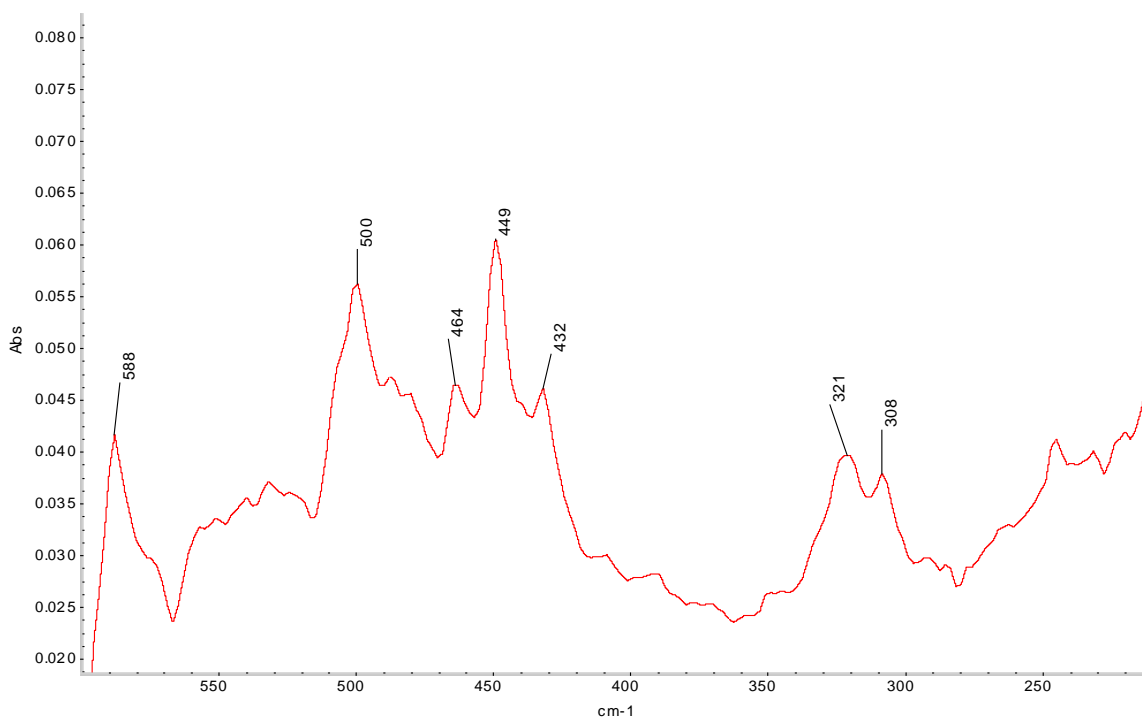


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH6 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace při 270 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 414 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(phen)(gem)]NO₃·3H₂O (PH8)

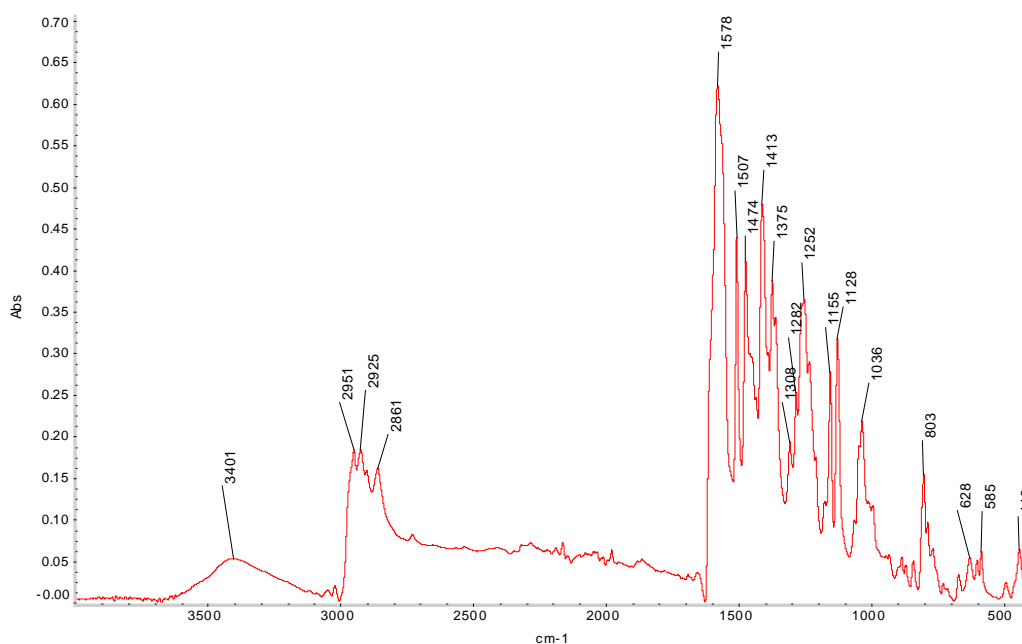


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH8 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylátu při 1539 (asymetrické) a 1413 cm^{-1} (symetrické). Rozdíl jejich vlnočtů naznačuje, že se jedná o acetátový typ [124]. Dále skupina píků 2960 a 2890 cm^{-1} pak náleží valenčním $\nu(\text{CH})$ vibracím alifatických skupin. $\nu(\text{CH})$ vibracím aromatického kruhu je možné přiřadit 3064 cm^{-1} . Typické vibraci aromatického kruhu 1,10-fenanthrolinu náleží pík při 1376 cm^{-1} . Deformačním $\delta(\text{CH})$ vibracím náleží píky při 1107, 1225, 1146, 1130 a 1040 cm^{-1} [129].

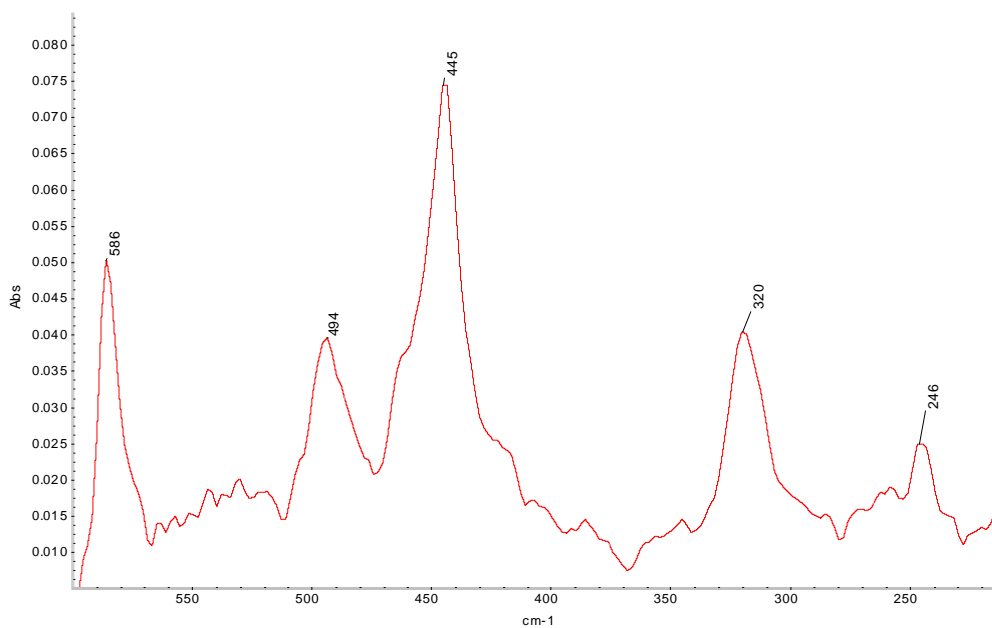


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH8 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace při 308 cm^{-1}) a Cu–O koordinaci molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 432 cm^{-1}). [124,125].

[Cu(gem)₂]₂·H₂O (PH9)

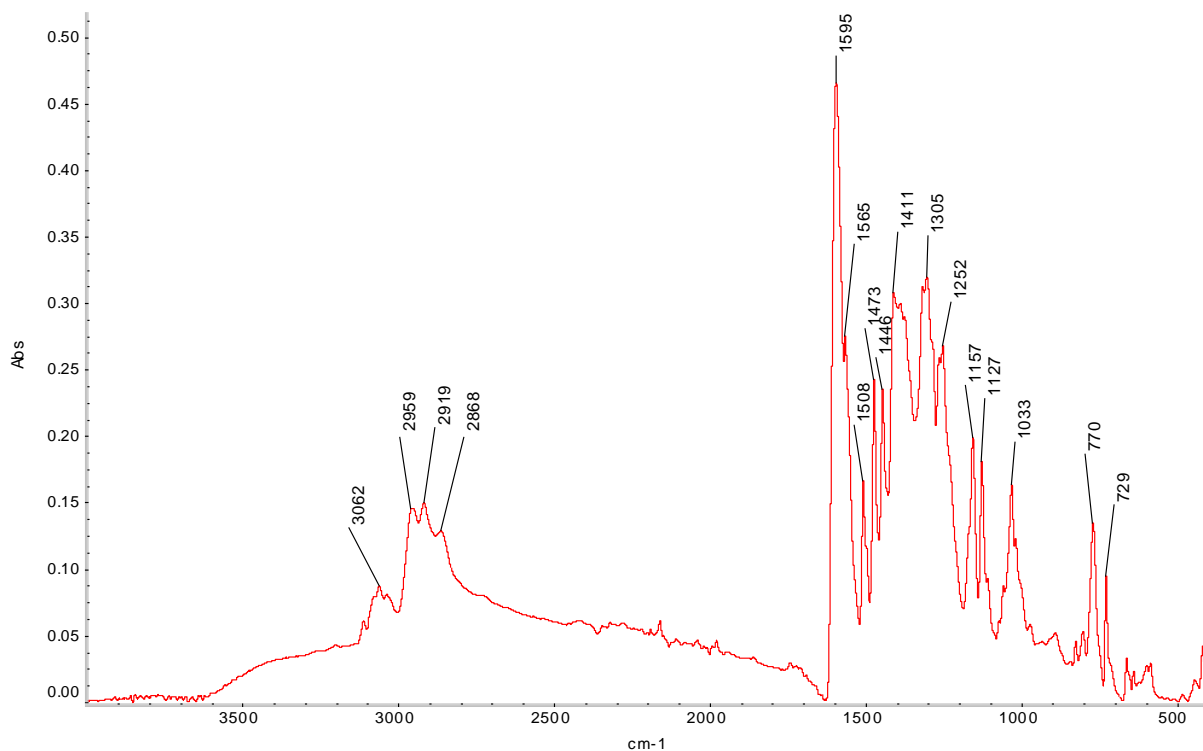


Výsledky IR spektroskopie komplexu PH9 ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylátu při 1578 (asymetrické) a 1474 cm⁻¹ (symetrické). Z rozdílu jejich vlnočtů se dá usoudit, že se jedná o acetátový typ [124]. Dále skupina píků 2951, 2925 a 2861 cm⁻¹ náleží valenčním $\nu(\text{CH})$ vibracím alifatických skupin. $\nu(\text{OH})$ vibracím molekul vody je možné přiřadit 3401 cm⁻¹. Deformačním $\delta(\text{CH})$ vibracím náleží píky při 1155, 1128 a 1036 cm⁻¹. Chybějící vibrace aromatického kruhu 2,2'-bipyridinu v okolí 1440 a 3100 cm⁻¹ naznačuje, že v látce chybí nebo se v ní nachází ve velmi malém množství [126,129].

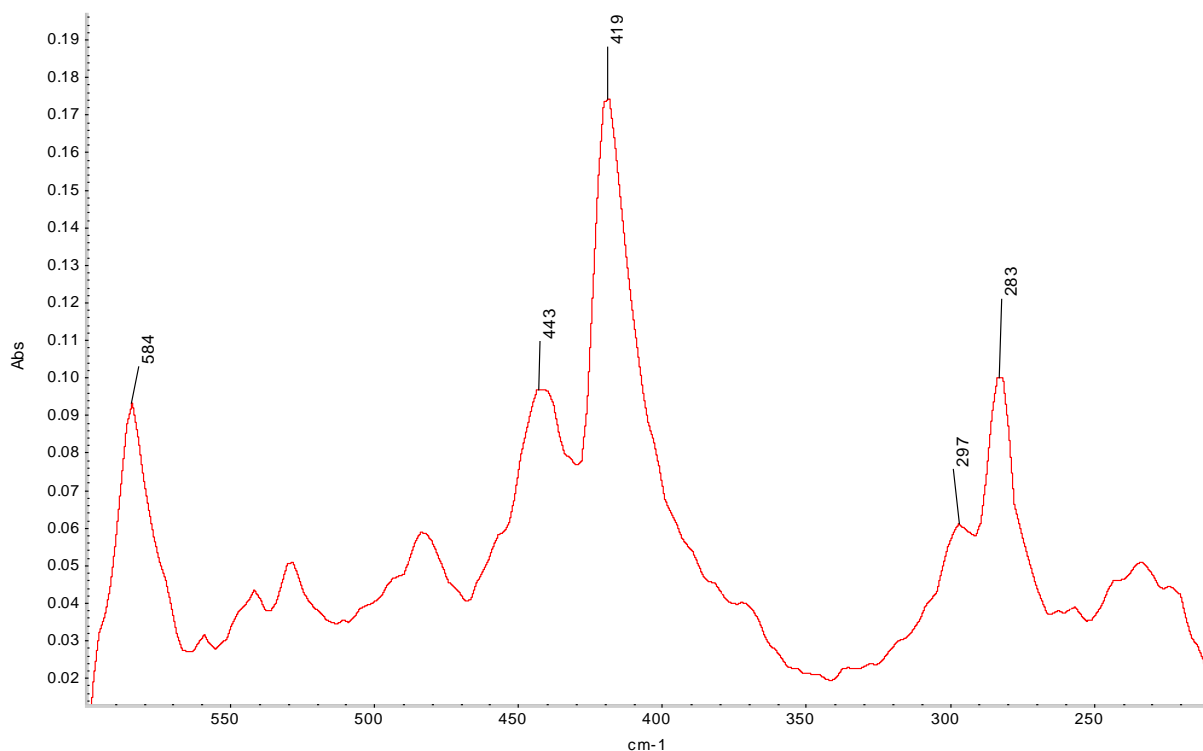


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH9 ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–O koordinaci molekuly vody (valenční vibrace Cu–O v oblasti 445 cm^{-1}) [124,125].

[Cu(bpy)(gem)]NO₃·H₂O (PH9')



Výsledky IR spektroskopie komplexu PH9' ve střední oblasti spektra potvrdily přítomnost valenčních vibrací karboxylátu při 1595 (asymetrické) a 1473 cm^{-1} (symetrické). Z rozdílů jejich vlnočtů se dá usoudit, že se jedná o acetátový typ [124]. Dále skupina píků 2959, 2919 a 2868 cm^{-1} náleží valenčním $\nu(\text{CH})$ vibracím alifatických skupin. $\nu(\text{CH})$ vibracím aromátu 2,2'-bipyridinu je možné přiřadit 3062 a 1446 cm^{-1} . Deformačním $\delta(\text{CH})$ vibracím gemfibrozilu náleží píky při 1157, 1127 a 1033 cm^{-1} [126,129].

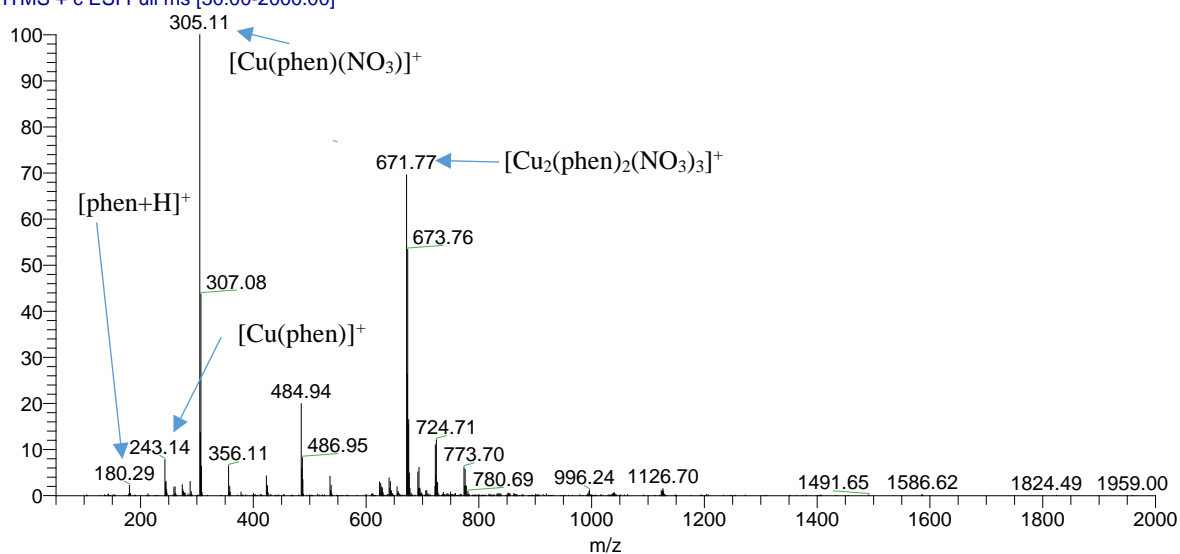


Výsledky FT-IR spektroskopie komplexu PH9⁺ ve Far oblasti naznačují na tvorbu koordinační vazby Cu–N (valenční vibrace při 283 a 297 cm⁻¹) a Cu–O koordinaci molekul vody (valenční vibrace Cu–O při 419 cm⁻¹) [124,125].

5.1.2. Hmotnostní spektrometrie

[Cu(phen)](NO₃)₂·2H₂O (PH1)

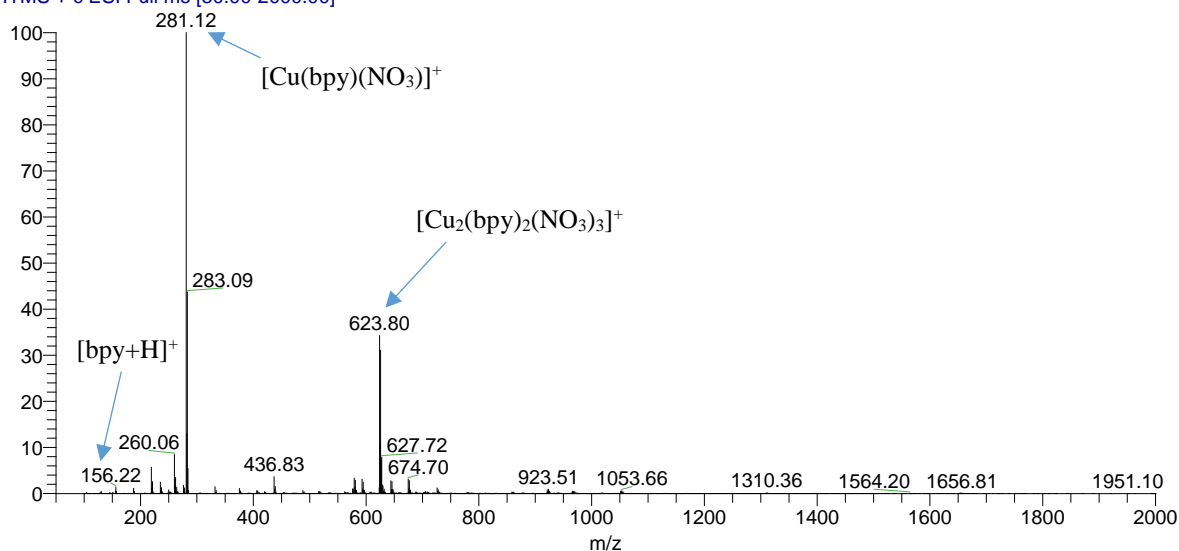
PH1+ #10 RT: 0.14 AV: 1 NL: 1.64E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanolického roztoku PH1 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících jak molekule phen ligandu (při m/z 180.29 odpovídající protonizované molekule 1,10-fenanthrolinu), tak částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 243.14 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{phen})]^+$, při m/z 305.11 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{NO}_3)]^+$ nebo při m/z 671.77 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{NO}_3)_3]^+$.

$[\text{Cu}(\text{bpy})](\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PH2)

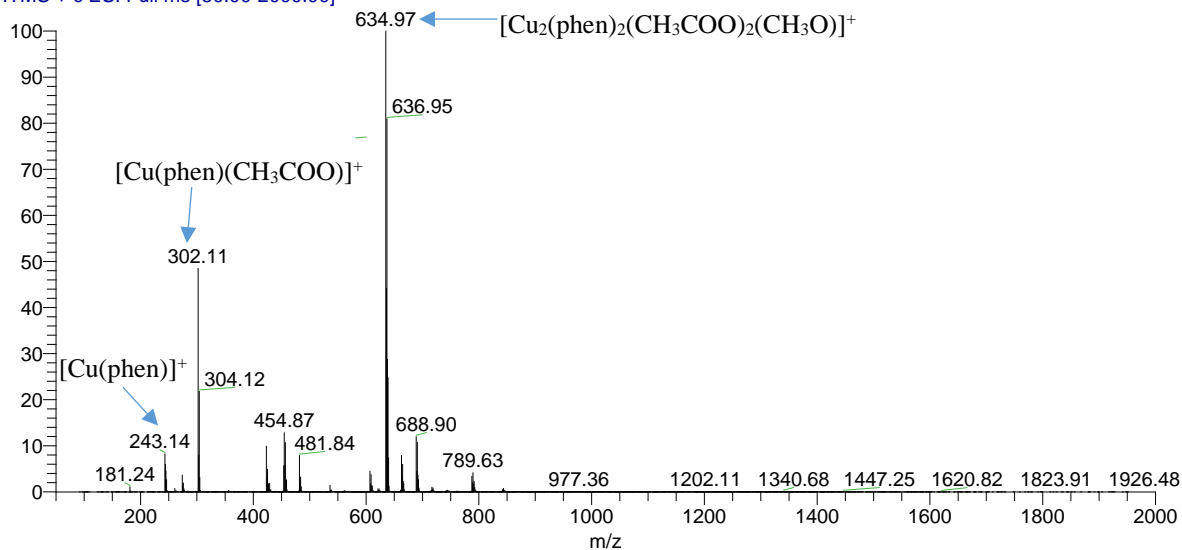
PH2+ #3-10 RT: 0.05-0.16 AV: 8 NL: 1.65E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanolického roztoku PH2 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících jak molekule bpy ligandu (při m/z 156.22 odpovídající protonizované molekule 2,2'-bipyridinu), tak částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 281.12 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{NO}_3)]^+$ nebo při m/z 623.80 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{NO}_3)_3]^+$.

[Cu(phen)](CH₃COO)₂·0,5H₂O (PH5)

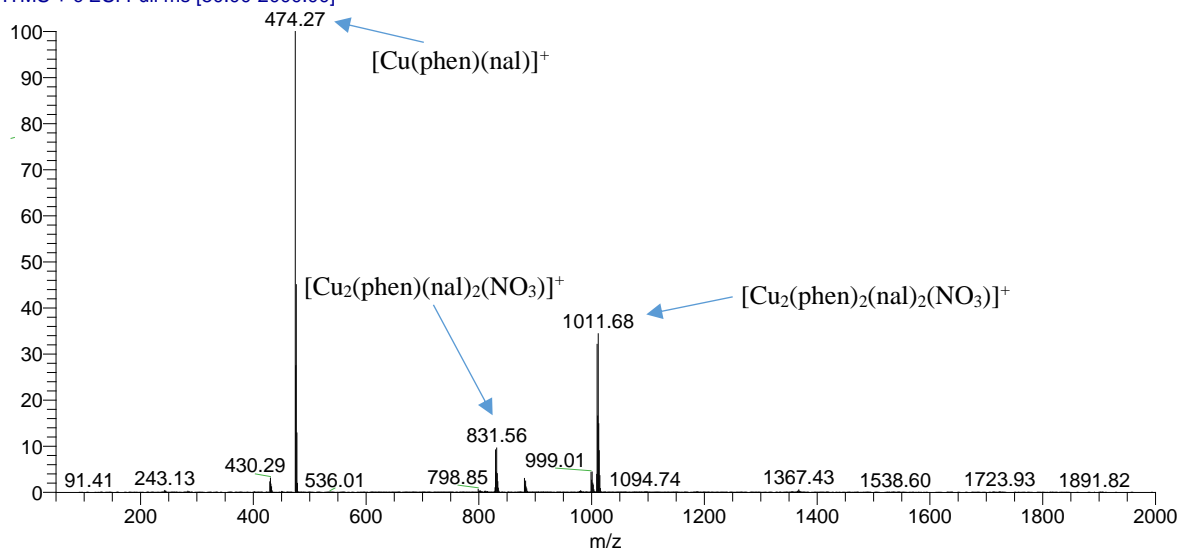
PH5+ #4-21 RT: 0.06-0.28 AV: 18 NL: 3.03E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanického roztoku PH5 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 243.14 odpovídající částici [Cu(phen)]⁺, při m/z 302.11 odpovídající částici [Cu(phen)(CH₃COO)]⁺, nebo při m/z 634.97 odpovídající částici [Cu₂(phen)₂(CH₃COO)₂(CH₃O)]⁺.

[Cu(phen)(nal)](NO₃)·H₂O (PH3)

PH3+ #3-8 RT: 0.05-0.13 AV: 6 NL: 5.97E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

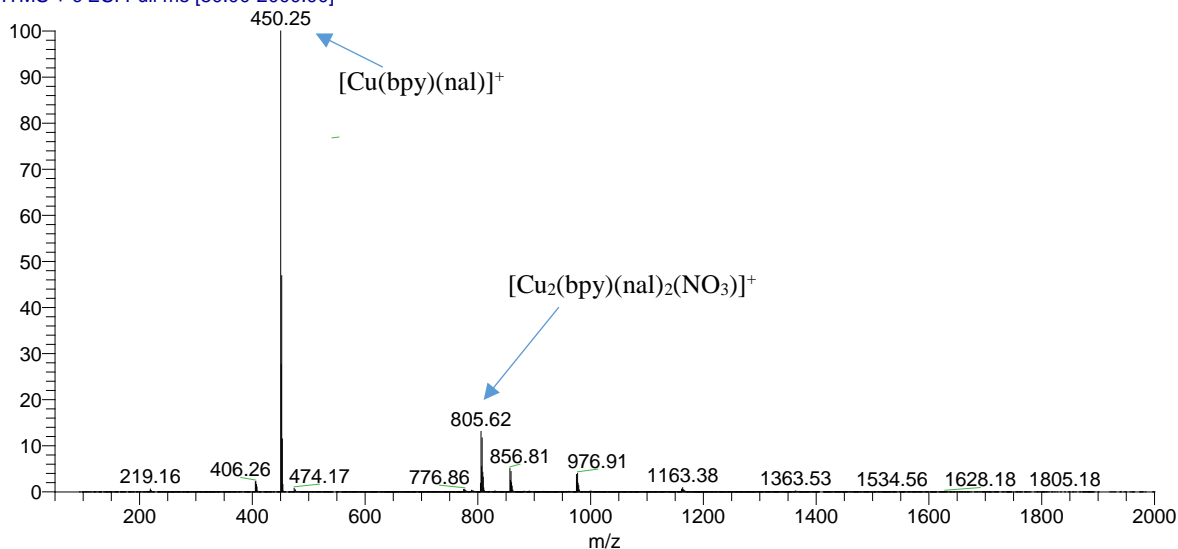


Analýza methanického roztoku PH3 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů

odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 474.27 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{nal})]^+$, při m/z 831.56 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{phen})(\text{nal})_2(\text{NO}_3)]^+$, nebo při m/z 1011.68 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{nal})_2(\text{NO}_3)]^+$.

$[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{nal})](\text{NO}_3) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (PH4)

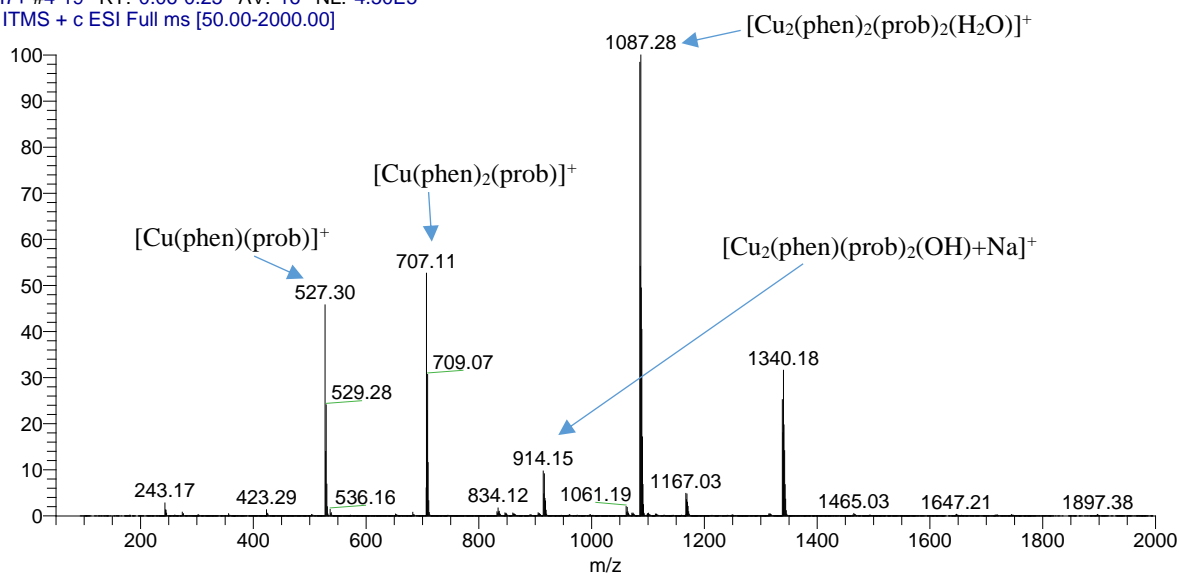
PH4+ #4-19 RT: 0.07-0.26 AV: 16 NL: 5.52E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanolického roztoku PH4 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 450.25 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{nal})]^+$ nebo při m/z 805.62 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{bpy})(\text{nal})_2(\text{NO}_3)]^+$.

[Cu(phen)(prob)₂]₂·2H₂O (PH7)

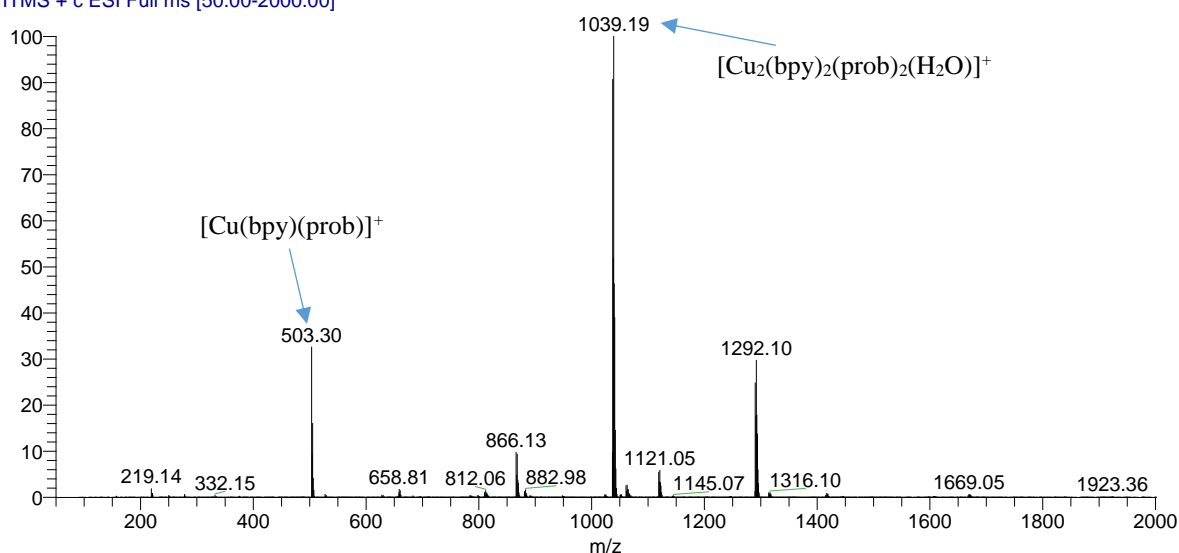
PH7+ #4-19 RT: 0.06-0.25 AV: 16 NL: 4.50E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanického roztoku PH7 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 527.30 odpovídající částici [Cu(phen)(prob)]⁺, při m/z 707.11 odpovídající částici [Cu(phen)₂(prob)]⁺ a při m/z 1087.28 odpovídající částici [Cu₂(phen)₂(prob)₂(H₂O)]⁺.

[Cu(bpy)(prob)₂]₂·H₂O (PH6)

PH6+ #4-20 RT: 0.05-0.25 AV: 17 NL: 5.42E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

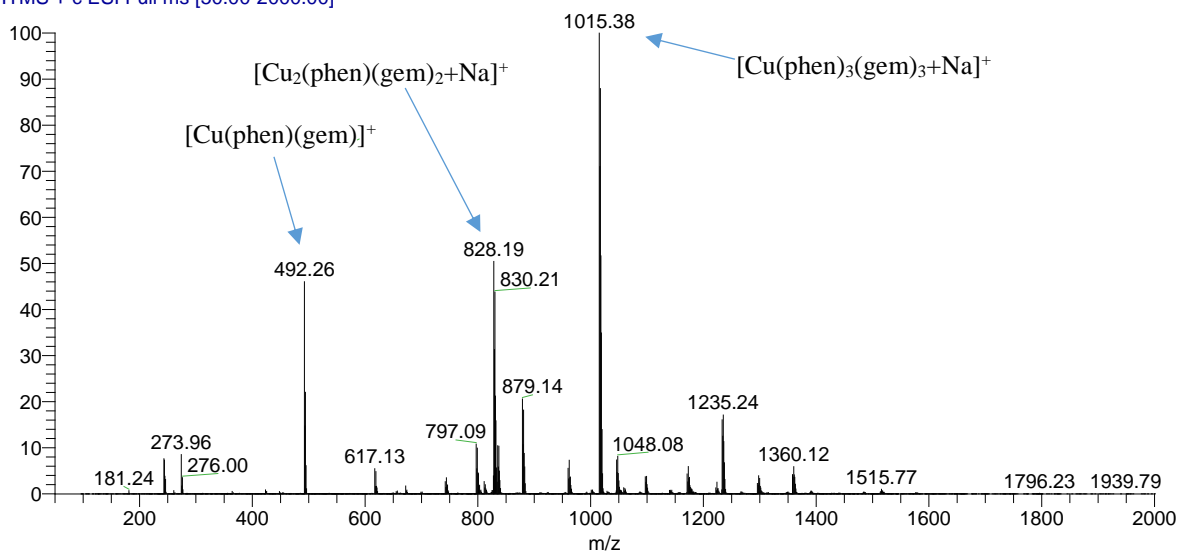


Analýza methanického roztoku PH6 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů

odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 503.30 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{prob})]^+$ nebo při m/z 1039.19 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{prob})_2(\text{H}_2\text{O})]^+$.

$[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gem})]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PH8)

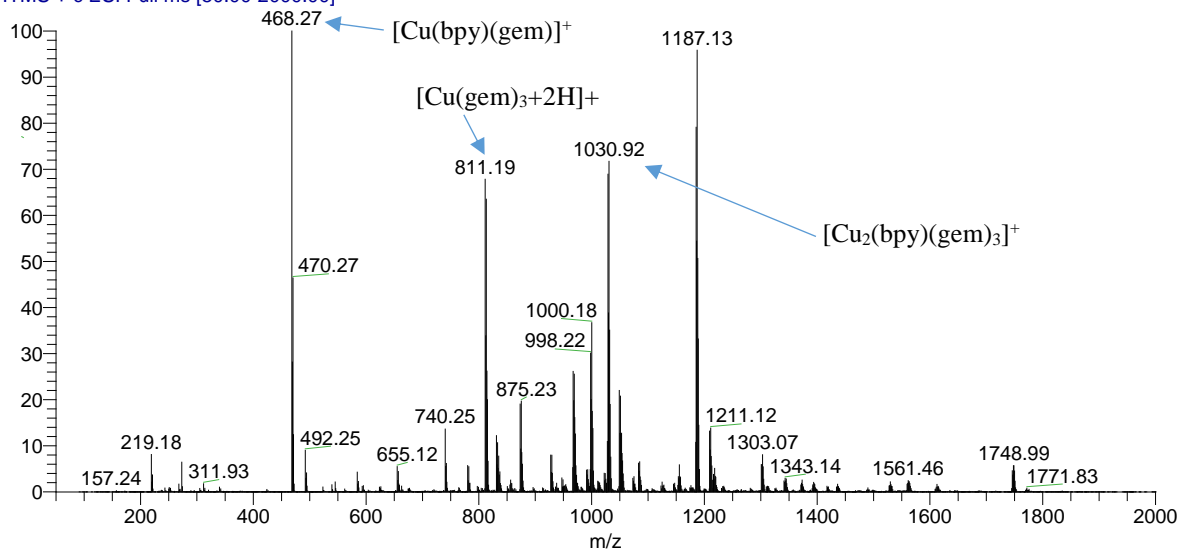
PH8+ #4-20 RT: 0.06-0.26 AV: 17 NL: 3.36E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanického roztoku PH8 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 492.26 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gem})]^+$, při m/z 828.19 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{phen})(\text{gem})_2+\text{Na}]^+$ nebo při m/z 1015.38 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{phen})_3(\text{gem})_3+\text{Na}]^+$.

[Cu(gem)₂]₂·H₂O (PH9)

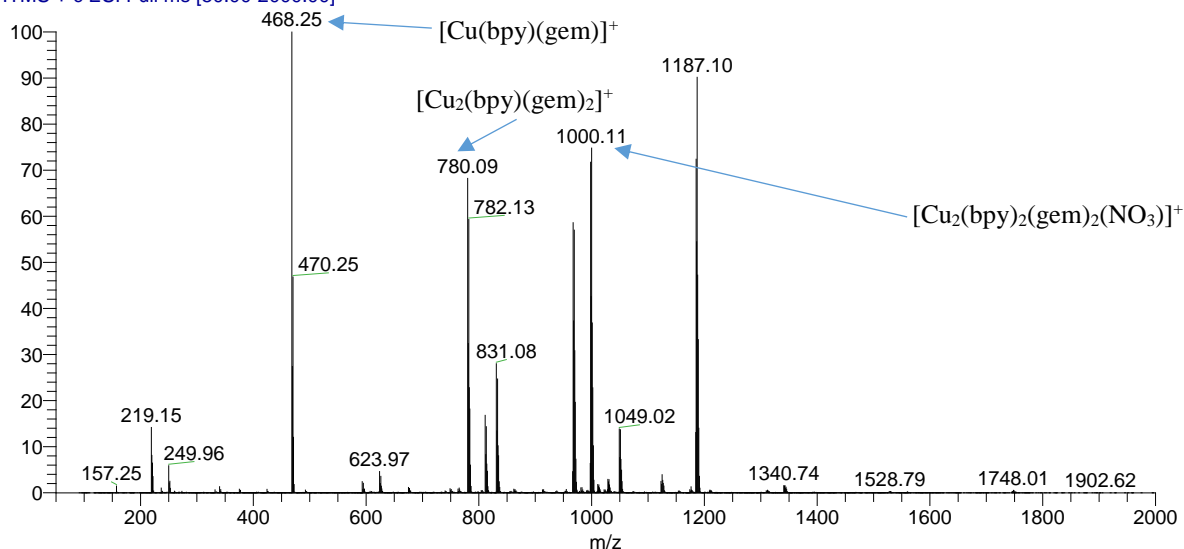
PH9+ #4-19 RT: 0.06-0.25 AV: 16 NL: 7.56E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]



Analýza methanického roztoku PH9 (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 468.27 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{gem})]^+$, při m/z 811.19 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{gem})_3+2\text{H}]^+$ nebo při m/z 1030.92 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{gem})_3]^+$. Přítomnost 2,2'-bipyridinu v MS spektru naznačuje, že látka obsahuje více komplexních částic, než pouze navržený $[\text{Cu}(\text{gem})_2]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$.

[Cu(bpy)(gem)]NO₃·H₂O (PH9')

PH9'+ #4-20 RT: 0.06-0.26 AV: 17 NL: 1.86E5
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

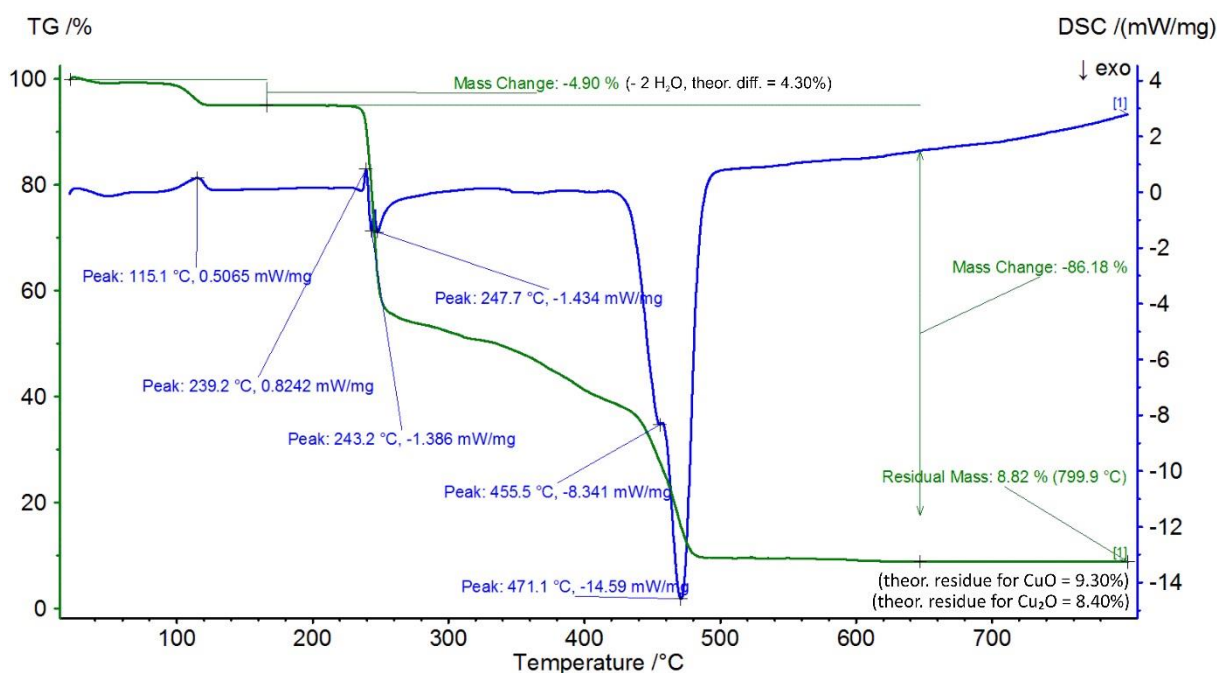


Analýza methanolického roztoku PH9⁺ (ca. 1mg/ml) pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI+MS) odhalila přítomnost signálů odpovídajících částic potvrzujících vznik koordinační sloučeniny, např. při m/z 468.25 odpovídající částici $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{gem})]^+$, při m/z 780.09 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{bpy})(\text{gem})_2]^+$ nebo při m/z 1000.11 odpovídající částici $[\text{Cu}_2(\text{bpy})_2(\text{gem})_2(\text{NO}_3)]^+$.

5.2. TGA/DSC analýza vybraných látek

Vybrané produkty, každý reprezentující jinou skupinu nových ternárních měďnatých komplexů, obsahujících ve své struktuře některý ze známých inhibitorů MDR proteinů byly charakterizovány také pomocí TGA/DSC analýzy v rozsahu teplot 20–800 °C. Tyto analýzy nám posloužily k popisu dějů spojených s termickým rozkladem připravených látek, zejména pak odhadnout kolik molekul vody je vázáno v příslušném komplexu a jaká je pravděpodobně povaha této vazby.

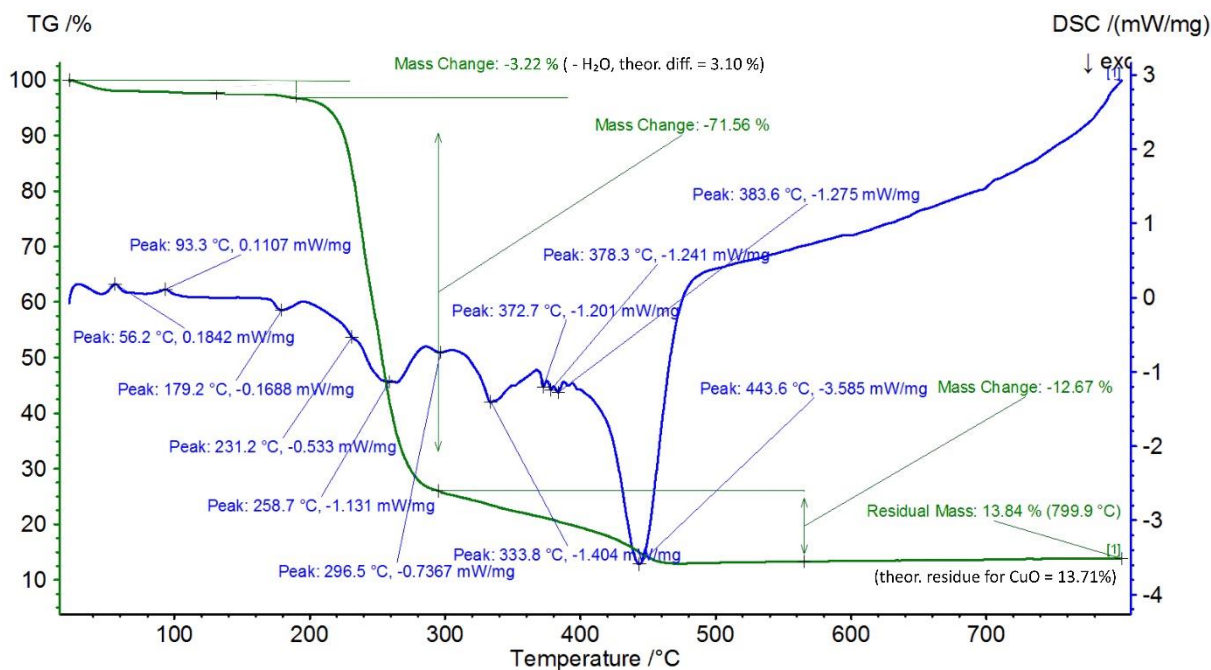
$[\text{Cu}(\text{phen})(\text{prob})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PH7)



Vyhodnocením TGA/DSC záznamu termického rozkladu komplexu PH7 bylo možno identifikovat proces dehydratace dvou molekul vody probíhající při 115 °C, t.j. jedná se pravděpodobně o solvátové molekuly vázané v rámci krystalové mřížky. Dále pak byl pozorován exotermický proces rozkladu organických ligandů v rozmezí teplot 239 °C–471 °C

za vzniku termicky stabilního produktu, jež je pravděpodobně směsí oxidů měďnatého a měďného.

[Cu(bpy)(gem)]NO₃·H₂O (PH9‘)



Vyhodnocením TGA/DSC záznamu termického rozkladu komplexu PH9 bylo možno identifikovat proces postupné dehydratace, probíhající od 56 °C až do 179 °C, která s ohledem na kombinaci dvou endo-efektů a jednoho exo-efektu neprobíhá jednoduchým mechanismem, hmotnostní rozdíl ale odpovídá teoretické ztrátě jedné molekuly vody. Se zvyšující se teplotou pak dále probíhá složitý exotermický proces rozkladu organických ligandů v rozmezí teplot 231 °C–443 °C za vzniku termicky stabilního produktu, jímž je pravděpodobně oxid měďnatý.

6. Závěr

Předložená bakalářská práce se zabývá v obecné rovině MDR proteiny zprostředkujícími rezistenci vůči široké škále léčiv, tzv. multi-drug rezistenci, historií jejich objevu a vývoje jejich klasifikace a v neposlední řadě i látkami, které jsou inhibitory těchto transportních proteinů. Speciálním zaměřením práce bylo využití inhibitorů MDR proteinů jako synergicky působících látek, které v kombinaci s cytotoxicky účinným léčivem zvýší jeho efektivitu i v případě přítomnosti lékové rezistence. Tento hlavní princip byl pak aplikován v experimentální části na skupinu sedmi měďnatých ternárních komplexů, inspirovaných základní strukturou Casiopeinů, u nichž doplňkovými labilně vázanými ko-ligandy byly vybrány inhibitory MDR proteinů – kyselina nalidixová, probenecid a gemfibrozil. Tyto ligandy reprezentují skupinu aryl- a alkyl-karboxylových kyselin, jež se koordinují na centrální atom Cu(II) jako chelátové ligandy nebo můstkově ve formě acetátového typu koordinace, což vyplývá z výrazného posunu asymetrické vibrace karboxylové skupiny ve srovnání s nekoordinovaným ligandem. Analýzou hmotnostních spekter v methanolických roztocích komplexů bylo potvrzeno, že solvolýzou dochází ke vzniku bohaté škály intermediátů, jakož pravděpodobně i uvolnění karboxylátových ligandů. Vzhledem k tomu, že ze zmíněných sedmi ternárních měďnatých komplexů je pět komplexů v literatuře dosud nepopsaných a vzhledem k tomu, že mohou fungovat jako vhodné transportní systémy pro dopravu labilně vázaných inhibitorů MDR proteinů a zároveň i látky s cytotoxickým potenciálem působící na citlivé nádorové buňky, bylo by jistě velkou výzvou nejen dokončit kompletní fyzikálně-chemickou charakterizaci těchto látek, ale také otestovat jejich protinádorové působení v *in vitro* pokusu. Pevně věřím, že mi v případě úspěšného završení mého bakalářského studia bude umožněno pracovat v této výzkumné tématice i v rámci navazujícího studia.

Seznam použité literatury

1. Danø K. Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *BBA - Biomembr.* 1973;323(3):466–83.
2. Cheung L, Yu DMT, Neiron Z, Failes TW, Arndt GM, Fletcher JI. Identification of new MRP4 inhibitors from a library of FDA approved drugs using a high-throughput bioluminescence screen. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2015;93(3):380–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.11.006>
3. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr.* 1976;455(1):152–62.
4. Germann UA. P-glycoprotein - A mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer.* 1996;32(6):927–44.
5. Borst P, Schinkel AH. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. Vol. 13, *Trends in Genetics.* 1997. p. 217–22.
6. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* (80-). 1992;258(5088):1650–4.
7. Lincke CR, Smit JJM, Van der Velde-Koerts T, Borst P. Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus. *J Biol Chem.* 1991;266(8):5303–10.
8. Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson a, Dean M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet.* 1996;5(10):1649–55.
9. Kool M, De Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, Van Eijk MJT, Juijn JA, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(16):3537–47.
10. Tiwari AK, Sodani K, Dai C-L, Ashby CR, Chen Z-S. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011;12(4):570–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118094>
11. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. Vol. 92, *Journal of the National Cancer Institute.* 2000. p. 1295–302.
12. Gillet J-P, Efferth T, Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(2):237–62.
13. Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(16):10685–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099718>
14. Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. In: *Seminars in Cancer Biology.* 1997. p. 135–42.
15. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: Localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. Vol. 1461, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 1999. p. 377–94.
16. Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC. Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16)

- and increased levels of glutathione. *Cancer Res.* 1997;57(23):5238–42.
17. Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, et al. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med.* 1997;3(11):1275–9.
 18. Johnson DR, Finch RA, Ping Lin Z, Zeiss CJ, Sartorelli AC. The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*- and *mrp1*-deficient mice. *Cancer Res.* 2001;61(4):1469–76.
 19. Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D, Townsend AJ, et al. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* [Internet]. 1994;54(18):4833–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915193>
 20. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SPC, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* 1994;269(45):27807–10.
 21. Müller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, et al. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):13033–7.
 22. Zaman GJ, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995;92(17):7690–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 23. Versantvoort CHM, Broxterman HJ, Bagrij T, Scheper RJ, Twentyman PR. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer.* 1995;72(1):82–9.
 24. Loe DW, Almquist KC, Roger G, Cole SPC, Deeley RG. Membranes and Bioenergetics : Multidrug Resistance Protein (MRP) -mediated Transport of Leukotriene C and Chemotherapeutic Agents in Membrane Vesicles : DEMONSTRATION OF GLUTATHIONE-DEPENDENT VINCRISTINE TRANSPORT Multidrug Resistance Protein (MRP) -m. 1996;271(16):9675–82.
 25. Loe DW, Deeley RG, Cole SPC. Characterization of Vincristine Transport by the Mr 190 , 000 Multidrug Resistance Protein (MRP): Evidence for Cotransport with Reduced Glutathione Characterization of Vincristine Transport by the Mr 190 , 000 Multidrug Resistance Protein (MRP): Evid. Transport. 1998;4:5130–6.
 26. Renes J, Vries EGE De, Nienhuis EF, Jansen PLM. Chapter 4 ATP - and glutathione dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. 1999;681–8.
 27. Rappa G, Lorico A, Flavell RA, Sartorelli AC. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural produce toxins. *Cancer Res.* 1997;57:5232–7.
 28. Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 1999;59(11):2532–5.
 29. Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 1999;55(5):929–37.
 30. Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat

- multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem*. 1999;274(21):15181–5.
31. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JML, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1999;96(12):6914–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.12.6914>
 32. Belinsky MG, Dawson P a, Shchhaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, et al. Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol*. 2005;68(1):160–8.
 33. Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Uchiumi T. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J Biol Chem*. 2001;276(50):46822–9.
 34. Bohan A, Chen WS, Denson LA, Held MA, Boyer JL. Tumor necrosis factor α -dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36688–98.
 35. Zollner G, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S, et al. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol*. 2003;39(4):480–8.
 36. Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, et al. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J [Internet]*. 2003;371(Pt 2):361–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223295&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 37. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Zeng H, Kruh GD, et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res*. 2002;62(11):3144–50.
 38. Chen ZS, Lee K, Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33747–54.
 39. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2003;100(16):9244–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835412%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC170903>
 40. Rius M. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *AJP Gastrointest Liver Physiol [Internet]*. 2006;290(4):G640–9. Available from: <http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00354.2005>
 41. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas R V., et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med*. 1999;5(9):1048–51.
 42. Wielinga PR, Reid G, Challa EE, Heijden IVANDER, Deemter LVAN, Haas MDE, et al. Thiopurine Metabolism and Identification of the Thiopurine Metabolites Transported by MRP4 and MRP5 Overexpressed in Human Embryonic Kidney Cells. *Mol Pharmacol*. 2002;62(6):1321–31.
 43. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, et al. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2000;97(13):7476–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

44. McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23541–8.
45. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30069–74.
46. Belinsky MG, Kruh GD. MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer.* 1999;80(9):1342–9.
47. Kool M, Van Der Linden M, De Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 1999;59(1):175–82.
48. Struk B, Cai L, Zach S, Ji W, Chung J, Lumsden A, et al. Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(5):282–6.
49. Cuvillo F, Tellgren-Roth Å, Lara P, Ruud Selin F, Monné M, Bisaccia F, et al. Membrane insertion and topology of the amino-terminal domain TMD0 of multidrug-resistance associated protein 6 (MRP6). *FEBS Lett [Internet].* 2015;589(24):3921–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.030>
50. Belinsky MG, Chen Z, Shchhaveleva I, Mrp RP, Zeng H, Kruh GD. Characterization of the Drug Resistance and Transport Properties of Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6 , ABCC6) Characterization of the Drug Resistance and Transport Properties of Multidrug. 2002;6:6172–7.
51. Hopper E, Belinsky M, Zeng H, Tosolini A, Testa J. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new 2001;162:181–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16004004063344154637related:DVjJG-ekGd4J
52. Takayanagi S-I, Kataoka T, Ohara O, Oishi M, Kuo MT, Ishikawa T. Human ATP-binding cassette transporter ABCC10: expression profile and p53-dependent upregulation. *J Exp Ther Oncol [Internet].* 2004;4(3):239–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15724843>
53. Chen Z-S, Hopper-borge E, Belinsky MG, Shchhaveleva I, Kotova E, Kruh GD. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol.* 2003;63(2):351–8.
54. Hopper-Borge E, Chen Z-S, Shchhaveleva I, Belinsky MG, Kruh GD. Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10). *Cancer Res [Internet].* 2004;64(14):4927–30. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-3111>
55. Hopper-Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen ZS, Kruh GD. Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res.* 2009;69(1):178–84.
56. Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, Pastan I. MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med [Internet].* 2001;7(8):509–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11591886
57. Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, Keppler D. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal

- protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience*. 2006;137(4):1247–57.
58. Chen Z-S. Transport of Bile Acids, Sulfated Steroids, Estradiol 17-beta-D-Glucuronide, and Leukotriene C4 by Human Multidrug Resistance Protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* [Internet]. 2004;67(2):545–57. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.104.007138>
 59. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, et al. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29509–14.
 60. Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002;99(10):6997–7002. Available from: <http://www.pnas.org/content/99/10/6997.full>
 61. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen Z-S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* [Internet]. 2012;31(2):58–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098952%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3777468>
 62. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiol Rev* [Internet]. 2006;86(3):849–99. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00035.2005>
 63. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2002;71(1):537–92. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
 64. de Graaf D, Sharma RC, Mechetner EB, Schimke RT, Roninson IB. P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996;93(3):1238–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 65. Raghu G, Park SW, Roninson IB, Mechetner EB. Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes. *Exp Hematol*. 1996;24(10):1258–64.
 66. Drach J, Gsur a, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, et al. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood*. 1996;88(5):1747–54.
 67. Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM, et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(12):6924–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618515%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC22688>
 68. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci*. 2000;25(1):1–6.
 69. Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Pérez WY, Robey RW, Van de Laar A, et al. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res*. 2001;61(18):6635–9.
 70. Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren XQ, Sugimoto Y, et al. Transport of

- methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: Effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* 2003;63(14):4048–54.
71. Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, et al. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2003;9(9):3320–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12960118
 72. Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* 2002;62(17):5035–40.
 73. Maliepaard M, Van Gastelen MA, De Jong LA, Pluim D, Van Waardenburg RCAM, Ruevekamp-Helmers MC, et al. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 1999;59(18):4559–63.
 74. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 2005;7(1):E118–33.
 75. Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S-I, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol.* 2003;63(1):65–72.
 76. Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, et al. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58(7):1332–7.
 77. Boonstra R, Timmer-Bosscha H, van Echten-Arends J, van der Kolk DM, van den Berg A, de Jong B, et al. Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *Br J Cancer* [Internet]. 2004;90(12):2411–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15150577
 78. Davis W. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates cholesterol homeostasis and low-density lipoprotein receptor metabolism in N2a neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2011;1811(12):1152–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.07.010>
 79. Van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell.* 1996;87(3):507–17.
 80. Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: A physiological role for the *mdr2* gene. *Cell.* 1994;77(7):1071–81.
 81. Smith AJ, Van Helvoort A, Van Meer G, Szabó K, Welker E, Szakács G, et al. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23530–9.
 82. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, et al. Membrane transporters and channels: Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* 2004;64(12):4294–301.
 83. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2005;65(10):4320–33.

84. Childs S, Yeh RL, Ling V, Georges E. Identification of a Sister Gene to P-Glycoprotein. *Cancer Res.* 1995;55(10):2029–34.
85. Childs S, Yeh RL, Hui D, Ling V. Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1998;58(18):4160–7.
86. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. Vol. 5, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006. p. 219–34.
87. Leonard GD. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist* [Internet]. 2003;8(5):411–24. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.8-5-411>
88. Tsuruo T, Hamada H, Sato S, Heike Y. Inhibition of Multidrug-resistant Human Tumor Growth in Athymic Mice by Anti-P-glycoprotein Monoclonal Antibodies. *Japanese J Cancer Res.* 1989;80(7):627–31.
89. Slater LM, Murray SL, Wetzel MW, Sweet P, Stupecky M. Verapamil potentiation of VP-16-213 in acute lymphatic leukemia and reversal of pleiotropic drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;16(1):50–4.
90. Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Gupta S. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J Clin Invest.* 1986;77(4):1405–8.
91. Sonneveld P, Schoester M, De Leeuw K. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: Effect of cyclosporine on resistant tumor cells. *J Clin Oncol.* 1994;12(8):1584–91.
92. Goldman B. Multidrug resistance: Can new drugs help chemotherapy score against cancer? Vol. 95, *Journal of the National Cancer Institute.* 2003. p. 255–7.
93. Dantzig AH, Shepard RL, Law KL, Tabas L, Pratt S, Gillespie JS, et al. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1999;290(2):854–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411602>
94. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, König J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. Vols. 111–112, *Chemico-Biological Interactions.* 1998. p. 153–61.
95. Holló Z, Homolya L, Hegedüs T, Sarkadi B. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Lett.* 1996;383(1–2):99–104.
96. Wang S, Folkes A, Chuckowree I, Cockcroft X, Sohal S, Miller W, et al. Studies on pyrrolopyrimidines as selective inhibitors of multidrug-resistance-associated protein in multidrug resistance. *JMedChem.* 2004;47(6):1329–38.
97. Norman BH, Lander PA, Gruber JM, Kroin JS, Cohen JD, Jungheim LN, et al. Cyclohexyl-linked tricyclic isoxazoles are potent and selective modulators of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorganic Med Chem Lett.* 2005;15(24):5526–30.
98. Shukla S, Wu C-P, Ambudkar S V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters – present status and challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2008;4(2):205–23. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.4.2.205>
99. Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, Hasegawa H, Mitsunashi J, Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: Transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;60(6):789–97.
100. Limtrakul P, Chearwae W, Shukla S, Phisalpong C, Ambudkar S V. Modulation of function

- of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol Cell Biochem.* 2007;296(1–2):85–95.
101. Skupień K, Kostrzewa-Nowak D, Oszmiański J, Tarasiuk J. In vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Phyther Res.* 2008;22(5):689–94.
 102. Rocha G da G, Simões M, Oliveira RR, Kaplan MAC, Gattass CR. Effects of 3 β -acetyl TORMENTIC acid (3ATA) on ABCC proteins activity. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6757–71.
 103. Barry AL, Jones RN, Thornsberry C, Ayers LW, Gerlach EH, Sommers HM. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;25(5):633–7.
 104. Yu H, Kwok Y, Hurley LH, Kerwin SM. Efficient, Mg²⁺-dependent photochemical DNA cleavage by the antitumor quinobenzoxazine (S)-A-62176. *Biochemistry.* 2000;39(33):10236–46.
 105. Kljun J, Bratsos I, Alessio E, Psomas G, Repnik U, Butinar M, et al. New uses for old drugs: Attempts to convert quinolone antibacterials into potential anticancer agents containing ruthenium. *Inorg Chem.* 2013;52(15):9039–52.
 106. Lee SS, Jung OS, Lee CO, Choi SU, Jun MJ, Sohn YS. Cationic diamineplatinum (II) complexes of nalidixic acid. *Inorganica Chim Acta.* 1995;239(1–2):133–8.
 107. Arjmand F, Yousuf I, Hadda T Ben, Toupet L. Synthesis, crystal structure and antiproliferative activity of Cu(II) nalidixic acid-DACH conjugate: Comparative in vitro DNA/RNA binding profile, cleavage activity and molecular docking studies. *Eur J Med Chem [Internet].* 2014;81:76–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.080>
 108. Al-Khodir FAI, Refat MS. Synthesis, structural characterization and biological studies of some nalidixic acid-metal complexes: Metalloantibiotic complexes of some divalent and trivalent metal ions. *J Mol Struct [Internet].* 2015;1094:22–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.03.063>
 109. Mallants R, Van Oosterwyck K, Van Vaeck L, Mols R, De Clercq E, Augustijns P. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) affects hepatobiliary elimination but not the intestinal disposition of tenofovir disoproxil fumarate and its metabolites. *Xenobiotica.* 2005;35(10–11):1055–66.
 110. Zeng, Zhengzhi; Deng, Ruwcn; Wu, Jigui; Niu, Jinghai; Sun, Yifang; Zhang P. Ten metallic compounds of probenecid. *Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban.* 1985;21(2):76–81.
 111. Miller DB, Spence JD. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (Fibrates). *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(2):155–62.
 112. Yamazaki M, Li B, Louie SW, Pudvah NT, Stocco R, Wong W, et al. Effects of fibrates on human organic anion-transporting polypeptide 1B1-, multidrug resistance protein 2- and P-glycoprotein-mediated transport. *Xenobiotica.* 2005;35(7):737–53.
 113. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology.* 2001;120(2):525–33.
 114. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang W, et al. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. 1999;274(52):37161–8.

115. Michot JM, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Active efflux of ciprofloxacin from J774 macrophages through an MRP-like transporter. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2673–82.
116. McBryde, W.A.E.; Brisbin, D.A.; Irving H. The stability of metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part III. 5-Methyl-1,10-phenanthroline. *J Chem Soc.* 1962;5245–53.
117. Gasque L, Moreno-Esparza R, Ruiz-Ramírez L. Stability of ternary copper and nickel complexes with 1,10-phenanthroline. *J Inorg Biochem.* 1992;48(2):121–7.
118. Kwik WL, Ang KP, Chen G. Complexes of (2,2'-bipyridyl) copper(II) and (1,10-phenanthroline) copper(II) with some amino acids. *J Inorg Nucl Chem.* 1980;42(2):303–13.
119. Huang R, Wallqvist A, Covell DG. Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: Putative mode of action. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(7):1009–39.
120. Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Pavón N, Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(1):79–88.
121. Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(12):1979–89.
122. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 1999;15(1):269–90. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>
123. Mendoza-Díaz G, Martínez-Aguilera LMR, Perez-Alonso R, Solans X, Moreno-Esparza R. Synthesis and characterization of mixed ligand complexes of copper with nalidixic acid and (N-N) donors. Crystal structure of [Cu(Phen)(Nal)-(H₂O)]NO₃.3H₂O. *Inorganica Chim Acta* [Internet]. 1987;138:41–7. Available from: <http://www.e-journals.in/abstract.asp?Totarticle=801>
124. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds [Internet]. Vol. 85, Elements. 1986. 10-11 p. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470027320.s4104/full>
125. Wilde RE, Srinivasan TKK. Far-infrared and Raman studies of mono complexes of 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. *J Inorg Nucl Chem.* 1974;36(2):323–8.
126. Niven ML, Percy GC. The infrared spectra of the 2,2'-Bipyridine. *Transit Met Chem.* 1978;3:267–71.
127. Nabipour H, Sadr MH, Thomas N. Synthesis, controlled release and antibacterial studies of nalidixic acid–zinc hydroxide nitrate nanocomposites. *New J Chem* [Internet]. 2016;40(1):238–44. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NJ01737H>
128. Izquierdo-Lorenzo I, García-Ramos JV, Sanchez-Cortes S. Vibrational characterization and surface-enhanced Raman scattering detection of probenecid doping drug. *J Raman Spectrosc.* 2013;44(10):1422–7.
129. Gunasekaran S, Renuga Devi TS, Sakthivel PS. Qualitative and quantitative analysis on fibrates - A spectroscopic study. *Asian J Chem.* 2008;20(6):4249–68.