

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra anorganické chemie**



**BAKALÁRSKA PRÁCA**

**Kobaltité komplexy pre hypoxiou riadený transport biologicky  
aktívnych molekúl**

Autor: Klaudia Málíková

Študijný odbor: Bioanorganická chémia

Typ štúdia: Prezenčné

Vedúci práce: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Termín odovzdania práce: 30. 4. 2018

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu *Kobaltité komplexy pre hypoxiou riadený transport biologicky aktívnych molekúl* som napísala samostatne pod odborným vedením Ing. Ivana Nemca, Ph.D. Všetky použité literárne a iné odborné zdroje sú uvedené na konci práce. Ako autor tiež prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb. Súhlasím s tým, aby bola moja práca prístupná v knižnici Katedry anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dňa .....

.....

Klaudia Málíková

Rada by som poďakovala Ing. Ivanovi Nemcovi, Ph.D. za odborné vedenie, rady a trpezlivosť pri vypracovávaní mojej bakalárskej práce. Tiež sa chcem poďakovať kolektívu Katedry anorganickej chémie za príjemné pracovné prostredie a za pomoc s prevedením príslušných meraní a ich vyhodnotením, konkrétne pani Pavle Richterovej za prevedenie elementárnej analýzy, Mgr. Alene Klanicovej, Ph.D. za zmeranie a pomoc pri interpretácii infračervených spektier, RNDr. Bohuslavovi Drahošovi, Ph.D. za prevedenie a pomoc pri interpretácii NMR spektroskopii a cyklickej voltametrie. V neposlednej rade chcem poďakovať vedúcemu Katedry anorganickej chémie, Prof. RNDr. Zdeňkovi Trávníčkovi, Ph.D., za možnosť vypracovať predloženú prácu na pracovisku uvedenej katedry.

## **Bibliografická identifikácia:**

Meno a priezvisko autora: Klaudia Málíková

Názov práce: Kobaltité komplexy pre hypoxiou riadený transport biologicky aktívnych látok

Typ práce: Bakalárska

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

Vedúci práce: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

**Abstrakt:** Hypoxiou riadený transport biologicky aktívnych zlúčenín komplexmi kobaltu v oxidačnom stave III, ktoré sú vďaka svojim redoxným a kinetickým vlastnostiam schopné dopraviť bioaktívny ligand do nádorových buniek, kde sa ligand uvoľní. Cieľom tejto práce bolo nasyntetizovať a charakterizovať Co(III) komplexy s tetradentátnymi Schiffovými bázami ( $H_{23,5Cl}$ -salen a  $H_2$ nalén) a dichlóracetátovým ( $dca^-$ ) bioaktívnym ligandom. Boli pripravené 3 komplexy zloženia  $[Co(nalén)(dca)]$ ,  $[Co_2(nalén)_3]$  a  $[Co(3,5Cl-salen)(dca)_2Ag]_2 \cdot 2(CH_3)_2CO$ , ktoré boli následne charakterizované pomocou elementárnej analýzy, NMR a IČ spektrometrie, cyklickej voltametrie a RTG štruktúrnej analýzy.

Kľúčové slová: Co(III) komplexy; Schiffove bázy; hypoxia; syntéza; charakterizácia.

Počet strán: 57

Jazyk: Slovenčina

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Klaudia Málíková

Title: Cobalt(III) complexes for hypoxia-activated drug delivery

Type of thesis: Bachelor

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

Supervisor: Ing. Ivan Nemeč, Ph.D.

The year of presentation: 2018

**Abstract:** The hypoxia-activated drug delivery is associated with cobalt complexes in oxidation state III which, due to their redox and kinetic properties, are capable of transporting the bioactive ligands to the cancer cells, where they are released. The object of this work was to synthesize and characterize Co(III) complexes with tetradentate Schiff bases ( $H_23,5Cl$ -salen and  $H_2nalen$ ) and dichloroacetate ( $dca^-$ ) as a bioactive ligand. Three complexes  $[Co(nalen)(dca)]$ ,  $[Co_2(nalen)_3]$  and  $[Co(3,5Cl-salen)(dca)_2Ag]_2 \cdot 2(CH_3)_2CO$  were prepared and characterized by elemental analysis, NMR and IR spectrometry, cyclic voltammetry and X-ray structure analysis.

Keywords: Co(III) complexes; Schiff bases; hypoxia; synthesis; characterization.

Number of pages: 57

Language: Slovak

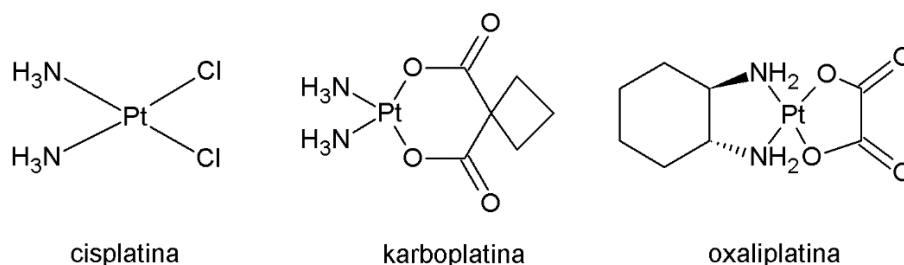
## OBSAH

1. ÚVOD.....	8
1.1. Ciele práce.....	9
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1. Kobalt .....	10
2.2. Vitamín B <sub>12</sub> .....	10
2.3. Biologicky aktívne komplexy Co <sup>III</sup> .....	11
2.3.1. Co <sup>III</sup> komplexy s antivirotickou aktivitou.....	12
2.3.2 Co <sup>III</sup> komplexy s antibakteriálnou aktivitou.....	14
2.3.3. Co <sup>III</sup> komplexy s protinádorovou aktivitou.....	19
2.4. Redoxné procesy v živých organizmoch.....	20
2.4.1. Oxidatívny stres.....	22
2.4.2. Fentonova reakcia.....	22
2.4.3. Hypoxia.....	23
2.4.4. Co <sup>III</sup> komplexy ako chaperóny bioaktívnych ligandov.....	25
2.4.4.1. Mustard agents.....	25
2.4.4.2. Kumarín a jeho deriváty.....	28
2.4.4.3. Dichlóracetát.....	30
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	32
3.1. Použité chemikálie.....	32
3.2. Charakterizácia použitých prístrojov.....	33
3.2.1. Elementárna analýza.....	33
3.2.2. NMR spektrometria.....	33
3.2.3. Infračervená spektrometria.....	34
3.2.4. Cyklická voltametria.....	35
3.2.5. Röntgenová štruktúrna analýza.....	35
3.3. Syntéza prekurzov.....	36
3.4. Syntéza komplexov s dca ligandom .....	38
4. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	41
4.1. Syntéza.....	41
4.2. Spektrálne a elektrochemické metódy.....	42
4.3. Kryštalová štruktúra.....	45

5. ZÁVER.....	48
6. POUŽITÁ LITERATÚRA.....	49

## 1. ÚVOD

Najväčší rozvoj medicínalnej anorganickej chémie bol spôsobený objavením využitia technécia ako kontrastnej látky v zobrazovacej diagnostike a protinádorovej aktivity zlúčeniny {cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]}, známej ako cisplatina, v 60. rokoch minulého storočia. [1] Prvé klinické testy protinádorovej aktivity cisplatiny (II) a cisplatiny (IV) preukázali ich inhibičnú aktivitu u sarkómu a leukémie u myši. [2] Cisplatina patrí dodnes k najpoužívanejším kancerostatikám. Je používaná na liečbu najmä rakoviny vaječníkov, krčka maternice, semenníkov, močového mechúra, hlavy, krku, pľúc, lymfómu a kolorektálneho karcinómu. Prišlo ku mnohým pokusom prípravy jej derivátov. Celosvetovo sú na trhu po klinickom testovaní z tisícok zlúčenín dve ďalšie, karboplatina a oxaliplatina. [3, 4]



Obrázok 1: Štruktúrne vzorce cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny

Aj napriek týmto dosiahnutým úspechom majú však tieto metaloterapeutiká niekoľko závažných negatív: účinkujú iba proti určitým typom nádorov, pričom niektoré z nich sú voči liečbe rezistentné a iné si môžu proti týmto liečivám vyvinúť rezistenciu počas liečby. Často sa vyskytujú veľmi vážne nežiaduce účinky ako napríklad nauzea, myelosupresia či toxicita obličiek. Preto je snahou a cieľom vedeckého výskumu dizajnovat' a pripraviť nové biologicky aktívne koordinačné zlúčeniny za použitia aj iných kovov než je platina ako centrálnych atómov, ktoré by nemali tieto nežiaduce účinky. Medzi najznámejšie patria zlúčeniny ruténia, zlata, gália, titánu a arzenu. [5]

Metaloterapeutiká sa však nevyužívajú len ako kancerostatiká, ale taktiež ako protizápalové liečivá, antibiotiká či antivirotiká. Auranoфин (2,3,4,5-tetra-O-acetyl-11-β-D-S-tioglukóza(trietylfosfin)zlatný komplex) obsahujúci zlato sa používa na liečbu reumatoidnej artritídy, paramagnetické komplexy rénia a gadolína sú používané, rovnako ako zlúčeniny technécia, v zobrazovacej diagnostike. Kobaltnaté a kobaltité zlúčeniny sú známe svojou



antibakteriálnou a antivirotickou aktivitou. Sú však skúmané aj ako potenciálne kancerostatiká, nesteroidné protizápalové lieky či zlúčeniny vhodné na zobrazovaciu diagnostiku. [6, 7]

### **1.1. Ciele práce**

Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo vypracovať literárnu rešerš týkajúcu sa transportu malých molekúl za pomoci kobaltitých komplexov za použitia rôznych literárnych zdrojov a najmä chemických databáz.

V druhej časti bola cieľom príprava kobaltitých komplexov zloženia  $[\text{Co}(\text{L}_4)(\text{Cl})(\text{L}_1)]$  heterocyklickými alebo karboxyláto ligandmi ( $\text{L}_1$ ) a s tetradentátными Schiffovými bázami ( $\text{L}_4$ ) odvodenými od kondenzácie derivátov salicylaldehydu s alifatickými diamínmi. Následne tieto zlúčeniny charakterizovať príslušnými analytickými metódami v spolupráci s vedúcim práce a ďalšími zamestnancami katedry anorganickej chémie.

## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. Kobalt

Kobalt je pomerne vzácny kov, tvoriaci približne 0,001% zemskej kôry. Bol objavený švédskym chemikom Georgom Brandtom v roku 1735. Patrí do VIII. vedľajšej skupiny periodickej sústavy prvkov. So svojim protónovým číslom 27 je zaradený do triády železa, kde leží medzi železom a nikelom. Nachádza sa v 4. perióde, takže jeho elektrónová konfigurácia je  $[\text{Ar}]4s^23d^7$ . Chemickými vlastnosťami je podobný železu, je však menej reaktívny. Je feromagnetický a je známy v 2 modifikáciách –  $\alpha$ -Co (hexagonálny), ktorý pri 417 °C prechádza na  $\beta$ -Co (kubický). Najvyšší oxidačný stav kobaltu je IV, tieto zlúčeniny však zatiaľ nenachádzajú veľký význam. V oxidačných stavoch I až -II je kobalt stabilizovaný  $\pi$ -akceptorovými ligandmi (CO,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{PMe}_3$ ) v organokovových zlúčeninách, napr. oktakarbonyl dikobaltu  $[\text{Co}_2(\text{CO})_8]$ . Najstabilnejšie oxidačné stavy kobaltu sú II a III, pričom väčšina kobaltitých zlúčenín je pripravená oxidáciou rovnakých alebo podobných zlúčenín  $\text{Co}^{\text{II}}$ . Binárnych zlúčenín  $\text{Co}^{\text{III}}$  je veľmi málo, napr.  $\text{CoF}_3$ ,  $\text{CoO}(\text{OH})$  či  $\text{Co}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ . [8, 9] Kobaltité komplexy  $d^6$  sú zvyčajne nízkospinové, oktaédrické a kineticky inertné. Komplexy  $\text{Co}^{\text{III}}$  zohrali dôležitú úlohu v oblasti koordinačnej chémie, pretože Alfréd Werner na nich na začiatku 20. storočia potvrdil svoju teóriu koordinácie, označil oxidačný stav kovu ako „primárnu valenciu“ a koordinačné číslo ako „sekundárnu valenciu“. Werner dokázal vďaka izomérii, že komplexy kobaltu so 6 ligandmi majú oktaédrické usporiadanie. Za svoje zistenia získal v roku 1913 Werner Nobelovu cenu za chémiu. [10]

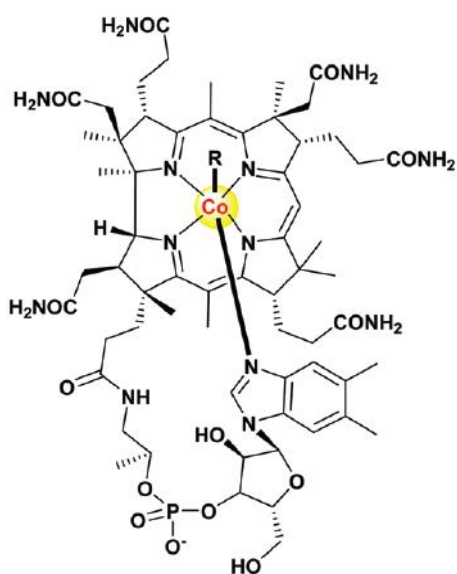
### 2.2. Vitamín B<sub>12</sub>

Kobalt je esenciálny stopový prvok, ktorý sa v ľudskom tele vyskytuje v koncentrácii len  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zohráva dôležitú úlohu v niekoľkých biologicky významných procesoch. V organizme sa nachádza prevažne vo forme kobalamínu (vitamínu B<sub>12</sub>). Oxidačný stav kobaltu v tejto molekule je +I, oxiduje sa však aj na +II či +III. Je to hexakoordinovaná molekula, pričom centrálny atóm je koordinovaný ekvatoriálne 4 atómami dusíku korínových kruhov a v axiálnej polohe 5,6-dimetylbenzimidazolom a buď kyanidovými, metanidovými alebo 5'-deoxyadenozidovými ligandmi. Korínové kruhy aj so substituentmi v ľavej časti molekuly obsahujú 6 chirálnych centier, v pravej časti sú 3 chirálne centrá. [11]

Štruktúra vitamínu B<sub>12</sub> bola určená pomocou röntgenovej kryštalografie Dorothy Hodgkinovou, za čo jej bola v roku 1964 udelená Nobelova cena za chémiu. V 1972 bola

publikovaná syntéza biomolekuly vitamínu B<sub>12</sub> Robertom Burnsom Woodwardom a Albertom Eschenmoserom. Celých 12 rokov skúmali viac ako 70 krokovú syntézu tzv. „cobyric acid“ (kobalt (2+); 3-[(1R, 2R, 3R, 4Z, 7S, 9Z, 12S, 13S, 14Z, 17S, 18S, 19R)-2, 13, 18-tris(2-amino-2-oxoetyl)-7, 12, 17-tris(3-amino-3-oxopropyl)-3, 5, 8, 8, 13, 15, 18, 19-oktametyl-2, 7, 12, 17-tetrahydro-1*H*-korín-21-id-3-yl]propánová kyselina), z ktorej bol vitamín B<sub>12</sub> pripravený už v 60. rokoch minulého storočia Konradom Bernhauerom. Táto látka vzniká aj degradáciou vitamínu B<sub>12</sub>. [12, 13, 14]

Rôzne formy molekuly B<sub>12</sub> sú nevyhnutné na tvorbu erytrocytov, DNA, reguláciu a udržiavanie mozgových a všeobecne nervových funkcií tela. Dnes už existujú aj dôkazy



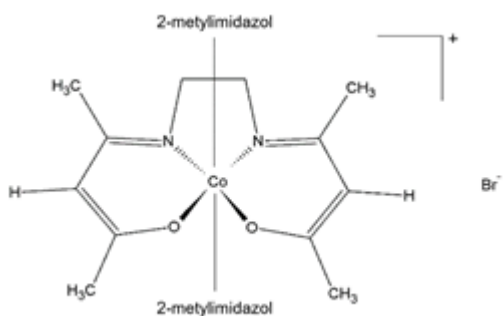
o dôležitosti kobalamínu pri syntéze mastných kyselín a metabolizme aminokyselín. V roku 1934 dostali Whipple H. G., Murphy W.P. a Minot G. R. Nobelovu cenu za objav liečby perniciózne anémie. Toto ochorenie je spôsobené nedostatčným vstrebávaním vitamínu B<sub>12</sub> z čriev. V surovej pečeni našli tzv. anti-perniziózne anemický faktor, preto bola následne používaná na liečbu tohto typu anémie. [4, 15, 16]

Obrázok 2: Štruktúrny vzorec kobalamínu – vitamínu B<sub>12</sub> (prevzaté z [4])

Kobalt má značne nižšiu mieru toxicity v porovnaní s neesenciálnymi kovmi akým je napr. aj platina. To je hlavnou motiváciou na výskum zlúčenín kobaltu ako menej toxických potenciálnych protinádorových a iných liečiv. [4]

### 2.3. Biologicky aktívne komplexy Co<sup>III</sup>

Klinický úspech chemoterapeutík na báze platiny a antireumatoidných liečiv na báze zlata spôsobili pokrok vo vývoji liečiv obsahujúcich ďalšie prechodné kovy. Tie, vrátane kobaltu, majú rozmanité koordinačné čísla, geometriu, oxidačné stavy a väzobné afinity ligandov. Doposiaľ najznámejším používaným liekom obsahujúcim atóm kobaltu je



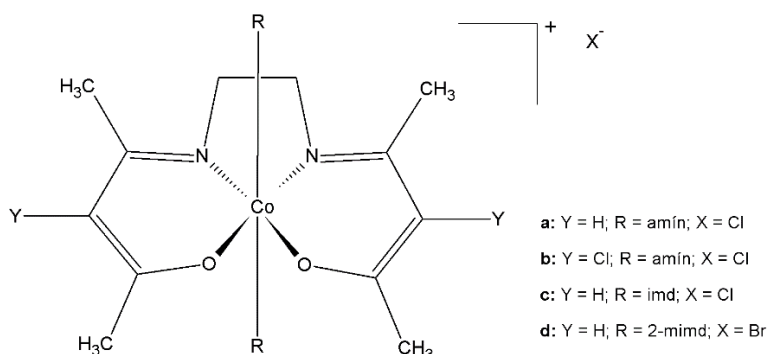
Doxovir<sup>TM</sup>, účinný proti vírusu Herpes simplex 1, ktorý je proti ostatným liekom rezistentný. [17] Je to komplex Co<sup>III</sup> so Schiffovou bázou (4,4'-(etán-1,2-diyldinitrilo)bis-pent-2-én-2-ol, kde axiálne polohy katiónu komplexu sú obsadené 2 aniónmi 2-metylimidazolu.

Obrázok 3: Štruktúra Doxoviru<sup>TM</sup>

Podľa širokého spektra potenciálnej biologickej aktivity môžeme rozdeliť zlúčeniny kobaltu do viacerých skupín, ktoré budú ďalej diskutované v texte tejto práce.

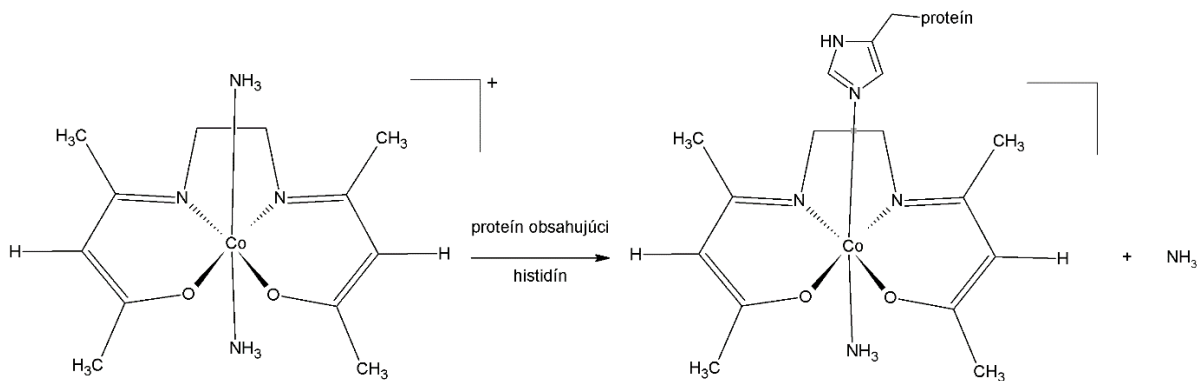
### 2.3.1. Co<sup>III</sup> komplexy s antivirotickou aktivitou

Zrejme najslubnejšou triedou Co<sup>III</sup> komplexov obsahujúcich N, O donorové ligandy je CTC (charge transfer complexes) skupina komplexov založená na chelatačnej tetradentátnej Schiffovej báze.



Obrázok 4: Štruktúra Co<sup>III</sup> komplexov CTC typu

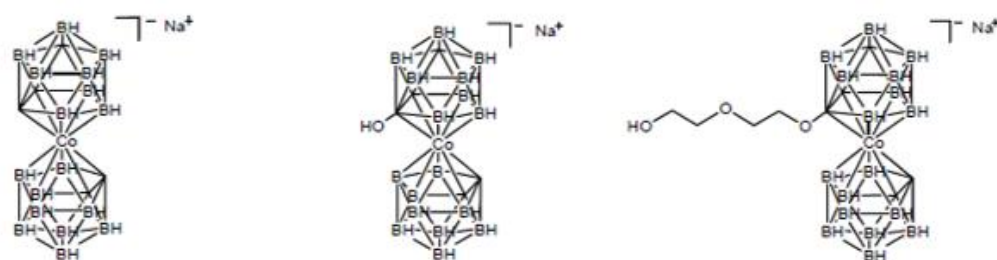
V roku 1998 bolo zistené, že CTC-96 komplex je účinný v liečbe epitelálnej herpetickej keratitídy, ktorá je jednou z najčastejších príčin slepoty v rozvojových krajinách. CTC komplexy sú známe svojou silnou väzbou na histidín, ktorý ak je naviazaný v axiálnej polohe tohto komplexu, tak zvyšuje jeho stabilitu. Ak je v axiálnej polohe chelátového komplexu naviazaný imidazol ako ligand, komplex je proti HSV-1 neaktívny. V 2006 však bola zistená aktivita týchto komplexov proti adenovírusu v modeloch bunkových línii. V súčasnosti sú tieto zlúčeniny zaujímavé vďaka svojmu potenciálu pri liečbe ľudského imunodeficientného vírusu typu 1 – HIV-1. Inhibujú totiž DNA proteín viažuci tzv. zinkový prst. [18, 19, 20, 21]



Obrázok 5: Interakcia proteínu obsahujúceho histidín s CTC komplexom

Ďalšou skupinou komplexov patriacich do triedy zlúčenín kobaltu s antivirotickou aktivitou sú komplexy tzv. „Wernerovského typu“ – napr. Cohex ([Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>). Na rozdiel od CTC komplexov, v ktorých sa axiálne naviazané ligandy ochotne vymieňajú za histidínový, Cohex zlúčeniny sú voči výmene ligandov inertné. [22, 23]

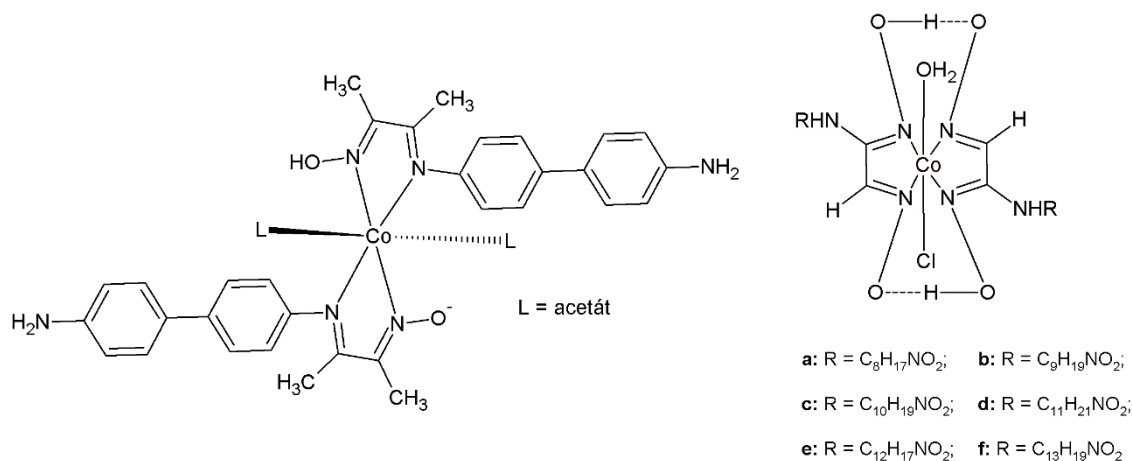
Karborány (klastre obsahujúce 12 bórov alebo uhlíkov), tzv. dikarbolidy, sú taktiež známe antivirotickými účinkami. Ide o typ sendvičovej zlúčeniny obsahujúcej kobaltitý centrálny atóm. Bis(1,2-karbolid) kobaltitý je známy ako potenciálne antivirotické liečivo špecificky pôsobiace proti HIV proteáze. Túto aktivitu preukazujú aj karborány obsahujúce kationy derivátov porfyrínu. [24, 25]



Obrázok 6: Štruktúra Co<sup>III</sup> karboránov inhibujúcich HIV proteázu (prevzaté z [26] a upravené)

### 2.3.2. Co<sup>III</sup> komplexy s antibakteriálnou aktivitou

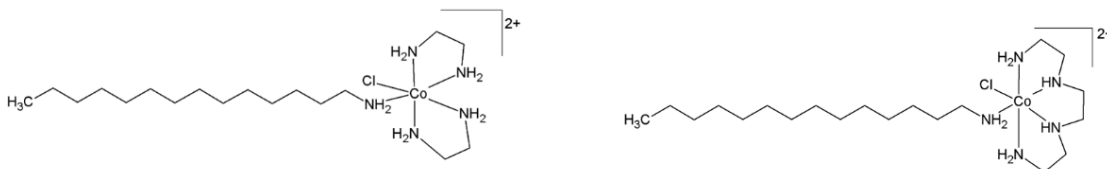
Skupinou komplexov, ktoré vykazujú antibakteriálne účinky sú zlúčeniny s hybridným ligandom (amín-imín-oxím), nasyntetizovaných kondenzáciou diacetylmonooxímu s benzidínom. Sú však účinné vždy len proti určitému druhu baktérií, napr. *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aeruginosa*, *Escherichia coli* či *Staphylococcus aureus*. Všetky tieto komplexy sú však v porovnaní s bežne používanými liečivami proti týmto baktériám menej účinné. [27]



Obrázok 7: Štruktúra Co<sup>III</sup> komplexov s oximovými ligandmi

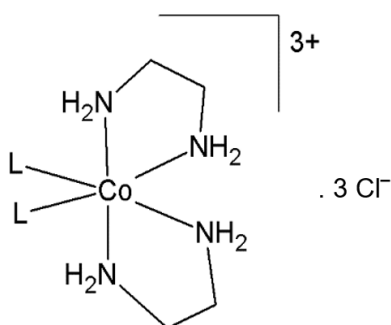
Antimikrobiálna aktivita bola preukázaná aj u Co<sup>III</sup> komplexov obsahujúcich rigidný bidentátny objemný N-ligand bis[N-(2, 6-diizopropylfenyl)imino]acenaftén (Pr-BIAN). Okrem antibakteriálnych účinkov, ktoré zlúčenina vykazuje vďaka objemnosti ligandu (spôsobuje vyššiu lipofilicitu komplexu) voči *Staphylococcus aureus* či *Escherichia coli* vykazujú tieto komplexy aj fungicídne vlastnosti. [28]

Komplexy Co<sup>III</sup> so surfaktantmi ako ligandmi vykazujú antibakteriálne vlastnosti porovnateľné, nie však rovnaké, s ciprofloxacínom (1-cyklopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazín-1-ylchinolín-3-karboxylová kyselina, antibiotikum patriace do skupiny fluorochinolínov). Kov s jeho primárnou koordinačnou sférou tvorí hlavnú skupinu a hydrofóbná časť jedného či viacerých ligandov predstavuje tzv. chvostovú skupinu. Metalosurfaktanty tvoria, rovnako ako ostatné povrchovo aktívne látky, vo vodnom roztoku pri špecifickej koncentrácii (CMC – critical micelle concentration) micely. Boli účinné proti gram-pozitívnym baktériám *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*, ako aj proti gram-negatívnym baktériám *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. [26, 29]



Obrázok 8: Štruktúra  $\text{Co}^{\text{III}}$  metalosurfaktantov obsahujúcich etyléndiamín a trietyléntetraamín ako ďalšie ligandy v koordinačnej sfére

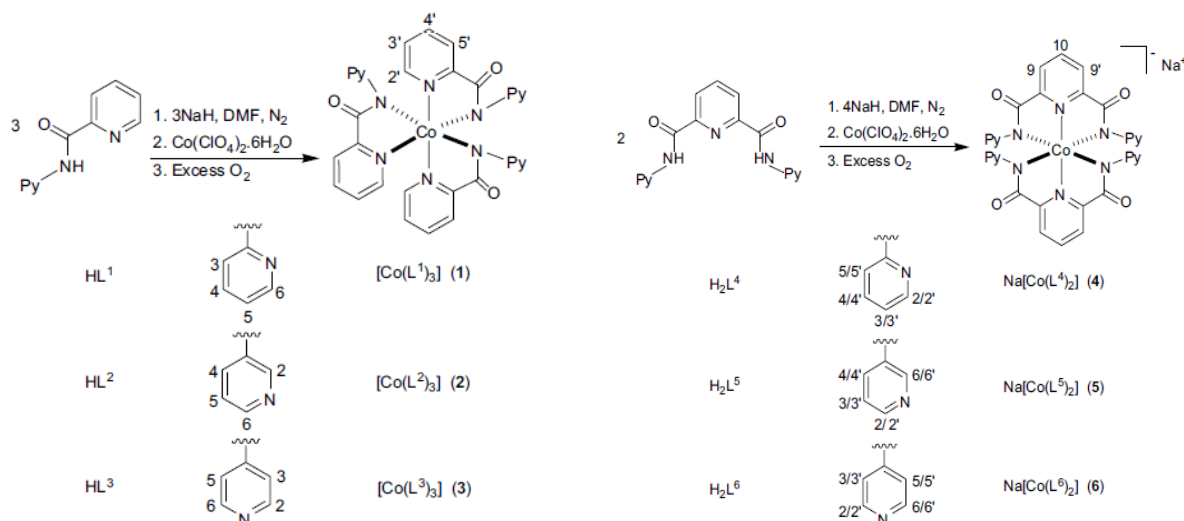
Ďalšou skupinou látok s antimikrobiálnou aktivitou sú kationové komplexy typu  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{L})]^{3+}$ , kde L môže byť bipyridín, 1,10-fenantrolín, imidazol, metylimidazol, etylimidazol, dimetylimidazol, urea, tiourea, acetamid, tioacetamid, semikarbazid, tiosemikarbazid či pyrazol. Tieto komplexy boli nasyntetizované nahradením chloridového ligandu v ľahko pripraviteľnej zlúčenine  $[\text{Co}(\text{en})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ . Komplexy vykazovali antibakteriálnu aktivitu proti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*



*aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Bacillus subtilis*. Komplex s 1,10-fenantrolínom vykazuje vyššiu aktivitu ako amficilín, streptomycín, gentamicín, chloramfenicol a ciprofloxacín.  $[\text{Co}(\text{en})_2\text{phen}]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{dmimd})_2]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{pyz})_2]\text{Cl}_3$  a  $[\text{Co}(\text{en})_2\text{bpy}]\text{Cl}_3$  komplexy sú aj potenciálne antimykotické činidlá. [26, 30]

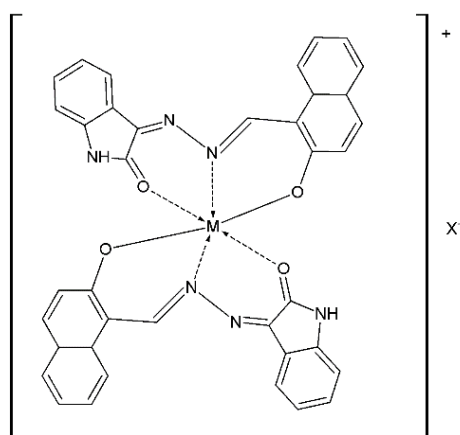
Obrázok 9: Štruktúra komplexov typu  $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{L})]\text{Cl}_3$

Neutrálne a aniónové komplexy s ligandmi na báze pyridín-amidu boli testované voči rezistentným kmeňom baktérií. Tieto komplexy preukazujú silnú aktivitu voči rezistentným kmeňom *Pseudomonas*, *Proteus* a *Escherichia coli* a voči štandardným kmeňom *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* a *Klebsiella planticola*. Ich účinnosť bola porovnávaná s antibiotikom gentamicínom. [31]



Obrázok 10: Štruktúra neutrálnych a aniónových komplexov s ligandmi na báze pyridín-amidu (N, N' chelátov) (prevzaté z [31] a upravené)

Komplexy  $\text{Co}^{\text{III}}$  obsahujúce tridentátne N, O, O' Schiffove bázy ako ligandy preukazujú antibakteriálnu aktivitu aj vďaka chelácii. Antibakteriálna aktivita týchto komplexov bola dokázaná na kmeňoch *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus magisterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Vibrio cholerae*. [32, 33] Chelácia, vo všeobecnosti u všetkých zlúčenín, značne redukuje polaritu kovových iónov, najmä kvôli

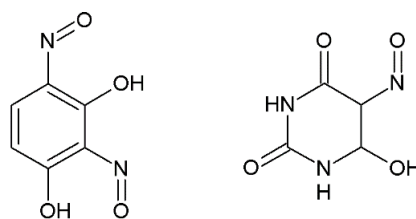


čiastočnému zdieľaniu jeho kladného náboja s donorovými skupinami a možnej delokalizácie  $\pi$ -elektrónov na celom chelátovom kruhu. Chelácia tiež zvyšuje lipofilný charakter chelátu, čím sa zlepšuje interakcia medzi kovovým iónom a lipidom. To by nebolo možné, ak by bola geometria a distribúcia náboja molekuly nekompatibilná s geometriou a distribúciou náboja okolo pórov bakteriálnych bunkových stien. [32]

Obrázok 11: Štruktúra oktaédrického  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexu s tridentátnou N, O, O' Schiffovou bázou ako ligandom

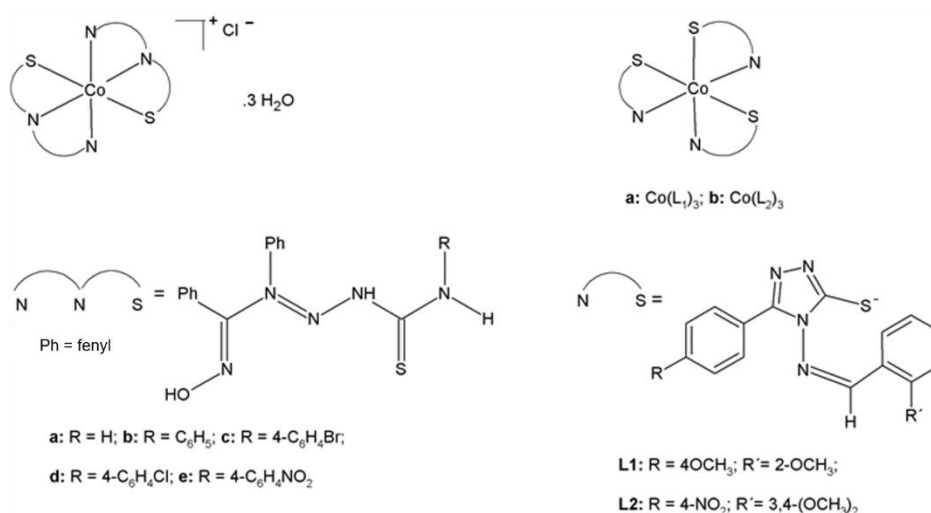
Kobaltité komplexy obsahujúce O, O' chelátové ligandy odvodené od dinitroresorcinolu a kyseliny violurónovej vykazujú biocídnu aktivitu voči kmeňom *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, druhom *Pseudomonas* či druhom *Serratia*. Účinnosť týchto komplexov je vyššia v porovnaní s voľnými ligandmi či soľami kovu. [26]





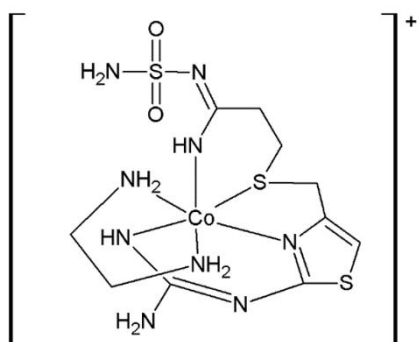
Obrázok 12: Štruktúry dinitroresorcinolu a violurónovej kyseliny ako príklady O, O' chelátových ligandov

Ďalšou skupinou vykazujúcou antibakteriálnu aktivitu sú komplexy obsahujúce v donorovej ligandovej sfére atóm síry. Prvým príkladom sú komplexy s bidentátnymi N, S či tridentátnymi N, N', S tiosemikarbazónovými ligandmi. Samostatné tiosemikarbazóny sa javia ako mierne toxické a neúčinnéjšie v porovnaní so samotným komplexom. Po ich komplexácii však vykazujú ako antibakteriálnu, tak aj fungicídnu aktivitu, ktorá je v tomto prípade ešte silnejšia ako baktericídna. Inhibičná aktivita, v porovnaní so streptomycínom, bola preukázaná voči kmeňom *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida tropicalis*. [26, 34, 35]



Obrázok 13: Štruktúry  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexov obsahujúcich bidentátne N, S a tridentátne N, N', S donorové ligandy

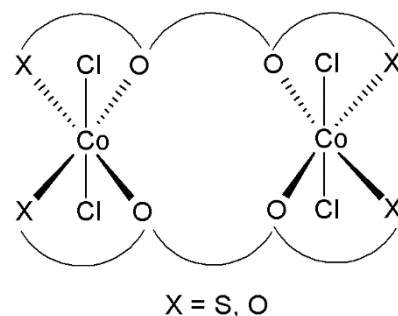
Famotidín, 3-[[[2-[(aminoiminometyl)amino]-4-tiazolyl]metyl]tio]-N-(aminosulfonyl),  $\text{H}_2$ -receptorový antagonist histamínu, má široké spektrum účinku, kam patrí aj napríklad liečba Zollinger-Ellisonovho syndrómu, Parkinsonovho či Alzheimerovho ochorenia. Preto majú komplexy  $\text{Pd}^{\text{II}}$ ,  $\text{Pt}^{\text{II}}$ ,  $\text{Ni}^{\text{II}}$  či  $\text{Cu}^{\text{II}}$  s famotidínom ako N, N', N'', S tetradentátnym ligandom



výborné predpoklady. Komplex famotidínu s  $\text{Co}^{\text{III}}$  inhibuje rast *Escherichia coli* a *Micrococca lysodeiketicus*, je však neaktívny voči kmeňom *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* a *Candida albicans*. [36]

Obrázok 14: Štruktúra  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexu obsahujúceho famotidín ako koordinovaný ligand

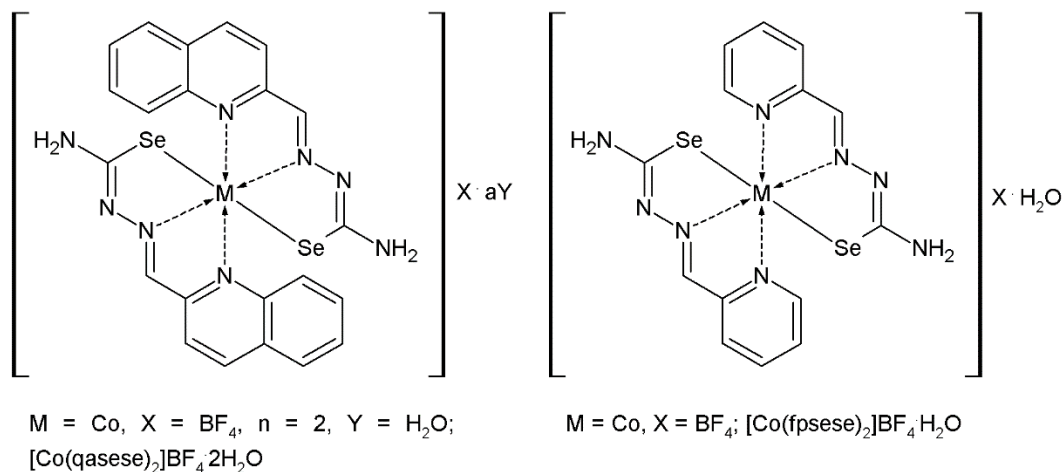
N, N'- bis(2-tiofénkarboxamido)-1,3-diaminopropán ako ligand poskytuje s  $\text{Co}^{\text{III}}$  dimérne komplexy vykazujúce antimikrobiálnu aktivitu. Voľný amid nevykazuje voči mikroorganizmom žiadnu aktivitu, zatiaľ čo po komplexácii inhibujú rast kmeňov *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis* a *Candida albicans*. Za jeho vyššiu antimikrobiálnu aktivitu v porovnaní s voľným amidom môže byť zodpovedný zvýšený lipofilný charakter komplexu kovu. Preniknutie komplexu cez lipidovú vrstvu bunkových membrán deaktivuje rôzne bunkové enzýmy, ktoré sú dôležité v metabolizme týchto mikroorganizmov.



[37]

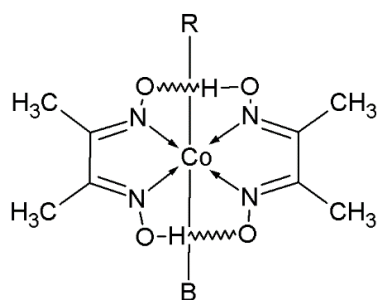
Obrázok 15: Schematické znázornenie dimérnej štruktúry komplexu  $\text{Co}^{\text{III}}$  s N, N'- bis(2-tiofénkarboxamido)-1,3-diaminopropánom ako ligandom

Selenosemikarbazóny alifatických a aromatických karbonylových zlúčenín môžu vystupovať v koordinačnej chémii ako mono alebo bidentátne ligandy. V prípade, ak je použitá na syntézu selenosemikarbazónov N-heterocyklická karbonylová zlúčenina, tak môže byť počet koordinačných miest navýšený vďaka prítomnosti atómu dusíku imino skupiny vzniknutej Schiffovej bázy. Biologická aktivita selenosemikarbazónov je v porovnaní s ich sírnymi analógmi (tiosemikarbazónmi) značne vyššia. Táto schopnosť je dokonca výrazne zvýšená po nakoordinovaní na d-prvok. Antimikrobiálna aktivita  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexov so selenosemikarbazónmi ako ligandmi bola preukázaná proti kmeňom *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeiketicus*, *Bacillus subtilis* a *Candida albicans*. [38]



Obrázok 16: Štruktúry komplexov  $\text{Co}^{\text{III}}$  so selenosemikarbazónmi vystupujúcimi ako ligandy

O komplexy  $\text{Co}^{\text{III}}$  s metanido ligandmi sa javí veľký záujem vďaka ich podobnosti modelu vitamínu  $\text{B}_{12}$ . Vďaka tomu bola popísaná aj štruktúra metylkobalamínu (MeCbl), ktorý katalyzuje premenu homocysteínu na metionín a ribonukleotidové reduktázy. Okrem katalýz sú organokobaloxímy využívané aj ako templáty v organickej syntéze. Inhibičná schopnosť



B = Py, DMPy, Ala a AME

týchto komplexov bola porovnávaná s antibiotikami tetracyklínom a bacitracínom. Všetky komplexy tohto typu vykazujú antibakteriálne vlastnosti, ako proti gram-pozitívnym, tak aj gram-negatívnym baktériám. V porovnaní s tetracyklínom sú však voči *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* rovnako účinné, voči *Bacillus subtilis* menej, a voči *Escherichia coli* najmenej účinné. [39]

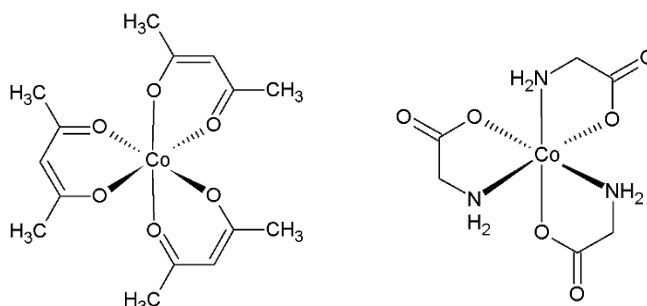
Obrázok 17: Štruktúra kobaloxímu s metanido ligandmi, kde R = alifatický C donorový ligand a B = Py (pyridín), DMPy (pyridín-2,6-dimetanol), Ala = alanín a AME = N-acetylmethionín

### 2.3.3. $\text{Co}^{\text{III}}$ komplexy s protinádorovou aktivitou

Vďaka už vyššie spomínanej nižšej toxicite kobaltu, v porovnaní s neesenciálnymi kovmi, ako je napríklad platina, sa vedci snažia dizajnovat' protinádorové liečivá obsahujúce ako centrálny atóm kobalt.

Prvý krát bola toxicita kobaltu skúmaná v roku 1952 Francisom Patrickom Dwyerom na vybraných komplexoch kobaltu, a to na trisacetylacetonáte kobaltitom, optických izoméroch

dusičnanu trisetyléndiamínkobaltitého, chloridu 1,8-bis(salicylidénamino)-3,6-ditiooxtánkobaltitého, jodidu 1,10-bis(salicylidénamino)-4,7-ditioodekánkobaltitého a trisglicínkobaltitom komplexe. Smrťiace dávky u myši boli pomerne vysoké pre všetky skúmané komplexy. Smrť bola spôsobená paralýzou a zlyhaním dýchacieho systému. [40, 41]



Obrázok 18: Vybrané štruktúry  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexov skúmaných F. P. Dwyerom

Vzhľadom na úzku súvislosť medzi protinádorovou aktivitou kobaltitých komplexov a hypoxiou budú konkrétne príklady typov kancerostatík a ich biologickej aktivity uvedené v nasledujúcej kapitole.

#### **2.4. Redoxné procesy v živých organizmoch**

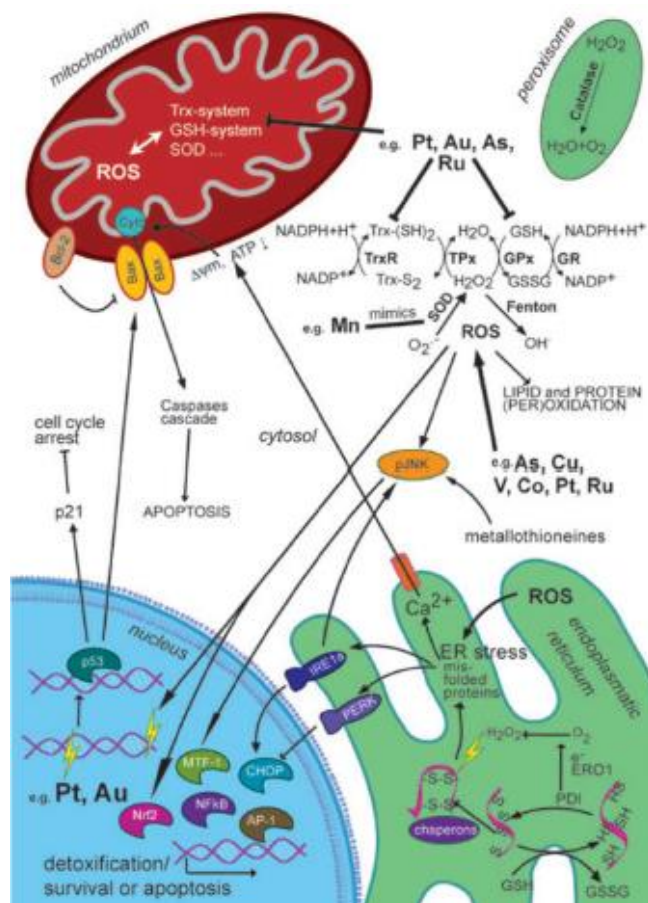
Ióny kovov sú schopné prechádzať z jedného oxidačného stavu do iného, čo je charakterizované hodnotou štandardných redoxných potenciálov medzi jednotlivými redoxnými párami. Avšak nie všetky oxidačné stavy sú kompatibilné s fyziologickými podmienkami v živých organizmoch. Redoxnými dejmi kovov môže prísť k narušeniu bunkovej redoxnej rovnováhy, preto je dôležitá jej striktná regulácia. [42, 43]

Rakovinové bunky majú odlišný metabolizmus od zdravých tkanív. V pevnom nádore je špecifické prostredie charakterizované vysokou metabolickou aktivitou, hypoxiou a všeobecne redukčným prostredím. V dôsledku toho je novým sľubným spôsobom liečby rakoviny interferencia s bunkovou redoxnou homeostázou nádorových buniek. [44]

Vytváranie ROS (reaktívnych foriem kyslíka) je fyziologickým procesom, ktorý má niekoľko dôležitých funkcií ako v metabolizme, tak v signálnej transdukcii (dôležitej pre proliferáciu, diferenciáciu a smrť bunky), regulácií bunkových funkcií či obranyschopnosti hostiteľa. Najvýznamnejšie formy ROS pre organizmus sú peroxid vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ , superoxid  $\text{O}_2^{\cdot-}$

a hydroxylový radikál (OH<sup>•</sup>), ktoré sa podieľajú na regulácii rôznych dráh signálnej transdukcie. [42, 45]

Mitochondrie, ako hlavné generátory ROS, sú najviac redoxne aktívnymi časťami bunky. Cytoplazma je naopak charakterizovaná ich nízkymi hladinami, teda menej redoxne aktívnym prostredím. Funguje ako redoxne tlmivá zóna medzi bunkovými organelami, zároveň však umožňuje špecifickú signalizáciu ROS. Vysoká reaktivita ROS spôsobuje ich nízku reguláciu potrebnú na prežitie buniek. S redoxnými dejmi preto súvisí mnoho ochorení, ktoré zahŕňajú ako niekoľko typov rakoviny, tak aj neurodegeneratívne ochorenia ako Alzheimerova či Parkinsonova choroba. Preto sa v organizme neustále udržiava homeostáza oxidantov a antioxidantov s rôznymi ROS produkujúcimi a degradujúcimi systémami v rôznych častiach bunky. Redoxná rovnováha môže byť v bunke udržiavaná enzymaticky (napr. superoxidodismutázami, katalázami, tioredoxínreduktázami, glutatiónreduktázami či glutatiónperoxidázami), alebo neenzymatickými antioxidantmi (napr. glutatión, tioredoxín a niektoré vitamíny). [42, 46, 47]



Obrázok 19: Hlavné interakčné miesta protinádorových metaloterapeutík redoxných dejov a oxidatívneho stresu v eukaryotickej bunke (prevzaté z [43])

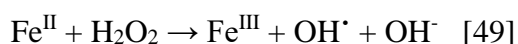
### **2.4.1. Oxidatívny stres**

Oxidatívnom stresom sa nazýva narušenie rovnováhy oxidantov a antioxidantov v prospech oxidačného prostredia. Zvýšené hladiny oxidatívneho stresu spôsobuje poškodenie a smrť buniek interferenciou s viacerými dôležitými molekulami bunky. ROS sa produkujú napríklad kvôli ožarovaniu, vystaveniu toxickým látkam, či látkam znečisťujúcim ovzdušie. Môžu byť dokonca produkované ako vedľajšie produkty enzymatických reakcií závislých na kyslíku niektorými intracelulárnymi metabolickými či signálnymi dráhami. Takýmito dráhami sú napríklad dýchací reťazec mitochondrií, oxidácia glukózy, cytochrómy P<sub>450</sub> či zloženie proteínov v endoplazmatickom retikule. Najvýznamnejšie poškodenia spôsobené ROS sú zlomy jedného vlákna DNA, mitochondriálna dysfunkcia spôsobená narušením vnútornej mitochondriálnej membrány a oxidácia cysteínových zvyškov na sulfénovú (SOH), sulfínovú (SO<sub>2</sub>H) či sulfónovú (SO<sub>3</sub>H) kyselinu, čo vedie k zmenám v sekundárnej štruktúre proteínov. To však nemusí viesť vždy ku bunkovej smrti. Genómová nestabilita a teda iniciácia či progresia nádoru sú spôsobené indukovaným poškodením DNA. Nízka hladina oxidatívneho stresu podporuje proliferáciu buniek a indukuje tak rôzne spôsoby ochrany a prežitia. [45, 47]

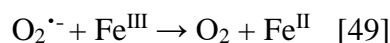
Prekonanie oxidatívneho stresu je možné len zbavením sa stresorov a predídením ničivým škodám. Transkripčné faktory sú preto ústrednými pre odpoveď na oxidatívny stres, pretože umožňujú aktiváciu množstva rôznych génov, ktoré sa podieľajú na metabolizme, detoxikácii či oprave indukovaných celulárnych poškodení, súčasne. Metaloterapeutiká, ako redoxne aktívne látky reagujúce s redoxným stavom bunky, podporujú produkciu ROS rôznymi mechanizmami. V benígnych tkanivách sú tieto reakcie dôležité na znižovanie nechcených nežiaducich účinkov, môžu však znižovať účinnosť kancerostatických liečiv, čo spôsobuje zlyhanie liečby. [48]

### **2.4.2. Fentonova reakcia**

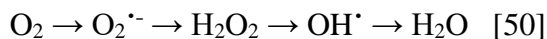
Fentonova reakcia je založená na silných oxidatívnych vlastnostiach Fe<sup>II</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a OH<sup>•</sup>. Je definovaná ako:



Hydroxylový radikál produkovaný touto reakciou je schopný poškodzovať nukleové kyseliny, lipidové membrány a proteíny. Vzniknuté Fe<sup>III</sup> môže byť redukované späť do stavu Fe<sup>II</sup> superoxidovým radikálom O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Tento proces je definovaný Haber-Weissovou reakciou:



Pri fyziologických podmienkach v zdravých bunkách sa produkuje kaskádou jednoelektrónových redukcí ako superoxidový radikál  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , tak aj  $\text{H}_2\text{O}_2$  :

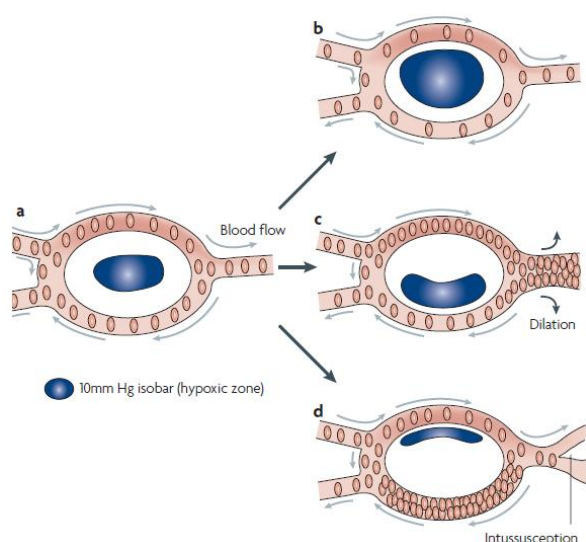


Niekoľko oxidáz, fumarátreduktázy, flavíny, tetrahydropteríny a katecholamíny sú zodpovedajúcimi mitochondriálnymi a mikrozomálnymi biomolekulami. [50] V niektorých reakciách ako sú napríklad reakcie glukózaoxidáz či urikáz je  $\text{O}_2$  redukovaný priamo na  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vo väčšine prípadov je však  $\text{O}_2$  redukovaný najskôr na superoxidový radikál a následne dizmutovaný SOD (superoxiddizmutázou) na peroxid vodíku. Produkovaný peroxid je následne spracovávaný katalázami, peroxidázami alebo peroxiredoxínmi. [51]

Fentonova reakcia však neplatí len pre  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , ale tiež pre iné kovy. Patria sem  $\text{Co}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$  či  $\text{V}^{\text{IV}}$ . [49]

### 2.4.3. Hypoxia

Hypoxické prostredie je prítomné v pevných nádoroch a je definované ako oblasť, v ktorej je parciálny tlak kyslíku nižší ako 10 mmHg. Je spôsobené nedostatočným cievnym prekrvením, ktoré vzniká kvôli nedostatočnej difúzii kyslíka v avaskulárnom prostredí nádoru a jeho metastáz. Dôsledkom toho majú hypoxické bunky vyššiu odolnosť voči väčšine bežne používaných chemoterapií a rádioterapií, pretože majú tendenciu si vytvoriť abnormálne cievne



zásobenie, ktoré však často nedokáže prekonať deficit kyslíku. Pretrvávajúca hypoxia v nádore tak vyvolá dezorganizáciu jeho cievnej siete. Okrem difúzie kyslíku súvisí s hypoxiou nestabilný prietok krvi v mikrovaskulárnych spletiach nádoru. Napriek tomu znižuje nízka hladina kyslíku rozsah reoxidácie a vyššiu koncentráciu redukčných činidiel, akým je napríklad glutatión, rozlišujúcich hypoxické bunky od zdravých tkanív. [52, 53, 54, 55]

Obrázok 20: Účinky hypoxie na difúziu kyslíku v nádorových bunkách erytrocytov (prevzaté z [53])

Účinky hypoxie v protinádorovej terapii zahŕňajú selekciu genotypov podporujúcich prežitie bunky pri hypoxi-reoxidačnom poškodení (mutácie TP53 nádorového supresorového génu), zmeny génovej expresie, ktoré potláčajú riadenú bunkovú smrť a podporujú udržanie bunkovej homeostázy. Hypoxia tiež prispieva ku strate genómovej stability prostredníctvom zvýšenej tvorby ROS a zníženia regulácie dráh opravujúcich poškodenia DNA. [56, 57, 58, 59, 60]

Prekurzory liečiv riadené hypoxiou sú závislé na expresii nádoru príslušnými aktivujúcimi reduktázami. Väčšina 1-elektrónových reduktáz zodpovedných za redoxný proces, čiže aj hypoxickú selektivitu prekurzorov liečiv sú NAD(P)H dependentné flavoproteíny s nízkou afinitou substrátu a špecifičnosťou ako xenobiotické metabolizujúce enzýmy. Reduktázy katalyzujúce 2-elektrónové prenosy sa delia do dvoch skupín. Prvú skupinu predstavujú hemoproteíny, ako napríklad cytochróm P<sub>450</sub>. Tieto redukcie neposkytujú radikálový medziprodukt citlivý voči kyslíku, no napriek tomu sú ním inhibované pravdepodobne prostredníctvom kompetitívnej väzby O<sub>2</sub> a N-oxidu na hemovú prostetickú jednotku. Druhá skupina je katalyzovaná prenosom hydridu (H<sup>-</sup>) z NAD(P)H a nie je inhibovaná kyslíkom. [61, 62]

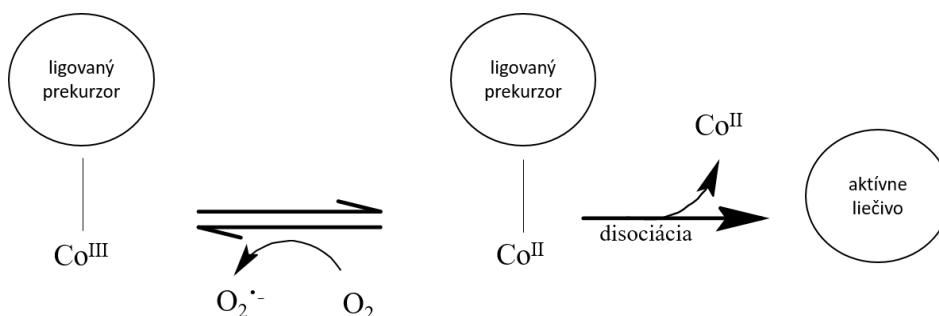
Molekulárne mechanizmy, ktoré sprostredkovávajú bunkovú odpoveď na hypoxiu buniek majú dve hlavné signálne dráhy. Tie reagujú na kyslík a sprostredkovávajú adaptáciu na hypoxiu. Sú teda zamerané na skupinu HIF transkripčných faktorov, UPR (unfolded protein response) a mTOR (mammalian target of rapamycin; serín/treonín špecifické proteínkinázy), ktoré majú ale nejasnejší mechanizmus účinku. Regulácia HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$  dioxygenázami závislými na množstve kyslíku vedie ku širokej adaptačnej reakcii na hypoxiu. Zahŕňa transkripciu génov zapojených do angiogenézy (prerastanie cievnej spleti okolitého tkaniva do pevného nádoru), metabolickej adaptácie, tolerancie na acidózu a mnohé iné. UPR má v spojení s hypoxiou veľmi dôležitú úlohu. Kyslík je totiž výhodným konečným akceptorom elektrónov v kaskáde redoxných reakcií, ktorá je potrebná na tvorbu disulfidovej väzby pri syntéze proteínov. Hypoxia vedie ku zvýšeniu úrovne rozkladania bielkovín v endoplazmatickom retikule bunky, čo vedie ku indukcii UPR. Potlačenie proteosyntézy v závislosti od hypoxie majú za následok aj mTOR kinázy. [63, 64, 65, 66]

Centrom záujmu redoxných procesov v spojení s protinádorovou aktivitou kobaltitých komplexov je (1) aktivácia Co<sup>III</sup> komplexov v hypoxickom prostredí redukciami na Co<sup>II</sup>



a následné uvoľnenie ligandov a (2) produkcia ROS katalytickým autooxidatívnym procesom, najmä u komplexov kobaltu so Schiffovými bázami. [43]

Hlavnou podstatou aktivácie hypoxiou (redukciou) je, že terapeutikum musí mať schopnosť vyskytovať sa ako prekursor v neaktívnom (vyššom) oxidačnom stave a ako aktivované účinné liečivo v nižšom oxidačnom stave. Prítomnosť redukčných činidiel vo fyziologických tkanivách je zodpovedná za hyperaktiváciu  $\text{Co}^{\text{III}}$  biologicky aktívnych látok v hypoxických tkanivách. Preto sú predpokladanou príčinou nie redukcie, ale oneskorenej reoxidácie. [67]



Obrázok 21: Predpokladaný mechanizmus hypoxiou riadených  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexov ako liečiv ( $\text{Co}^{\text{III}}$  – nízkospinový  $d^6$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$  – vysokospinový  $d^7$ )

$\text{Co}^{\text{II}}$  kovové centrum v redukovaných  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexoch je labilnejšie, slúži ako chaperón cytotoxických ligandov, ktoré následne slúžia ako cytostatiká. [68] Použitie kovových iónov ako chaperónov má mnohé výhody vrátane potenciálu pre selektívnu aktiváciu v mieste nádoru. Chaperóny môžu zlepšiť farmakokinetické vlastnosti liečiva, zahŕňajúc dostupnosť liečiva v perorálnej forme), či potenciálne stabilizovanie inak klinicky nie veľmi zaujímavých zlúčenín obmedzením vedľajších reakcií, ktoré vedú ku deaktivácii a vedľajším účinkom. [69]

#### **2.4.4. $\text{Co}^{\text{III}}$ komplexy ako chaperóny bioaktívnych ligandov**

##### **2.4.4.1. Mustard agents**

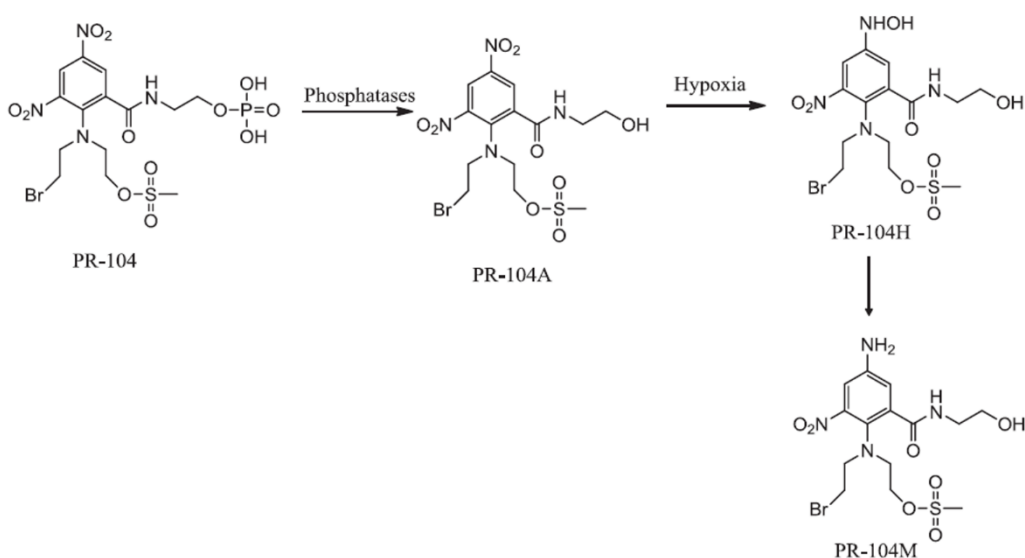
Objav tzv. „mustard agents“ (dusíkatých yperitov) ako alkylačných činidiel v roku 1942 priniesol novú éru chemoterapeutík. Ich biologická aktivita spočíva v naviazaní sa na DNA, zosieťovaní jej vlákien, čím zabraňuje bunkovej replikácii a vedie tak ku apoptóze bunky. Voľný elektrónový pár dusíku v týchto zlúčeninách dáva za vznik aziridínovému iónu, ktorý je

veľmi reaktívny voči DNA nádorových buniek. Tento ión je však rovnako reaktívny aj voči zdravým bunkám, čo vedie ku rôznym vedľajším účinkom. Preto je snahou upraviť vysokú reaktivitu a mieru cytotoxicity, ktorá by bola vykazovaná špecificky voči nádorovým bunkám. Medzi používané dusíkaté yperity patria rôzne zlúčeniny ako napríklad mechlóretamín, chlorambucil, melfalan, cyklofosfamid a steroidné dusíkaté yperity. Antineoplastické účinky dusíkatých yperitov boli objavené približne pred 70 rokmi, keď boli vyvinuté ako deriváty toxického sírneho yperitu. Dusíkaté yperity sa ako alkylačné činidlá DNA stali prvými protinádorovými liečivami voči rôznym druhom rakoviny už pred 2. svetovou vojnou. Perorálne formy týchto liečiv môžu byť pripravené znížením ich elektrofilnosti. To vedie ku vývoju prekursorov dusíkatých yperitov, ktoré sú aktivované glutatiónterferázou. Alkylácia DNA týmito látkami prebieha v 2 krokoch. Najskôr je bis(2-chlóretyl)amín intramolekulárne cyklizovaný SN2 reakciou pri neutrálnom alebo alkalickom pH jednostupňovou reakciou za tvorby vysoko reaktívneho a nestabilného aziridíniového katiónu. V druhom kroku je aziridíniový katión nukleofilne naadovaný nukleofilom DNA, čím vznikne SN2 mechanizmom monoalkylačný produkt. Reakcia môže byť opakovaná iným alkylovým ramenom dusíkatého yperitu, čím sa komplementárne vlákna DNA zosieťujú. [70, 71]

Bolo pripravených niekoľko nitrobenzylových kvartérnych solí ako bioaktívnych prekursorov mechloreتامínu, ktorý má potenciálnu hypoxiou riadenú cytotoxicitu. Príkladom je N-bis(2-chlóretyl)-N-(2-nitrobenzyl)amóniumchlorid, ktorý preukazuje veľmi silnú deaktiváciu yperitu, vysokú rozpustnosť vo vode vďaka stálemu kladnému náboju a redukčný potenciál (-358 mV) v rozsahu, o ktorom sa pojednáva ako o vhodnom na metabolickú aktiváciu. Bolo zistené, že vykazuje extrémne vysokú hypoxickú selektivitu in vitro. Mechanizmus jeho účinku je redukčná fragmentácia vedúca ku uvoľneniu mechlóretamínu. [72, 73] Bol pripravený a skúmaný rad benzyl-substituovaných, naftylových a yperidových analógov N-bis(2-chlóretyl)-N-(2-nitrobenzyl)amóniumchloridu. Heterocyklické analógy pyrolu, imidazolu, tiofenu a pyrazolu vrátane, boli vyhodnotené ako zlúčeniny s 1-elektrónovým rozsahom redukčných potenciálov od -277 do -511 mV. Všetky však vykazovali nižšiu cytotoxicitu in vitro ako mechlóretamín. Narozdiel od viacnásobnej elektrónovej redukcie zlúčeniny N-bis(2-chlóretyl)-N-(2-nitrobenzyl)amóniumchloridu požadovanej pred fragmentáciou na mechlóretamín, nitropyrolový a nitroimidazolový analóg vyžadovali len 1-elektrónovú redukciu na fragmentovanie a vykazovali vysoký podiel uvoľneného mechlóretamínu. Bola u nich dokázaná aj výrazná hypoxická selektivita in vitro, ktorá však bola v porovnaní s N-bis(2-chlóretyl)-N-(2-nitrobenzyl)amóniumchloridom stále nižšia. [72]

Ďalšou sériou pripravených a charakterizovaných dusíkatých yperitov sú yperity obsahujúce diaryl a alkylarylsulfoxid, ktoré boli porovnávané s cytotoxicitou N-bis(2-chlóretyl)-N-(2-nitrobenzyl)amóniumchloridu. Analógy s diarylsulfoxidmi vykazovali preukázateľne vyššiu hypoxickú selektivitu (11-27 násobne) oproti analógom alkylarylsulfoxidu (~ 3 násobok). Kondenzovaný difenylsulfoxid naopak preukazuje výrazne nižšiu selektivitu (1,3 násobok). Pri fyziologickom pH sa zvyšuje aniónová povaha karboxylátu, ktorá zvyšuje elektrónovú hustotu aromatického kruhu a favorizuje tým vznik aziridíniových zlúčenín schopných alkylovať DNA. [74, 75]

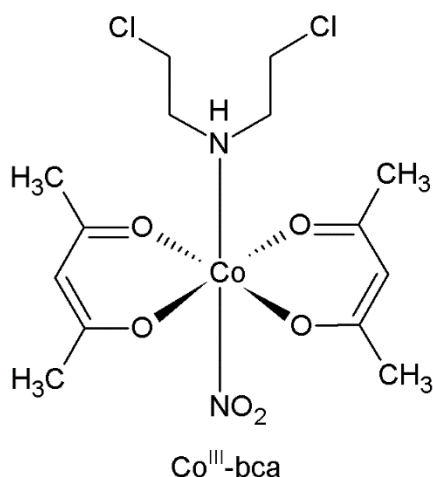
Bol vyvinutý dinitrobenzamid yperit (DNBM, PR-104) ako prekursor liečiva aktivovaného hypoxiou. Momentálne je v klinickej fáze testovania I a II voči pevným nádorom, rakovine pľúc a leukémii. Pozostáva z fosfátového esteru, ktorý zvyšuje jeho rozpustnosť vo vode, a nitroskupiny, ktorá je hypoxicky selektívna. Po fosfátom katalyzovanej hydroxylácii PR-104 na dinitrobenzamidový yperit (PR-104A), ktorý obsahuje polovicu dusíkatého yperitu, je redukovaný na hydroxylamín (PR-104H) alebo amín (PR-104M) za hypoxických podmienok, čo sú druhy alkylujúce DNA. Mechanizmus tzv. „elektrónového prepínača“ na aktiváciu dusíkatého yperitu (PR-104M) selektívne v prostredí hypoxickej bunky je dôvodom hypoxicky selektívnej cytotoxicity. [76]



Obrázok 22: Mechanizmus aktivácie dinitrobenzamidového yperitu PR-104 (prevzaté z [71] a upravené)

Dusíkaté yperity svoju vysokú reaktivitu a periférnu cytotoxicitu môžu znížiť tým, že sa využitím voľného elektrónového páru dusíku nakoordinujú na inertný kov. Takéto komplexy

boli syntetizované práve s kobaltom (III). Boli študované komplexy vzorca  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{bca})(\text{NO}_2)]$ , kde acac je acetylacetonátový ligand a bca je bis(2-chlóretyl)amín, dusíkatý yperit. V oxidovanej forme je táto zlúčenina inertná, pretože voľný elektrónový pár dusíku patriaci bca je zahrnutý do koordinácie na centrálny kovový ión kobaltu, a preto bca nie je schopný vytvoriť aziridíniový ión alkylujúci DNA. V redukovanej forme sa z  $\text{Co}^{\text{II}}$  komplexu



bca uvoľňuje a vykazuje cytotoxické účinky. Bca, ako bioaktívny ligand, však vykazuje vyššiu cytotoxicitu za aeróbných podmienok. Napriek tomu je výborným rádiosenzitizérom (látka zvyšujúca citlivosť nádorových buniek voči rádioterapii) hypoxických buniek karcinómu prsníka, prekonal rezistentnosť bunkovej línie karcinómu spinocelulárnych buniek a oneskoril rast nádorov u myši s fibrosarkómom. [77, 4]

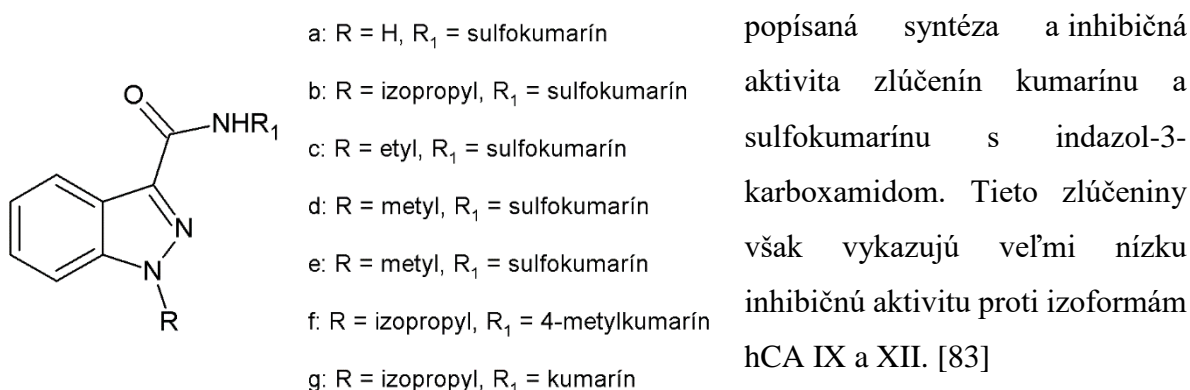
Obrázok 23: Štruktúra  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexu s dusíkatým yperitom ako ligandom  $[\text{Co}(\text{acac})_2(\text{bca})(\text{NO}_2)]$

#### 2.4.4.2. Kumarín a jeho deriváty

Hypoxické prostredie v nádorovom tkanive vedie ku zvýšeniu kyslosti nádorových buniek a ku metabolickej adaptácii z aeróbnej na fermentačnú glykolýzu, ktorá je zodpovedná za progres nádoru a jeho metastázovanie. Výsledkom toho je zvýšená produkcia kyseliny mliečnej, čo vedie ku znižovaniu intracelulárneho pH hypoxických nádorových buniek. Karboanhydráza IX (hCA IX) je transmembránový zinkový metaloproteín, ktorého expresia je indukovaná hypoxiou (hypoxiou indukovaným faktorom HIF-1 $\alpha$ ). Práve tento metaloproteín hrá dôležitú úlohu pri regulácii acidobázickej rovnováhy v nádorovom tkanive a tiež stimuluje migráciu nádorových buniek, čo spôsobuje rast nádoru a jeho metastáz. Rovnako ako hCA IX, hCA XII tiež reguluje intracelulárne a extracelulárne pH, nie je však produkovaný hypoxickými, ale zdravými bunkami. Jeho hladina je však zvýšená aj v niektorých typoch nádorov. Bolo zistené, že inhibícia aktivity oboch enzýmov, hCA IX a XII, v nádorových bunkách znižuje ich schopnosť rastu, proliferáciu, angiogézu a metastázovanie. Tento objav z nich preto robí potenciálne ciele protinádorovej liečby. Bolo vyvinutých niekoľko tried hCA

inhibítorov, ktoré sú používané na liečbu patologických stavov ako napríklad glaukómu, epilepsie, výškovej choroby a sú uvádzané aj protinádorové účinky ako znižovanie rastu nádoru a spomaľovanie jeho vývoja ak sú používané simultánne s inými chemoterapeutikami. [78, 79, 80, 81]

Kumarín a jeho deriváty (sulfokumarín) sú prekursori, produkty ich hydrolýzy sú však aktivované hCA inhibítory. Zlúčeniny kumarínu sa viažu odlišne v porovnaní s klasickými hCA inhibítormi (sulfónamidy) a to hneď pri vstupe do dutiny aktívneho miesta hCA. [82] Bola

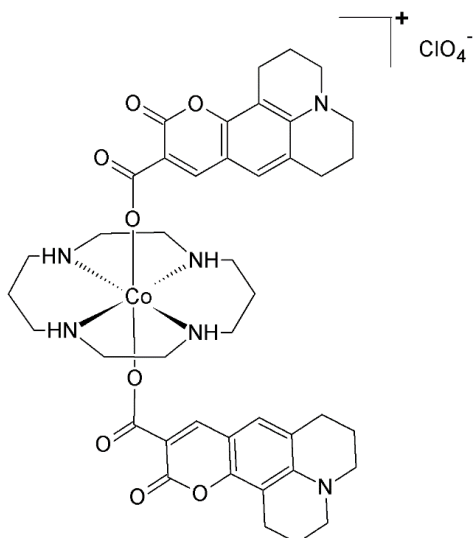


Obrázok 24: Štruktúrny vzorec derivátov kumarínu vykazujúcich inhibičnú aktivitu hCA IX a XII enzýmov

Kumarín a jeho deriváty patria medzi zlúčeniny vykazujúce fluorescenčné vlastnosti. Môžu byť teda v bunkách vizualizované fluorescenčnou mikroskopiou (metóda poskytuje obmedzené informácie o väzbe cytotoxického ligandu na kov). Ich fluorescenčné vlastnosti sú však po nakoordinovaní na kovové centrum potlačené. V hypoxickom prostredí sa kovový ión zredukuje, čím príde ku uvoľneniu flouroforu, ktorý bude následne opäť vykazovať fluorescenčné vlastnosti. [84]

Klinické využitie samotného kumarínu ako protinádorového liečiva má obmedzenú úspešnosť, pretože je zle rozpustný a veľmi rýchlo metabolizuje, čoho dôsledkom je nízka biologická dostupnosť perorálnej formy. Stratégiou na zlepšenie jeho vlastností je preto jeho modifikácia začlenením do transportných systémov. [85]

Ako transportné molekuly boli použité komplexy Co(III)-TPA (tris(2-metylpyridyl)amín) a Co(III)-cyklam (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán). Boli pripravené komplexy vzorca [Co(TPA)(H<sub>2</sub>ha-c343)]ClO<sub>4</sub> a [Co(cyklam)(H-c343)]ClO<sub>4</sub>, kde H<sub>2</sub>ha-c343 a H-c343 sú kumarínové fluorescenčné ligandy. Tieto ligandy po naviazaní na kovové centrum



nevykazovali žiadne fluorescenčné vlastnosti. Ich aktivácia zredukovaním kovového iónu však nebola potvrdená, pretože ku fluorescencii prišlo pridaním reductantov (glutatiónu a kyseliny askorbovej). Uvoľnenie fluoroforov teda pravdepodobne nastalo po substitúcii ligandu. Tieto komplexy vykazovali cytotoxicitu voči karcinómi vaječníkov. [86]

Obrázok 25: Štruktúra  $\text{Co}^{\text{III}}$  komplexu s kumarínovým ligandom ako fluoroforom  $[\text{Co}(\text{cyklam})(\text{H-c343})]\text{ClO}_4$

#### 2.4.4.3. Dichlóracetát

Malá molekula dichlóracetátu (dca) je metabolickým modulátorom, ktorý je už desaťročia používaný na liečbu laktátovej acidózy a mitochondriálnych ochorení. Bez dopadu na zdravé bunky dokáže dca zmeniť metabolické dráhy nádorových buniek. Pri testovaní in vivo dokázal dca rozpustený v čistej vode (pri užívaní po dobu 3 mesiacov) zabrániť, respektíve zvrátiť rast nádoru bez vedľajších účinkov a ovplyvňovania hladiny hemoglobínu, transamináz alebo kreatínu. Jednoduché dávkovanie, selektivita a účinnosť tejto látky z nej robia atraktívne protinádorové liečivo. [87]

Produkty fermentačnej glykolýzy (laktát a acidóza) v hypoxických nádorových bunkách majú mnoho nepriaznivých účinkov na tkanivá. Prispievajú k rozpadu extracelulárnej matrix, uľahčujú mobilitu buniek a zvyšujú metastatický potenciál. Metabolické a apoptické dráhy sa zhromažďujú v mitochondriách, ktoré sú práve miestom pôsobenia dca. [88]

Fermentačná glykolýza má kvôli svojim produktom mnoho nepriaznivých účinkov na tkanivá. Jej produkty prispievajú k rozpadu extracelulárnej matrix, uľahčujú mobilitu buniek a zvyšujú metastatický potenciál. Metabolické a apoptické dráhy sa zhromažďujú v mitochondriách, ktoré sú miestom pôsobenia dca. Ten blokuje PDH (pyruvátdehydrogenázy), čím sa aktivujú PDK (pyruvátdehydrogenázovékinázy), ktoré zvyšujú dodávanie pyruvátu do mitochondrií. Dichlóracetát tak zvyšuje oxidáciu glukózy a depolarizuje mitochondriu, čím

vracia jej membránový potenciál na hladinu zdravých buniek. Dca indukuje apoptózu v nádorových bunkách rakoviny prsníka, pľúc a glioblastómových bunkových líniiach. Neskôr bolo dokázané, že indukuje apoptózu aj v bunkových líniiach rakoviny prostaty a sliznice maternice rovnakým mechanizmom. Aktivácia mitochondrií dca výrazne zvyšuje spotrebu kyslíku v nádorovom tkanive, čím sa veľmi zvyšuje účinnosť chemoterapií riadených hypoxiou. [87, 88]

Práve vďaka významnej biologickej aktivite bez nežiaducich vedľajších účinkov bol dichlóracetát použitý ako ligand na syntézu komplexov potenciálne riadených hypoxiou v tejto práci.

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1. Použité chemikálie

Chemikálie a rozpúšťadlá (uvedené v Tabuľke 1) použité pri syntéze a meraniach boli komerčne dostupné a neupravované.

Tabuľka 1: Zoznam použitých chemikálií

<i>Názov chemikálie</i>	<i>Výrobca/dodávateľ</i>
3,5-Dichlórsalicylaldehyd 99 %	Sigma-Aldrich
2-Hydroxy-1-naftaldehyd t. g.	Sigma-Aldrich
Acetonitril p. a.	Lach-Ner
Dietyléter p. a.	Sigma-Aldrich
Dichlórmétán p. a.	Penta
Dichlóroctová kyselina p. a.	Sigma-Aldrich
Dimetylsulfoxid- <i>d</i> <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich
Dusičnan kobaltnatý – hexahydrát p. a.	Lachema
Dusičnan strieborný p. a.	Lachema
Etyléndiamín p. a.	Fluka Chemika
Hydroxid draselný p. a.	Lach-Ner
Hydroxid sodný p. a.	Sigma-Aldrich
Chlorid kobaltnatý – hexahydrát p. a.	Lachema
Chloroform p. a. stabil. amylénom	Lach-Ner
Metanol p. a.	Lach-Ner
Tetrabutylamóniumperchlorát 99 %	Acros Organics
Trietylamín 99 %	Acros Organics
Tripropylamín 98 %	Acros Organics

Elementárna analýza (C, H, N) bola prevádzaná na prístroji Flash 2000 (Thermo Finnigan).

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spektroskopia, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C gs-HMBC 2D NMR experimenty boli prevádzané na prístroji 400 MHz NMR spektrometer pre meranie spektier vysokého rozlíšenia vzoriek v roztoku od firmy Varian pri 400,00 MHz (<sup>1</sup>H) a 100,00 MHz (<sup>13</sup>C); (gs = gradient selected,



HMBC = heteronuclear multiple bond correlation). Vzorok na NMR experimenty boli rozpustené v DMSO- $d_6$  a analyzované pri teplote 298 K. Štiepenie signálu v  $^1\text{H}$  NMR spektrách je definované ako s = singlet, d = dublet, t = triplet, m = multiplet.

Infračervené spektrá boli zmerané na prístroji Nexus 670 FT-IR (Thermo Nicolet) v rozsahu vlnočtov 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  za použitia techniky ATR. Intenzita signálu v IČ spektrách je definované ako w = weak, m = medium, s = strong, vs = very strong.

Cyklická voltametria bola meraná na prístroji Potenciostat CHI600C (CH Instruments) určeného na meranie cyklickej voltametrie (CV) a iných elektrochemických metód.

Kryštálové štruktúry boli určené na monokryštálovom difraktometri D8 QUEST (Bruker) vybaveným PHOTON 100 CMOS detektorom pri teplote 295 K.

## **3.2. Charakterizácia použitých prístrojov**

### **3.2.1. Elementárna analýza**

Elementárna (prvková) analýza je analytická metóda, ktorou sa určuje kvalitatívne a kvantitatívne zloženie skúmanej vzorky. Je určované percentuálne zastúpenie jednotlivých prvkov daných zlúčenín (C, H, N). Niektoré typy prístrojov stanovujú aj zastúpenie prvkov ako napríklad kyslíku či síry. Vzorka sa vkladá do cínovej kapsule, ktorá je následne spálená pri teplote približne 1800 °C v atmosfére bohatej na kyslík. Plynné produkty ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ ) sú následne vedené do trubice, ktorá sa skladá z oxidačnej ( $\text{WO}_3$ ) a redukčnej (Cu) časti nosným plynom – He. Plyny sú potom v chromatografickej časti oddeľované. Používaný je detektor tepelnej vodivosti. [89]

### **3.2.2. NMR spektrometria**

NMR spektrometria je analytická metóda, ktorá sa zaraďuje medzi absorpčné spektrometrie. Detekuje rádiovlnové žiarenie jadier atómov na základe ich vlastností (magnetického momentu). Rádiovlnové žiarenie, ktoré je kolmé na smer vonkajšieho magnetického poľa, sú však schopné absorbovať len jadrá s nenulovým nukleárnym spinom. Dipólový magnetický moment je indukovaný rotujúcim nábojom v dôsledku jadrovej rotácie a náboja jadra. Vzorka sa vkladá do rotujúcej sklenenej kvety v silnom homogennom magnetickom poli, kde príde ku usporiadaniu magnetických momentov v smere a proti smeru

magnetického poľa. Ak je magnetický moment orientovaný súhlasne s vonkajším magnetickým poľom jeho jadro bude mať nižšiu energetickú hladinu. Pri orientácii magnetického momentu v nesúlade s vonkajším magnetickým poľom jadro zaujme vyššiu energetickú hladinu. Následkom toho sa vytvorí energetický rozdiel, ktorý je rovný množstvu energie, ktorú je jadro schopné absorbovať. Ak je absorbovaná energia vhodného žiarenia, po čase príde ku vyrovnaniu podielov jadier na oboch energetických hladinách. Vtedy už nie je možné žiadne absorbovanie a spektrálne signály miznú. Tento stav sa nazýva stav nasýtenia. Následnou premenou prebytočnej energie na teplo alebo jej postupným odovzdávaním okolitým jadrom rovnakého druhu dochádza ku návratu na nižšiu energetickú hladinu a vyrovnaniu pôvodného zastúpenia jadier (relaxačný proces). Jadrá absorbujú energiu len ak spĺňajú rezonančnú podmienku. To sa dá dosiahnuť (1) pôsobením vysokofrekvenčného žiarenia o stálej frekvencii s meniacou sa hodnotou magnetickej indukcie magnetického poľa alebo (2) magnetická indukcia zostáva konštantnou a mení sa frekvencia elektromagnetického poľa. Výsledok merania je detekovaný v prijímacej cievke. FID (Free Induction Decay), ktoré vyjadruje závislosť odozvy vzorky na čase sa následne prevádza Fourierovou transformáciou na klasické spektrum, ktoré vyjadruje závislosť na frekvencii. Výhodou NMR spektrometrie je meranie vzoriek vo všetkých skupenských stavoch. Najbežnejšie je využívaná na meranie roztokov. NMR spektrometria sa používa na detekciu atómových jadier  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  či  $^{19}\text{F}$ . [90, 91]

### **3.2.3. Infračervená spektrometria**

IČ spektrometria je nedeštruktívna analytická metóda. Staršie, disperzné spektrometre merajú na princípe rozkladu použitého infračerveného žiarenia v mriežkovom alebo hranolovom monochromátore. Novšie spektrometre využívajú Fourierovu transformáciu. Meraná vzorka interaguje s infračervenou oblasťou elektromagnetického žiarenia, zahŕňa teda oblasť o vlnočte od 14000 do 20  $\text{cm}^{-1}$ . Podľa energie sa infračervená oblasť delí na 3 typy: (1) blízku – 14000 až 4000  $\text{cm}^{-1}$  (near-IR), (2) strednú – 4000 až 400  $\text{cm}^{-1}$  (mid-IR) a (3) vzdialenú – 400 až 20  $\text{cm}^{-1}$  (far-IR). Energia infračerveného žiarenia spôsobuje zmeny vibračných a rotačných stavov molekúl. Rotačné stavy majú energetické hladiny výrazne bližšie pri sebe ako vibračné stavy. Zmeny vo vibračných stavov sú preto doprevádzané aj zmenou stavov rotačných. Infračervené spektrá znázorňujúce závislosť absorpcie (alebo transmitancie) na vlnočte sú preto rotačne-vibračnými spektrami. IČ spektrá sa delia na (1) oblasť charakteristických (skupinových) vibrácií – 4000 až 1500  $\text{cm}^{-1}$  a (2) oblasť odtlačku prstov –

1500 až 670  $\text{cm}^{-1}$ . V oblasti skupinových vibrácií sa nachádzajú absorpčné pásy vibrácií rôznych funkčných skupín, preto je využívaná na popis organických zlúčenín. Pásy deformačných vibrácií skupín, ktoré sú ovplyvnené okolitými väzbami a celkovou štruktúrou sú v oblasti odtlačku prstov. [92, 93]

#### **3.2.4. Cyklická voltametria**

Cyklická voltametria je elektrochemická metóda, v ktorej sa meria prúd, vyvíjajúci sa na elektrochemickom článku za podmienok, v ktorých je napätie vyššie ako predikované Nernstovou rovnicou. Ide o cyklovanie potenciálu pracovnej elektródy a meranie výsledného prúdu. Potenciál pracovnej elektródy je meraný proti referenčnej elektróde, ktorá udržiava konštantný potenciál a výsledný potenciál vytvára budiaci signál. Účelom elektrolytického roztoku je poskytnúť ióny elektródam počas oxidácie a redukcie. Analyty môžu najskôr podstupovať redukciu, vtedy ide o negatívne skenovanie potenciálu, či oxidáciu, kedy sa potenciál najskôr skenuje pozitívne. Cyklus sa môže opakovať a je možné meniť rýchlosť skenovania, pričom použitá rýchlosť skenovania je udávaná sklonom excitačného signálu. Výsledný voltamogram je vyjadrením závislosti meraného prúdu pracovnej elektródy na jej potenciáli. Táto metóda môže byť použitá na štúdium kvalitatívnych vlastností za rôznych podmienok ako napríklad prítomnosť medziproduktov v oxidačne-redukčných reakciách či reverzibilita reakcie. Ďalším využitím je stanovenie stechiometrie elektrónov látky, jej difúzneho koeficientu a formálneho redukčného potenciálu. [94]

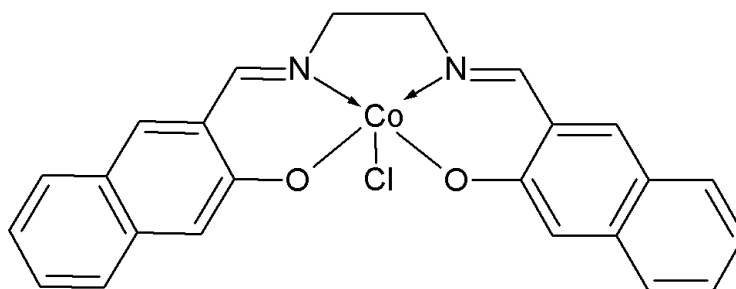
#### **3.2.5. Röntgenová štruktúrna analýza**

Röntgenová monokryštalová difraktometria je nedeštruktívna analytická metóda, ktorá poskytuje podrobné informácie o vnútornej kryštalovej mriežke kryštalických látok zahŕňajúc rozmerov jednotlivých buniek, dĺžok a uhlov väzieb. Technika je založená na interferencii monochromatických röntgenových lúčov s kryštalickou vzorkou. RTG lúče sú generované katódovou trubicou, zamerané na produkovanie monochromatického žiarenia a koncentrované smerujú ku vzorke. Interakcia dopadajúcich lúčov so vzorkou vytvára interferenciu a difrakčný lúč ak sú splnené podmienky Braggovho zákona. Dôležitý je uhol medzi dopadajúcim a difraktovaným lúčom. Usporiadanie kryštalových štruktúr sa označuje ako difrakčný vzor. Každému odrazu sú priradené indexy, ktoré označujú jeho polohu v rámci difraktogramu.

Výsledná kryštalová štruktúra sa následne získa Fourierovou transformáciou. Táto metóda sa najčastejšie používa na určenie absolútnej štruktúry študovanej zlúčeniny. [95]

### 3.3. Syntéza prekurzorov

**P1:** N, N'-bis(2-hydroxy-1-naftalidén)etyléndiamínchloridokobaltitý komplex



Obrázok 26: Zobrazenie najmenej štruktúrnej jednotky zlúčeniny P1 identifikovanej na základe fyzikálne-chemickej charakterizácie

1,76 g (10 mmol) 2-hydroxy-1-naftaldehydu bolo rozpustených v 20 ml metanolu. K rozpustenému 2-hydroxy-1-naftaldehydu bolo pridaných 0,30 g (5 mmol) etyléndiamínu. Zmes bola refluxovaná 15 minút. 1,19 g (5 mmol) hexahydrátu chloridu kobaltnatého bolo rozpustených v 15 ml metanolu a pridaných ku zahriatej zmesi pripravenej Schiffovej bázy. Po 20 minútach od zmiešania zmesi bola pridaná báza trietylamin v 2,2 násobku látkového množstva hexahydrátu chloridu kobaltnatého (1,11 g; 11 mmol). Roztok bol refluxovaný po dobu 20 hodín. Následne bolo na frite odsatých 1,68 g (výťažnosť 73 %) hnedotehlovočerveného prášku. Prekurzor bol na frite premytý metanolom a presušený dietyléterom.

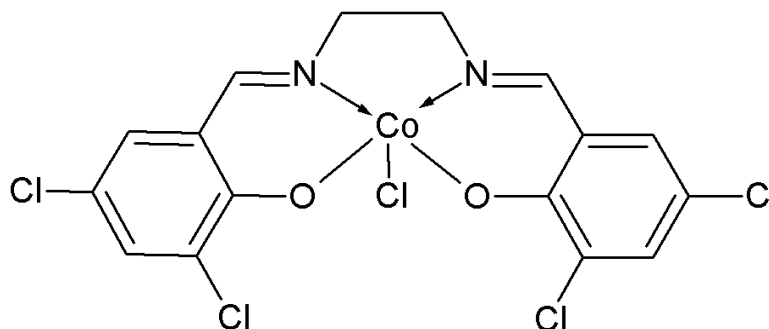
Tabuľka 2: Elementárna analýza P1 ( $[\text{Co}(\text{nalen})(\text{Cl})]$ ,  $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClCoN}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 460,80$ )

	C [%]	H [%]	N [%]
vypočítané	62,5	4,0	6,1
namerané	63,0	4,3	6,0
rozdiel	-0,5	-0,3	0,1

FTIR ( $\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3059m, 3024m, 2932m, 2852w, 1614vs, 1596vs, 1574s, 1533vs, 1503s, 1452s, 1431s, 1398vs, 1358vs, 1334s, 1305m, 1247s, 1212m, 1189vs, 1164m, 1138s, 1092m,

1065w, 1032m, 975m, 933m, 855m, 825vs, 775w, 752m, 731vs, 687w, 659w, 623w, 593m, 545w, 524w, 503w, 429m; 1614 a 1596 (C=N); 1577, 1533 a 1503 (C=C)<sub>aren.</sub>

**P2:** N, N'-bis(3,5-dichlorosalicylidén)etyléndiamínchloridokobaltitý komplex



*Obrázok 27:* Zobrazenie najmenej štruktúrnej jednotky zlučiny P2 identifikovanej na základe fyzikálne-chemickej charakterizácie

0,96 g (5 mmol) 3,5-dichlorosalicylaldehydu bolo rozpustených v 20 ml metanolu. K rozpustenému 3,5-dichlorosalicylaldehydu bolo pridaných 0,15 g (2,5 mmol) etyléndiamínu. Zmes bola refluxovaná 15 minút. 0,59 g (2,5 mmol) hexahydrátu chloridu kobaltnatého bolo rozpustených v 10 ml metanolu a pridaných ku zahriatej zmesi pripravenej Schiffovej bázy. Po 20 minútach od zmiešania zmesi bola pridaná báza tripropylamín v 2 násobku látkového množstva hexahydrátu chloridu kobaltnatého (0,72 g; 5 mmol). Roztok bol refluxovaný po dobu 3 hodín. Následne bolo na frite odsatých 0,85 g (výťažnosť 68 %) hnedého prášku. Prekursor bol na frite premytý metanolom a presušený dietyléterom.

*Tabuľka 3:* Elementárna analýza P2 ([Co(3,5Cl-salen)(Cl)], C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>5</sub>CoN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Mr = 498,46)

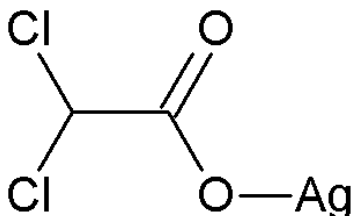
	C [%]	H [%]	N [%]
vypočítané	38,6	2,0	5,6
namerané	39,1	2,3	5,8
rozdiel	-0,5	-0,3	-0,2

FTIR ( $\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3074w, 3055w, 2949w, 2916m, 2849w, 1633m, 1600vs, 1514m, 1433vs, 1410s, 1374m, 1316s, 1211s, 1174s, 1086m, 1054m, 1042m, 961w, 938m, 913w, 860s, 762s, 749s, 730m, 659w, 651w, 635w, 598w, 559w, 520w, 503w, 427w; 1633 a 1600 (C=N); 1514 a 1433 (COO<sup>-</sup>); 1316 (C-O)<sub>karb.kys.</sub>

### 3.4. Syntéza komplexov s dca ligandom

Na syntézu oboch komplexov bola použitá strieborná soľ kyseliny dichlóroctovej (Agdca). Postup na jej prípravu je preto uvedený v tejto podkapitole.

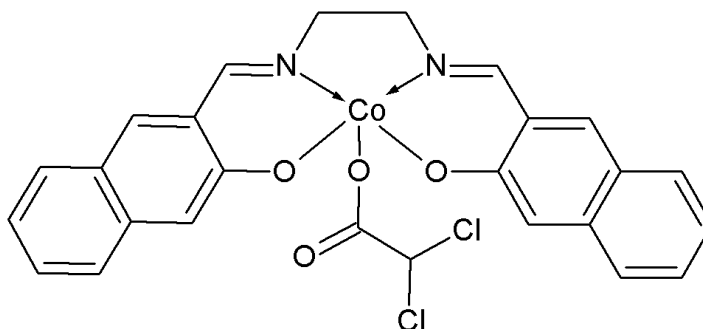
0,31 g (7,75 mmol) hydroxidu sodného bolo rozpustených v minimálnom množstve destilovanej vody. Ku tomuto roztoku bol pridaný 1 g (7,75 mmol) dichlóroctovej kyseliny. K zmesi bol pridaný vopred pripravený roztok 1,32 g (7,75 mmol) dusičnanu strieborného v minimálnom množstve destilovanej vody. Kvôli fotocitlivosti bola látka pripravovaná za obmedzeného prístupu svetla k reakčnej zmesi. Pripravený šedý prášok bol odsatý a uchovávaný v chladničke.



Obrázok 28: Strieborná soľ dichlóroctovej kyseliny

#### **Komplex CoP1**

200 mg (0,43 mmol) prekurzoru P1 bolo rozpustených v 25 ml metanolu. Roztok bol zmiešaný s roztokom 102 mg (0,43 mmol) striebranej soli dichlóroctovej kyseliny v 15 ml metanolu. Zmes bola refluxovaná po dobu 20 hodín. Následne bol odfiltrovaný vylúčený chlorid strieborný. Matečný roztok bol ponechaný voľnej kryštalizácii a jeho časť bola ponechaná kryštalizácii pomalým napaňovaním dietyléterom. Z kryštalizácie napaňovaním dietyléterom bolo izolované malé množstvo hnedých ihličkovitých kryštálov, z ktorých bola neskôr určená kryštalová štruktúra CoP1a ( $[\text{Co}_2(\text{nalen})_3]$ ,  $M_r = 1217,10$ ). Z izotermickej kryštalizácie bol izolovaný tmavohnedý mikrokryštalický prášok CoP1b ( $[\text{Co}(\text{nalen})(\text{dca})]$ ,  $M_r = 553,28$ ).



Obrázok 29: Predpokladaná štruktúra monoméru N, N'-bis(2-hydroxy-1-naftalidén)etyléndiamíndichlóracetátokobaltitého komplexu

Tabuľka 4: Elementárna analýza CoP1 ([Co(nalen)(dca)], C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>CoN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Mr = 553,28)

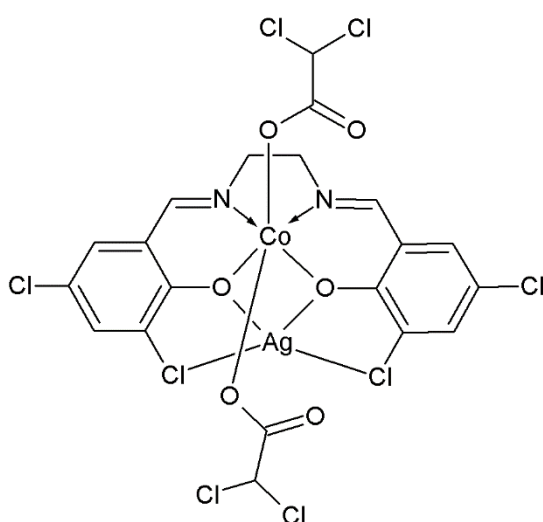
	C [%]	H [%]	N [%]
vypočítané	56,4	3,5	5,1
namerané	56,7	3,9	5,2
rozdiel	-0,3	-0,4	-0,1

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4,42 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,25 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, CH<sub>arom.</sub>), 7,53 (t, *J*=7,4 Hz, 2H, CH<sub>arom.</sub>), 7,72 (d, *J*=9,0 Hz, 2H, CH<sub>arom.</sub>), 7,80 (d, *J*=7,4 Hz, 3H, CH<sub>arom.</sub>), 7,93 (d, *J*=9,0 Hz, 2H, CH<sub>arom.</sub>), 8,27 (d, *J*=9,0 Hz, 2H, CH<sub>arom.</sub>), 9,12 (s, 2H, CHN) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 59,40 (C<sub>alif.</sub>), 108,45 (C<sub>arom.</sub>), 120,63 (C<sub>arom.</sub>), 122,76 (C<sub>arom.</sub>), 125,41 (C<sub>arom.</sub>), 126,99 (C<sub>arom.</sub>), 128,05 (C<sub>arom.</sub>), 129,13 (C<sub>arom.</sub>), 134,44 (C<sub>arom.</sub>), 135,57 (C<sub>arom.</sub>), 163,46 (C=N), 166,47 (C-O) ppm.

FTIR (ν<sub>ATR</sub>/cm<sup>-1</sup>): 3042m, 3019m, 2978m, 2938m, 2909m, 1698vs, 1666s, 1618vs, 1542s, 1506s, 1450s, 1434s, 1389s, 1355s, 1335s, 1304vs, 1250s, 1213m, 1184s, 1140m, 1103m, 1082m, 1059w, 1032m, 974m, 931w, 864w, 816s, 779m, 751m, 730w, 707w, 652m, 622w, 592w, 544w, 528w, 505w, 473w, 452w, 438w; 1698 a 1666 (OAc); 1629 a 1595 (C=N); 1584, 1542 a 1506 (C=C)<sub>aren.</sub>; 1304 (C-O)<sub>karb.kys.</sub>.

### Komplex CoP2

200 mg (0,40 mmol) prekursoru P2 bolo rozpustených v 25 ml metanolu. Roztok bol zmiešaný s roztokom 95 mg (0,40 mmol) striebornej soli dichlóroctovej kyseliny v 15 ml metanolu. Zmes bola refluxovaná po dobu 24 hodín. Následne bol odfiltrovaný vylúčený chlorid strieborný. Matečný roztok bol ponechaný voľnej



kryštalizácii a jeho časť bola daná do naparovania dietyléterom. Produktom boli hnedé veľmi jemné ihličkovité kryštály, ktoré boli izolované z izotermickej kryštalizácie z acetónu s hmotnosťou 0,08 g (výťažnosť 11,7 %).

Obrázok 30: Zobrazenie asymetrickej časti molekuly CoP2 bez kokryštalizovaného acetónu

Tabuľka 5: Elementárna analýza CoP2 ( $[\{\text{Co}(3,5\text{Cl-salen})(\text{dca})_2\text{Ag}\}_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ,  $\text{C}_{43}\text{H}_{32}\text{Ag}_2\text{Cl}_{16}\text{Co}_2\text{N}_4\text{O}_{13}$ ,  $M_r = 1713,59$ )

	C [%]	H [%]	N [%]
vypočítané	31,2	2,1	3,2
namerané	30,7	2,4	2,8
rozdiel	0,5	-0,3	0,4

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2,03$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 4,16 (s, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 6,13 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{dca}}$ ), 7,60 (d,  $J=2,7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7,69 (d,  $J=2,7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 8,37 (s, 2H, CHN) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 31,13$  ( $\text{C}_{\text{dca}}$ ), 59,30 ( $\text{C}_{\text{alif.}}$ ), 117,95 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 120,47 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128,07 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 132,50 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 133,72 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 158,59 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 168,70 ( $\text{C}-\text{O}$ ) ppm.

FTIR ( $\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3059m, 2997m, 2953m, 2918s, 2847m, 1742w, 1705s, 1672vs, 1656vs, 1642vs, 1587m, 1526m, 1509s, 1445vs, 1413s, 1376s, 1347s, 1325s, 1306vs, 1214s, 1196s, 1175s, 1085m, 1049m, 966w, 933w, 899w, 867m, 814m, 779m, 761m, 747m, 719m, 694w, 657m, 609w, 551w, 528w, 503w, 460w, 436w; 1705 a 1672 (OAc); 1656 a 1642 ( $\text{C}=\text{N}$ ); 1347 ( $\text{C}-\text{O}$ )<sub>karb.kys.</sub>



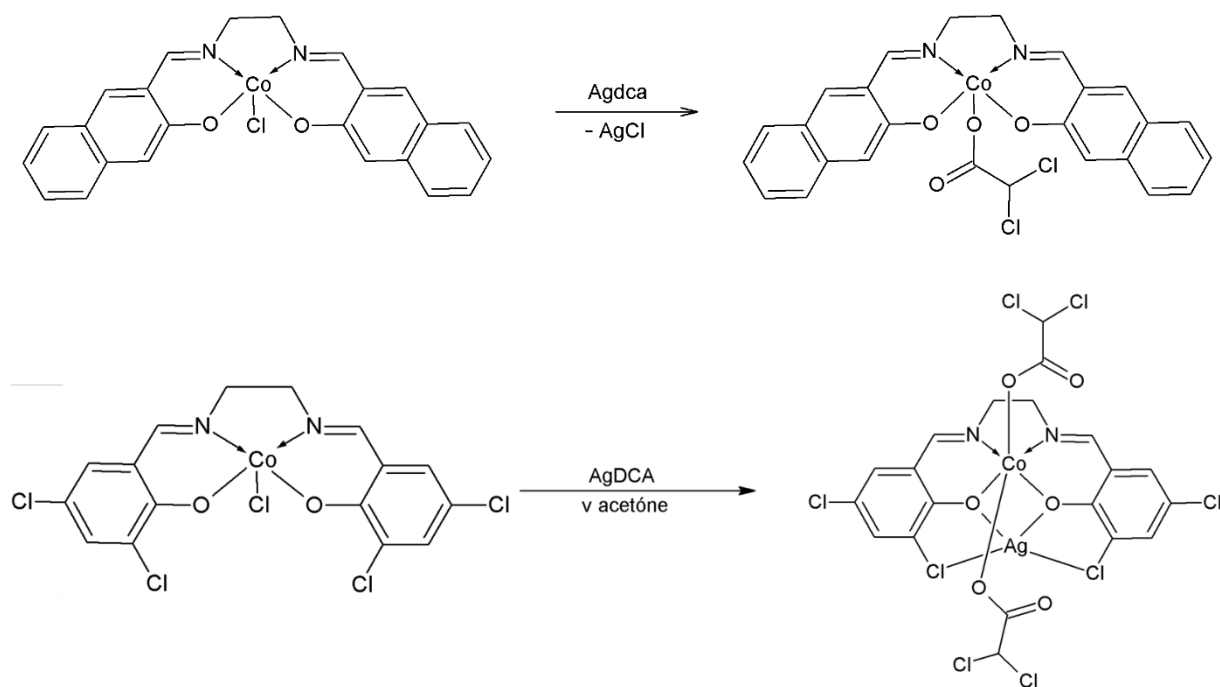
## 4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1. Syntéza

Postupmi popísanými v experimentálnej časti boli pripravené dva prekurzory Co<sup>III</sup> komplexov, N, N'-bis(2-hydroxy-1-naftalidén)etyléndiamínchloridokobaltitý komplex a N, N'-bis(3,5-dichlorosalicylidén)etyléndiamínchloridokobaltitý komplex. Prekurzor P1 je dobre rozpustný v acetóne, dichlórmetáne, DMSO, chloroforme, metanole a vo vode, zatiaľ čo P2 je dobre rozpustný v DMSO a metanole a obmedzene rozpustný v acetóne a vo vode. Prekurzory boli následne použité na syntézu komplexov CoP1 a CoP2. Ku syntéze bola použitá pripravená strieborná soľ kyseliny dichlóroctovej podľa vyššie popísaného postupu (viď Experimentálna časť).

Popísaná príprava Co<sup>III</sup> komplexov neobsahuje medzikrok prípravy samostatných Schiffových báz ako ligandov, pretože pri takto zvolenom postupe sa nepodarilo pripraviť žiadané prekurzory. Takto pripravené prekurzory nepreukazovali dostatočnú čistotu pre ďalšie kroky syntézy.

Z prekurzorov P1 a P2 boli konečné komplexy pripravené reakciou s ekvimolárnym množstvom striebornej soli dichlóroctovej kyseliny v minimálnom množstve metanolu. Rozpustením prekurzorov v metanole vznikli tmavohnedé roztoky, ktoré po pridaní striebornej soli dichlóroctovej kyseliny rozpustenej v metanole nezmenili svoje zafarbenie. Po pár hodinách refluxu bol v roztokoch viditeľne pozorovateľný vylúčený chlorid strieborný. Po jeho odsatí sa po rekryštalizácii z oboch roztokov vylúčili ihličkovité kryštály. Kryštály komplexu CoP1 sa vylúčili približne po 2 dňoch vo vzorke v naparovaní dietyléterom (CoP1a frakcia), vo vzorke kryštalizovanej izotermickou kryštalizáciou (CoP1b frakcia) približne až po 2 týždňoch. Rozdielne zloženie týchto dvoch frakcií bolo zistené ich fyzikálne-chemickou charakterizáciou. Kryštály komplexu CoP2 sa vylúčili až po druhom rekryštalizovaní (prvá rekryštalizácia v metanole, druhá v acetóne) izotermickou kryštalizáciou približne po 3 týždňoch, vo vzorke v naparovaní dietyléterom neboli pozorované žiadne vylúčené kryštály (vzorka zostala vo forme roztoku).



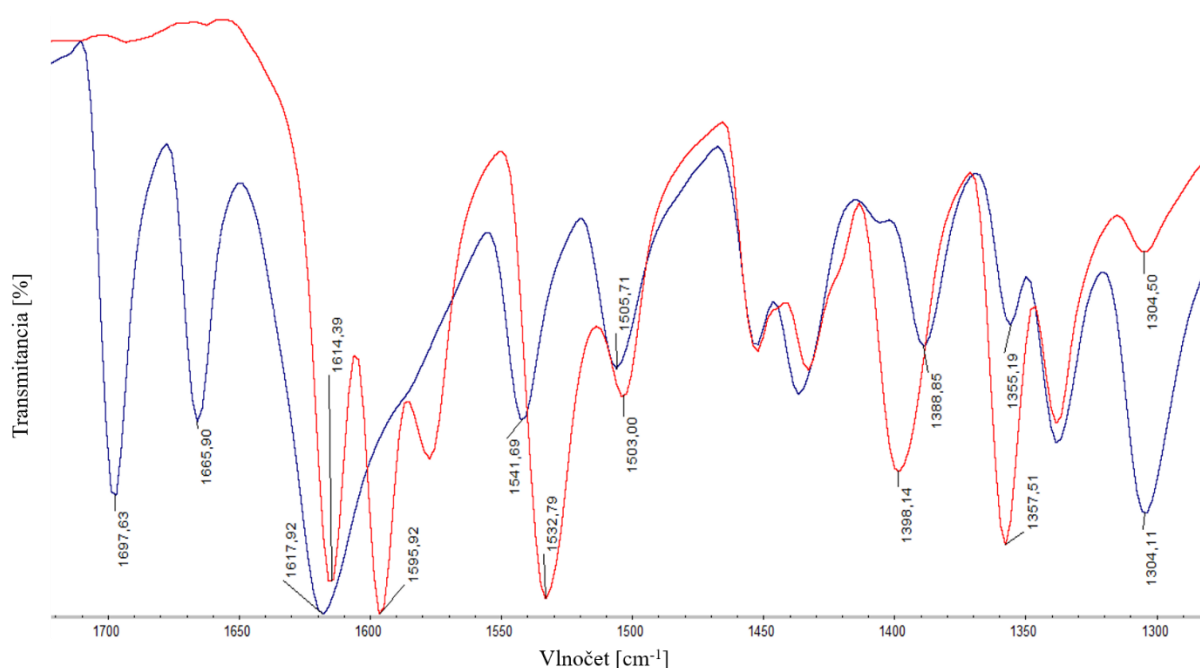
Obrázok 31: Schémy prípravy komplexov CoP1b a CoP2

#### **4.2. Spektrálne a elektrochemické metódy**

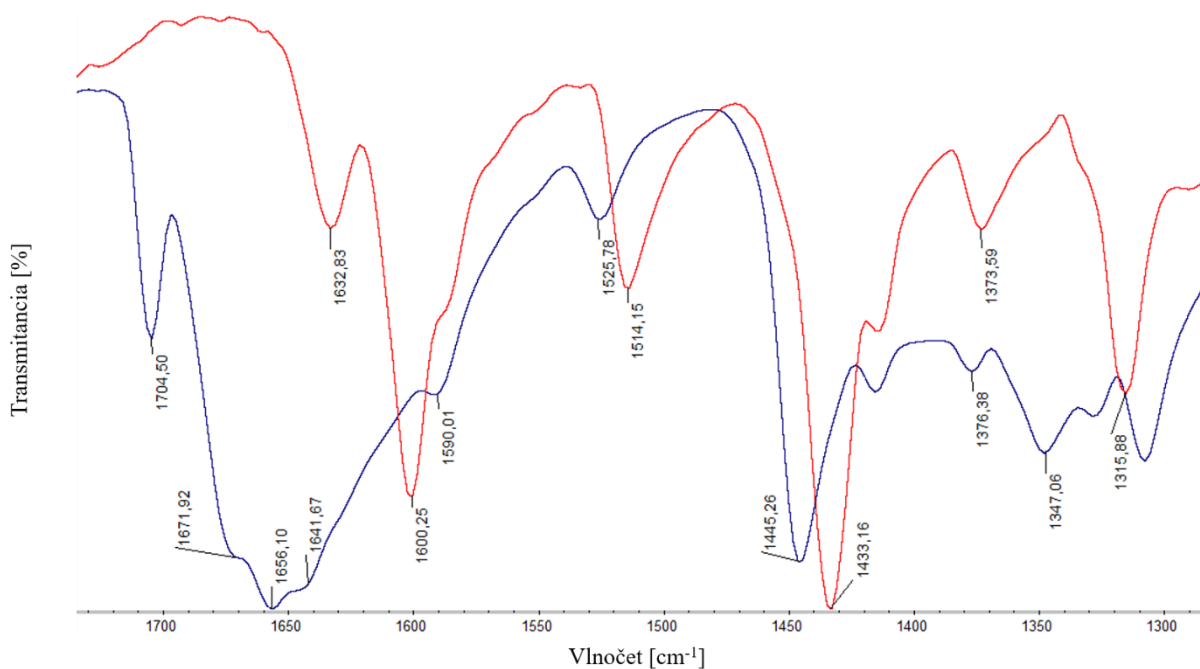
Všetky pripravené látky mali zmerané percentuálne zastúpenie prvkov C, H, N elementárnou analýzou. Odchýlky vypočítaného zloženia od nameraného sa u pripravených prekurzorov a komplexov neodlišovali o viac ako 0,5 %. U komplexu CoP1b je možné na základe nameraných hodnôt predpokladať zloženie zodpovedajúce vzorcu  $[\text{Co}(\text{nalen})(\text{dca})]$ . V prípade komplexu CoP2 boli namerané hodnoty, z ktorých je možné predpokladať rovnaké zloženie ako bolo určené röntgenovou štruktúrnou analýzou, tetramér  $[\{\text{Co}(\text{3,5Cl-salen})(\text{dca})_2\text{Ag}\}_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ . U prekurzorových zlúčenín P1 a P2 a tak isto aj u CoP1b komplexu neboli pripravené vhodné monokryštály na určenie kryštálovej štruktúry pomocou RTG difrakčnej analýzy. Na základe ich zloženia a z dôvodu, že pre salen komplexy Co(III) nebola publikovaná kryštálová štruktúra obsahujúca pentakoordinovaný Co(III) atóm, je oprávnené domnievať sa, že ich štruktúra je dimérna ako v prípade  $[\{\text{Co}(\text{salen})\text{Cl}\}_2] \cdot 2\text{CHCl}_3$  [96] a  $[\{\text{Co}(\text{salen})\text{N}_3\}_2] \cdot 2\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [97].

Na charakterizáciu komplexov CoP1a a CoP2 boli použité  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie, pre komplex CoP1a vrátane 2D merania. V prípade oboch komplexov boli identifikované všetky príslušné vodíkové a uhlíkové atómy Schiffových báz a u komplexu CoP2 dokázaná prítomnosť dichloroacetátového aniónu.

Komplexy P1, P2, CoP1b a CoP2 boli charakterizované pomocou infračervenej spektrometrie (hodnoty vlnočtov vibračných píkov sú uvedené v Experimentálnej časti). Pri porovnaní spektier prekursoru s príslušným komplexom bola u oboch komplexov preukázaná prítomnosť monodentátne viazaného dichloracetátového aniónu pri charakteristických vibráciách v oblasti 1700-1640  $\text{cm}^{-1}$ , čím bolo potvrdené naviazanie danej skupiny na jednotlivé prekursor. V prípade komplexu CoP2 je táto oblasť výrazne bohatšia, čo korešponduje s dvoma rôzne naviazanými dca ligandmi (monodentátne a mostíkujúco, 1672 – 1642  $\text{cm}^{-1}$ ), ktoré sú navyše zapojené do série vnútramolekulových a medziramolekulových nekovalentných interakcií (viď popis štruktúr nižšie) a tiež kokryštalizovaných molekúl acetónu (1705  $\text{cm}^{-1}$ ). Charakteristické píky vibrácií pri vlnočte približne 1600  $\text{cm}^{-1}$  možno priradiť C=N väzbám Schiffovej bázy tetradentátnych ligandov. Pri prekursoru P1 a komplexe CoP1b boli pozorované aj výrazné píky v oblasti približne 830-735  $\text{cm}^{-1}$ , ktoré možno priradiť mimorovinným Ar-H vibráciám naftalénových kruhov.

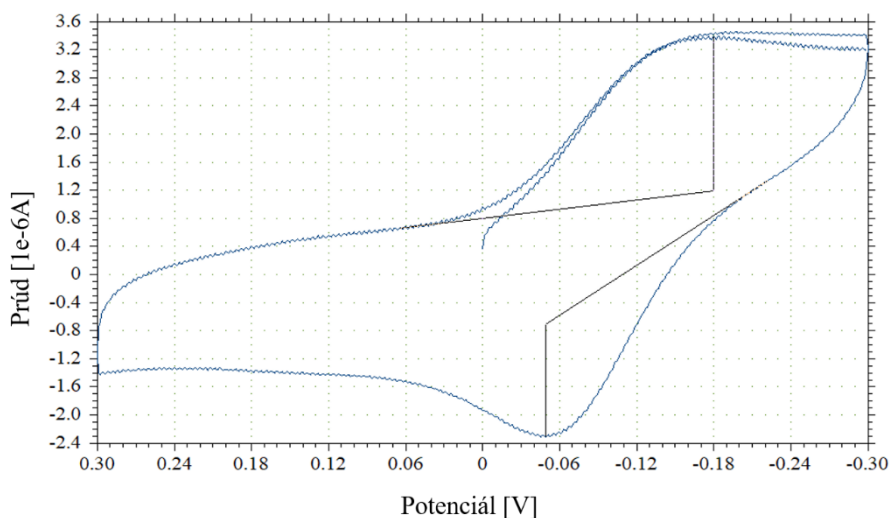


Obrázok 32: Porovnanie IČ spektier prekursoru P1 a komplexu CoP1b



Obrázok 33: Porovnanie IČ spektier prekursoru P2 a komplexu CoP2

Reverzibilita redoxných reakcií komplexu CoP1a bola zisťovaná cyklickou voltametrou. Na meranie bol použitý  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  roztok komplexu v acetonitrile. U tohto komplexu je možné na základe rozdielu potenciálov celého systému nameraných pri katodickej redukcii ( $-0,049 \text{ V}$ ) a anodickej oxidácii ( $-0,180 \text{ V}$ ) určiť, že sa kvôli rozdielu väčšiemu ako  $0,057 \text{ V}$  ( $0,131 \text{ V}$ ) jedná o kvázi reverzibilný dej. Je pojednávané o celom systéme, pretože nie je možné s istotou určiť, či ide o redukciu a následnú reoxidáciu práve  $\text{Co}^{3+}$  iónu alebo iného atómu danej zlúčeniny.

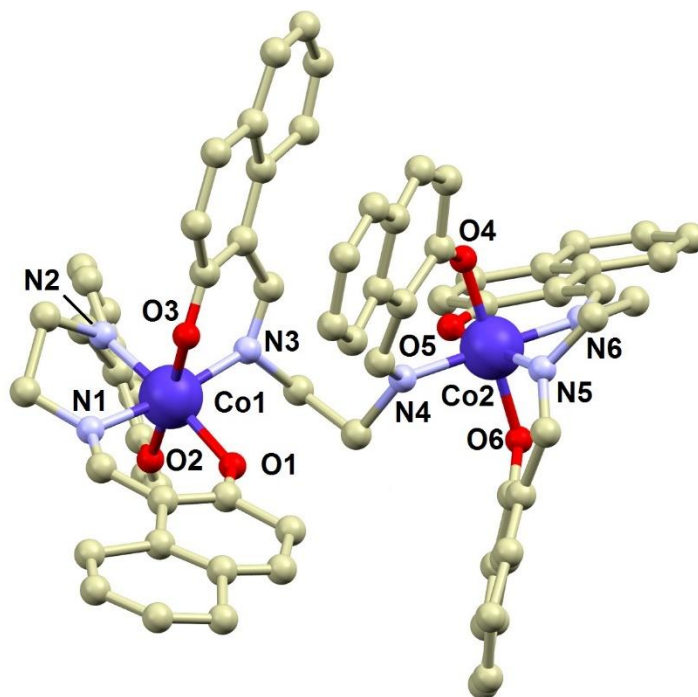


Obrázok 34: Cyklický voltamogram komplexu CoP1

### 4.3. Kryštalová štruktúra

Pre komplexy CoP1a CoP2 bola nameraná pomocou röntgenovej monokryštalovej difrakčnej analýzy ich kryštalová štruktúra.

Monokryštalovou RTG difrakčnou analýzou bola stanovená dimérna štruktúra komplexu CoP1a -  $[\text{Co}_2(\text{nalen})_3]$ , kde  $\text{H}_2\text{nalen}$  je Schiffova báza N, N'-bis(2-hydroxy-1-naftalidén)etyléndiamín. Zlúčenina kryštalizuje v triklinickej priestorovej grupe  $P-1$ . Kryštály tejto látky boli veľmi tenké (0,02x0,02x0,12 mm) zle difraktujúce ihličky. Štruktúra tejto látky má preto značne zníženú presnosť mriežkových parametrov a väzobných dĺžok (vid' Tabuľka 6). Tento komplex pozostáva z dvoch centrálnych atómov Co(III), pričom oba sú koordinované dvoma atómami kyslíku a dvoma atómami dusíku z  $\text{nalen}^{2-}$  ligandu. Tretí ligand  $\text{nalen}^{2-}$  pôsobí ako mostíkový ligand nakoľko koordinuje každý centrálny atóm bidentátne, vždy pomocou N, O – dvojice donorových atómov (vid' Obrázok 35). Tvar koordinačného polyédrov je u oboch centrálnych atómov deformovaný oktaéder. Väzobné dĺžky kov – ligand zodpovedajú nízkospinovému stavu centrálnych Co(III) ( $t_{2g}^6$ ), pričom nadobúdajú veľmi podobné hodnoty  $d(\text{Co-N}) = 1,88 - 1,90 \text{ \AA}$ ,  $d(\text{Co-O}) = 1,89 - 1,97 \text{ \AA}$  uvedené v [98].

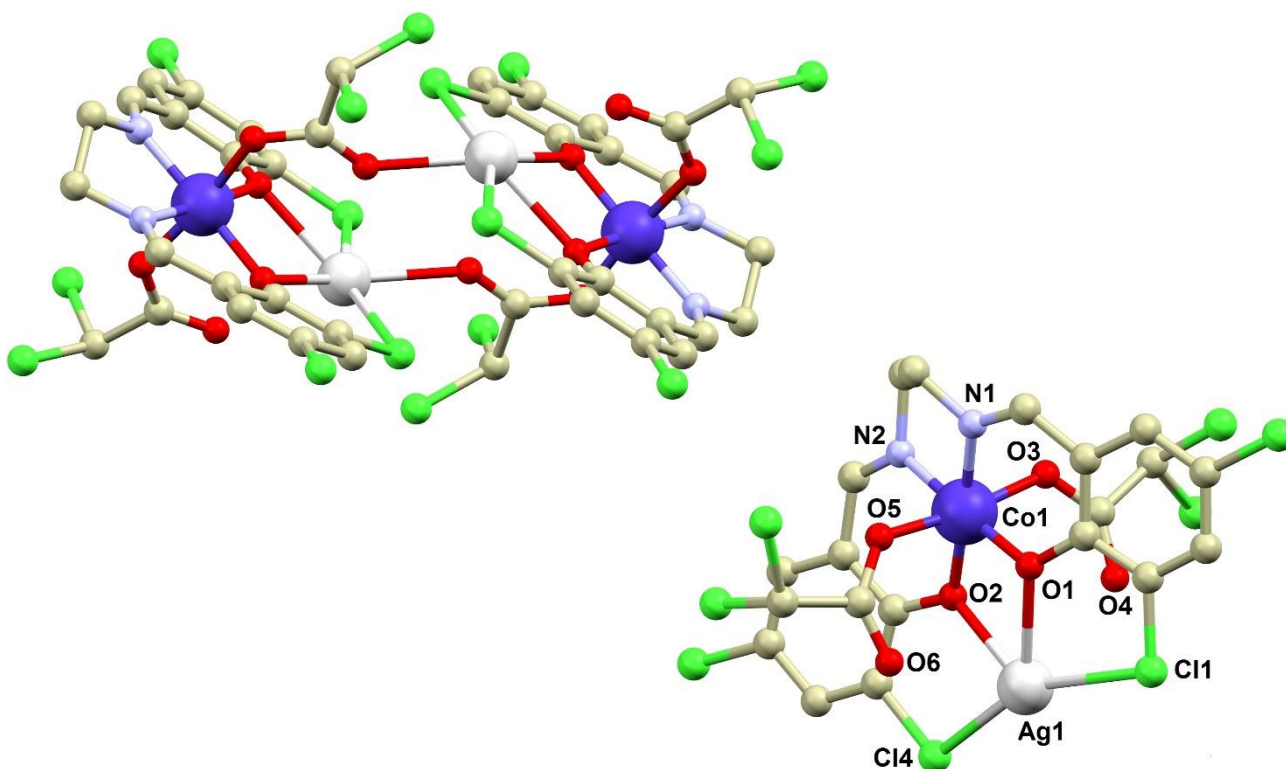


Obrázok 35: Molekulová štruktúra komplexu CoP1a (vodíkové atómy nie sú zobrazené kvôli prehľadnosti; farebná legenda atómov: sivá - C, červená - O, svetlomodrá - N, tmavomodrá - Co)

Tabuľka 6: Základné kryštalografické dáta a väzobné dĺžky komplexu CoP1a

Priestorová grupa	<i>P</i> -1	Co1-N1 [Å]	1,80(4)
<i>a</i> [Å]	12,47(2)	Co1-N2 [Å]	1,86(3)
<i>b</i> [Å]	16,43(3)	Co1-N3 [Å]	1,85(4)
<i>c</i> [Å]	17,56(2)	Co1-O1 [Å]	1,88(2)
$\alpha$ [°]	67,00(4)	Co1-O2 [Å]	1,89(3)
$\beta$ [°]	69,38(4)	Co1-O3 [Å]	1,85(3)
$\gamma$ [°]	86,38(4)	Co2-N4 [Å]	1,91(4)
<i>V</i> [Å <sup>3</sup> ]	3088,00(8)	Co2-N5 [Å]	1,84(2)
<i>T</i> [K]	295(2)	Co2-N6 [Å]	1,95(4)
		Co2-O4 [Å]	1,86(3)
		Co2-O5 [Å]	1,88(2)
		Co2-O6 [Å]	1,90(2)

Komplexu CoP2 bola pomocou monokryštálovej RTG difrakčnej analýzy určená tetramérna štruktúra  $[\{\text{Co}(3,5\text{Cl-salen})(\text{dca})_2\text{Ag}\}_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , kde  $\text{H}_23,5\text{Cl-salen}$  je Schiffova báza N, N'-bis(3,5-dichlorosalicylidén)etyléndiamín a  $\text{dca}^-$  je dichlóracetátový anión. V štruktúre komplexu je kokryštalizovaný acetón (2 molekuly acetónu na tetramér), ktorý bol použitý ako rozpúšťadlo pri rekryštalizácii. Zlúčenina kryštalizuje v monoklinickej priestorovej grupe  $P2_1/c$ . Molekulová štruktúra je centrosymetrická a teda len časť  $[\text{Co}(3,5\text{Cl-salen})(\text{dca})_2\text{Ag}]$  je symetricky nezávislá. Jej mriežkové parametre a jednotlivé dĺžky väzieb sú uvedené v Tabuľke 7. Tvar koordinačného polyédru je u oboch centrálnych atómov Co(III) deformovaný oktaéder. Tento komplex pozostáva z dvoch centrálnych atómov Co(III), pričom oba sú koordinované dvoma atómami dusíku a dvoma atómami kyslíku z ligandu  $3,5\text{Cl-salen}^{2-}$  a dvoma atómami kyslíku dvoch dichlóacetátových ligandov (viď Obrázok 36). Atómy kyslíkov ligandov  $3,5\text{Cl-salen}^{2-}$  a  $\text{dca}^-$  vystupujú ako mostíkujúce atómy koordinovaných atómov striebra, ktoré intramolekulárne interagujú s atómami chlóru ligandu  $3,5\text{Cl-salen}^{2-}$  v polohách 3. Väzbové dĺžky kov – ligand zodpovedajú nízkospinovému stavu centrálnych atómov Co(III) ( $t_{2g}^6$ ), pričom rovnako ako komplex CoP1a nadobúdajú veľmi podobné hodnoty  $d(\text{Co-N}) = 1,88 - 1,90 \text{ \AA}$ ,  $d(\text{Co-O}) = 1,89 - 1,97 \text{ \AA}$  uvedené v [98].



Obrázok 36: Molekulová štruktúra (vľavo) a asymetrická jednotka (vpravo) komplexu CoP2 (vodíkové atómy a molekuly rozpúšťadla nie sú zobrazené kvôli prehľadnosti; farebná legenda atómov: sivá - C, červená - O, svetlomodrá - N, tmavomodrá – Co, zelená – Cl, biela - Ag)

Tabuľka 7: Základné kryštálografické dáta a väzobné dĺžky (vrátane nekovalentných interakcií Ag) komplexu CoP2

<i>Priestorová grupa</i>	$P2_1/c$	Co-O1 [Å]	1,901(4)
<i>a</i> [Å]	9,947(3)	Co-O2 [Å]	1,900(5)
<i>b</i> [Å]	19,504(7)	Co-O3 [Å]	1,909(4)
<i>c</i> [Å]	16,530(5)	Co-O5 [Å]	1,897(5)
$\alpha$ [°]	90	Co-N1 [Å]	1,903(6)
$\beta$ [°]	93,976(14)	Co-N2 [Å]	1,896(6)
$\gamma$ [°]	90	Ag1-O1 [Å]	2,401(4)
<i>V</i> [Å <sup>3</sup> ]	3199,2(18)	Ag1-O2 [Å]	2,417(4)
<i>T</i> [K]	295(2)	Ag1-O4 [Å]	2,905(5)
		Ag1-Cl1 [Å]	2,853(2)
		Ag1-Cl4 [Å]	2,829(2)

## 5. ZÁVER

Teoretická časť tejto práce bola zameraná na rešerš o biologicky aktívnych zlúčeninách kobaltu v oxidačnom stave III, redoxných procesoch v organizme a najmä na hypoxiu a ňou aktivovaný transport biologicky aktívnych ligandov.

Praktická časť sa zaoberá syntézou prekursorov P1 a P2, N, N'-bis(2-hydroxy-1-naftalidén)etyléndiamínchloridokobaltitého a N, N'-bis(3,5-dichlorosalicylidén)etyléndiamínchloridokobaltitého komplexu. Tie boli následne použité na prípravu komplexov CoP1a, CoP1b a CoP2 použitím pripravenej striebornej soli dichlórooctovej kyseliny (Agdca). Boli pripravené komplexy o zložení  $[\text{Co}_2(\text{nalen})_3]$  (CoP1a),  $[\text{Co}(\text{nalen})(\text{dca})]$  (CoP1b) a  $[\{\text{Co}(\text{3,5Cl-salbn})(\text{dca})_2\text{Ag}\}_2] \cdot 2(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  (CoP2), ktoré boli následne charakterizované analytickými metódami. Elementárna analýza preukázala dostačujúcu čistotu pripravených látok vzhľadom ku ich zloženiu (odchýlky nameraných hodnôt sa od vypočítaných nelíšili o viac ako 0,5 %). NMR spektrometriou boli priradené jednotlivé vodíkové a uhlíkové atómy štruktúram komplexov CoP1a a CoP2. Na základe EA a NMR analýzy je možné určiť prítomnosť ligandu dca u komplexu CoP1b, čo bolo potvrdené aj IČ spektrometriou. Pre komplex CoP1a bolo prevedené meranie cyklickej voltametrie, kde je na základe rozdielu redoxných potenciálov odčítaných z voltamogramu možné tvrdiť, že sa jedná o kvázi reverzibilný dej. Kryštalová štruktúra komplexov CoP1a a CoP2 bola stanovená RTG štruktúrnou analýzou, z ktorej bola zistená diména štruktúra komplexu CoP1a a tetraména štruktúra komplexu CoP2, ktorý v molekulovej štruktúre obsahuje dva atómy striebra, kovalentne naviazané na atómy kyslíku Schiffovej bázy a ligandu dca a nekovalentne interagujúce s atómami chlóru Schiffovej bázy a dca ligandu. Oba komplexy vykazovali dobrú rozpustnosť vo vode, vďaka čomu môžu potenciálne vykazovať biologickú dostupnosť.



## 6. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ALDERDEN, R. A. a kol.: The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*. **2006**, 83, 728.
2. ROSENBERG, B. a kol.: The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds. *Cancer Research*. **1970**, 30, 1799-1802.
3. MARLOYE, M. a kol.: A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. *Future Medicinal Chemistry*. **2016**, 8, 2263-2286.
4. MUNTEANU, C. R. a kol.: Advances in cobalt complexes as anticancer agents. *Dalton Trans*. **2015**, 44, 13796-13808.
5. VAN RIJT, S. H. a kol.: Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*. **2009**, 14, 1089-1097.
6. SADLER, P. J.: The biological chemistry of gold: A Metallo-drug and heavy-atom label with variable valency. *Biochemistry*. **1976**, 171-214.
7. YILDIZ, Y.: General Aspects of the Cobalt Chemistry. *InTech*, **2017**.
8. GIELEN, M. a kol.: Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine. Hoboken, N.J.: Wiley, **2005**, 201-214.
9. KAMENÍČEK, J. a kol.: Anorganická chemie. 4. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, **2009**, 269-274.
10. HOUSECROFT, C. E. a kol.: Anorganická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, **2014**, 738-742.
11. KHAN, A. G. a kol.: Woodward's synthesis of vitamin B12. *Resonance*. **2003**, 8, 8-16.
12. RANDACCIO, L. a kol.: Vitamin B12: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins. *Molecules*. **2010**, 15, 3228-3259.
13. ESCHENMOSER, A. a kol.: Natural Product Synthesis and Vitamin B12. *Science*. **1977**, 196, 1410-1420.

14. WOODWARD, R. B.: The total synthesis of vitamin B12. *Pure and Applied Chemistry*. **1973**, *33*, 145-177.
15. BROWN, K. L.: Chemistry and Enzymology of Vitamin B12. *Chemical Reviews*. **2005**, *105*, 2075-2150.
16. KRÄUTLER, B.: Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society Transactions*. **2005**, *33*, 806-810.
17. HEFFERN, M. C. a kol.: Cobalt derivatives as promising therapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2013**, *17*, 189-196.
18. EPSTEIN, S. P. a kol.: Efficacy of topical cobalt chelate CTC-96 against adenovirus in a cell culture model and against adenovirus keratoconjunctivitis in a rabbit model. *BMC Ophthalmology*. **2006**, *6*, 22.
19. EPSTEIN, S. P. a kol.: Efficacy of Cobalt Chelates in the Rabbit Eye Model for Epithelial Herpetic Keratitis. *Cornea*. **1998**, *17*, 550-557.
20. SCHWARTZ, J. A. a kol.: Herpes Simplex Virus Type 1 Entry Is Inhibited by the Cobalt Chelate Complex CTC-96. *Journal of Virology*. **2001**, *75*, 4117-4128.
21. LOUIE, A. Y. a kol.: A cobalt complex that selectively disrupts the structure and function of zinc fingers. *Proceeding of National Academy of Sciences*. **1998**, *95*, 6663-6668.
22. GESSNER, R. V. a kol.: Structural basis for stabilization of Z-DNA by cobalt hexaammine and magnesium cations. *Biochemistry*. **1985**, *35*, 273-279.
23. DELEHANTY, J. B. a kol.: Antiviral properties of cobalt(III)-complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, *16*, 830-837.
24. CÍGLER, P. a kol.: From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2005**, *102*, 15394-15399.
25. ŘEZÁČOVÁ, P. a kol.: Design of HIV Protease Inhibitors Based on Inorganic Polyhedral Metallacarboranes. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, *52*, 7132-7141.

26. CHANG, E. L. a kol.: Cobalt complexes as antiviral and antibacterial agents. *Pharmaceuticals*. **2010**, *3*, 1711-1728.
27. KAYA, M. a kol.: Synthesis, spectral, thermal and biological studies of Co(III) and binuclear Ni(II) complexes with a novel amine-imine-oxime ligand. *Russian Journal of General Chemistry*. **2008**, *78*, 1808-1815.
28. EL-AYAAN, U. a kol.: Synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling of cobalt and nickel complexes containing the bulky ligand: bis[N-(2,6-diisopropylphenyl)imino]acenaphthene. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2005**, *40*, 1214-1221.
29. KUMAR, R. S. a kol.: Synthesis, micellar properties, DNA binding and antimicrobial studies of some surfactant-cobalt(III) complexes. *Biophysical Chemistry*. **2008**, *136*, 136-144.
30. NAGABABU, P. a kol.: Studies on antimicrobial activity of cobalt(III) ethylenediamine complexes. *Canadian Journal of Microbiology*. **2006**, *52*, 1247-1254.
31. MISHRA, A. a kol.: Synthesis, characterization and antibacterial activity of cobalt(III) complexes with pyridine-amide ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, *43*, 2189-2196.
32. MURUKAN, B. a kol.: Synthesis, characterization and antibacterial properties of some trivalent metal complexes with [(2-hydroxy-1-naphthaldehyde)-3-isatin]-bishydrazone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2008**, *22*, 65-70.
33. KESKIOĞLU, E. a kol.: Cr(III), Fe(III) and Co(III) complexes of tetradentate (ONNO) Schiff base ligands: Synthesis, characterization, properties and biological activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2008**, *70*, 634-640.
34. SHARMA, V. K. a kol.: Synthesis, magnetic and spectral studies of chromium(III), manganese(III), iron(III) and cobalt(III) complexes of thiosemicarbazones derived from benzil  $\alpha$ -monoxime and unsubstituted/substituted thiosemicarbazides as biological agents. *Journal of Coordination Chemistry*. **2008**, *61*, 178-191.

35. POYRAZ, M. a kol.: Synthesis, crystal structure and biological activity of 1-(1H-benzoimidazol-2-yl)-ethanone thiosemicarbazone and its cobalt complex. *Polyhedron*. **2008**, *27*, 2091-2096.
36. MIODRAGOVIĆ, D. U. a kol.: Interesting coordination abilities of antiulcer drug famotidine and antimicrobial activity of drug and its cobalt(III) complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2006**, *100*, 1568-1574.
37. HAMURCU, F. a kol.: The synthesis, characterization and antimicrobial activity of N, N'-bis(2-thiophenecarboxamido)-1,3-diaminopropane and N,N'-bis (2-furancarboxamido)-1,3-diaminopropane and their Cu(II), Zn(II), Co(III) complexes. *Transition Metal Chemistry*. **2008**, *33*, 137-141.
38. TODOROVIĆ, T. R. a kol.: Synthesis, characterization and biological activity evaluation of Pt(II), Pd(II), Co(III) and Ni(II) complexes with N-heteroaromatic selenosemicarbazones. *Inorganica Chimica Acta*. **2009**, *362*, 3813-3820.
39. NAVANEETHA, N. a kol.: Study of the spectroscopic characteristics of methyl (ligand) cobaloximes and their antibacterial activity. *Journal of Chemical Sciences*. **2007**, *119*, 29-34.
40. HALL, M. D. a kol.: Bioreductive activation and drug chaperoning in cobalt pharmaceuticals. *Dalton Transactions*. **2007**, 3983-3990.
41. DWYER, F. P. a kol.: Biological Activity of Complex Ions. *Nature*. **1952**, *170*, 190-191.
42. GO, Y. a kol.: Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **2008**, *1780*, 1273-1290.
43. JUNGWIRTH, U. a kol.: Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. *Antioxidants & Redox Signaling*. **2011**, *15*, 1085-1127.
44. TRACHOOTHAM, D. a kol.: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2009**, *8*, 579-591.
45. VALKO, M. a kol.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. **2006**, *160*, 1-40.

46. LIU, Y. a kol.: Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*. **2002**, *80*, 780-787.
47. GUPTE, A. a kol.: Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*. **2009**, *35*, 32-46.
48. HEFFETER, P. a kol.: Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities. *Drug Resistance Updates*. **2008**, *11*, 1-16.
49. WARDMAN, P. a kol.: Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research*. **1996**, *145*, 523-531.
50. LIOCHEV, S. I.: The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Metal Ions*. **1999**, *36*, 1-39.
51. RHEE, S. G. a kol.: Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. **2005**, *38*, 1543-1552.
52. PRIES, A. R. a kol.: Structural Adaptation and Heterogeneity of Normal and Tumor Microvascular Networks. *PLoS Computational Biology*. **2009**, *5*, 1-11.
53. DEWHIRST, M. W. a kol.: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer*. **2008**, *8*, 425-437.
54. WILSON, W. R. a kol.: Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. **2011**, *11*, 393-410.
55. DE SOUZA, I. C. A. a kol.: Investigation of cobalt( iii )-triazole systems as prototypes for hypoxia-activated drug delivery. *Dalton Transactions*. **2016**, *45*, 13671-13674.
56. GRAEBER, T. G. a kol.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. **1996**, *379*, 88-91.
57. ERLER, J. T. a kol.: Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Molecular and Cellular Biology*. **2004**, *24*, 2875–2889.

58. CAIRNS, R. A. a kol.: Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. **2011**, *11*, 85-95.
59. GUZY, R. D. a kol.: Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*. **2005**, *1*, 401-408.
60. BRISTOW, R. G. a kol.: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer*. **2008**, *8*, 180-192.
61. RALEIGH, S. M. a kol.: Involvement of human cytochromes P450 (CYP) in the reductive metabolism of AQ4N, a hypoxia activated anthraquinone DI-N-oxide prodrug. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*. **1998**, *42*, 763-767.
62. COLUCCI, M. A. a kol.: Natural and synthetic quinones and their reduction by the quinone reductase enzyme NQO1: from synthetic organic chemistry to compounds with anticancer potential. *Org. Biomol. Chem*. **2008**, *6*, 637-656.
63. SEMENZA, G. L.: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. **2003**, *3*, 721-732.
64. POON, E. a kol.: Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **2009**, *11*, 1-23.
65. TU, B. P. a kol.: The FAD- and O<sub>2</sub>-Dependent Reaction Cycle of Ero1-Mediated Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Cell*. **2002**, *10*, 983-994.
66. KOUMENIS, C.: "Translating" Tumor Hypoxia: Unfolded Protein Response (UPR)-Dependent and UPR-Independent Pathways. *Molecular Cancer Research*. **2006**, *4*, 423-436.
67. DENNY, W. A.: Prodrug strategies in cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2001**, *36*, 577-595.
68. OTT, I. a kol.: Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs. *Archiv der Pharmazie*. **2007**, *340*, 117-126.
69. BLOWER, P. J. a kol.: Towards new transition metal-based hypoxic selective agents for therapy and imaging. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2001**, *85*, 15-22.

70. RALHAN, R. a kol.: Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2007**, *17*, 1061-1075.
71. SINGH, R. K. a kol.: Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2018**, *151*, 401-433.
72. TERCEL, M. a kol.: Hypoxia-Selective Antitumor Agents. 16. Nitroarylmethyl Quaternary Salts as Bioreductive Prodrugs of the Alkylating Agent Mechlorethamine. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2001**, *44*, 3511-3522.
73. DENNY, W. A.: Nitrobenzyl mustard quaternary salts: A new class of hypoxia-selective cytotoxins capable of releasing diffusible cytotoxins on bioreduction. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*. **1994**, *29*, 317-321.
74. SUN, Z. a kol.: Sulfoxide-Containing Aromatic Nitrogen Mustards as Hypoxia-Directed Bioreductive Cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2000**, *43*, 4160-4168.
75. GROOT, F. a kol.: Anticancer Prodrugs for Application in Monotherapy Targeting Hypoxia, Tumor-Associated Enzymes, and Receptors. *Current Medicinal Chemistry*. **2001**, *8*, 1093-1122.
76. MCKEAGE, M. J. a kol.: A phase I trial of PR-104, a pre-prodrug of the bioreductive prodrug PR-104A, given weekly to solid tumour patients. *BMC Cancer*. **2011**, *11*, 1-12.
77. TEICHER, B. A. a kol.: Cytotoxicity, radiosensitization, antitumor activity, and interaction with hyperthermia of a Co(III) mustard complex. *Cancer Research*. **1990**, *50*, 6971-6975.
78. BRAHIMI-HORN, M. C. a kol.: Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*. **2011**, *21*, 67-72.
79. SWIETACH, P. a kol.: Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer and Metastasis Reviews*. **2007**, *26*, 299-310.
80. DEBERARDINIS, R. J. a kol.: The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*. **2008**, *7*, 11-20.

81. CHICHE, J a kol.: Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH. *Cancer Research*. **2009**, *69*, 358-368.
82. MARESCA, A. a kol.: Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors#. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3057–3062.
83. ANGAPELLY, S. a kol.: Sulfocoumarin-, Coumarin-, 4-Sulfamoylphenyl-Bearing Indazole-3-carboxamide Hybrids: Synthesis and Selective Inhibition of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes IX and XII. *ChemMedChem*. **2017**, *12*, 1578-1584.
84. VAN MUNSTER, E. B. a kol.: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). RIETDORF, Jens, ed. *Microscopy Techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, **2005**, 143-175.
85. BANSAL, S. S. a kol.: Advanced Drug Delivery Systems of Curcumin for Cancer Chemoprevention. *Cancer Prevention Research*. **2011**, *4*, 1158-1171.
86. YAMAMOTO, N. a kol.: Cellular uptake and distribution of cobalt complexes of fluorescent ligands. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **2008**, *13*, 861-871.
87. BONNET, S. a kol.: A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*. **2007**, *11*, 37-51.
88. ELSTROM, R. L. a kol.: Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cancer Research*. **2004**, *64*, 3892-3899.
89. KIRSTEN, W. J.: *Organic elemental analysis: ultramicro, micro, and trace methods*. New York: Academic Press. **1983**.
90. Trávníček, Z. a kol.: *Spektrální metody studia chemických látek*. Univerzita Palackého v Olomouci. **2011**, 62-84.
91. KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, **2003**, 92-95.
92. Trávníček, Z. a kol.: *Spektrální metody studia chemických látek*. Univerzita Palackého v Olomouci. **2011**, 24-37.



93. KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, **2003**, 84-89.
94. SKOOG, D. A. a kol.: *Principles of instrumental analysis*. Philadelphia: Saunders College, **1980**, 622-625.
95. PUTNIS, A.: *Introduction to mineral sciences*. New York: Cambridge University Press. **1992**, 41-80.
96. WANG, B. C. a kol.: Structure of bis[ $\mu$ -bis(salicylaldehyde)ethylenediimine]-dicobalt(III) dichloride chloroform solvate. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*. **1979**, 35, 1232-1234.
97. EVANGELIO, E. a kol.: Cycloaddition reactivity studies of first-row transition metal–azide complexes and alkynes: an inorganic click reaction for metalloenzyme inhibitor synthesis. *Dalton Transactions*. **2012**, 41, 8010-8021.
98. POGÁNY, L. a kol.: Four cobalt(III) Schiff base complexes – Structural, spectroscopic and electrochemical studies. *Inorganica Chimica Acta*. **2017**, 462, 23-29.