

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



**Syntéza a štúdium vlastností karboxyláto
komplexov platiny**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Lucia Pazderová
Študijný program:	Bioanorganická chemie
Študijný odbor:	Chemie
Typ štúdia:	Prezenčný
Vedúci práce:	Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.
Termín odovzdania práce:	30. 4. 2015

Ja, Bc. Lucia Pazderová, prehlasujem, že som túto diplomovú prácu napísala samostatne pod odborným dohľadom Mgr. Pavla Štarhu, Ph.D. Všetku použitú literatúru som uviedla na konci práce.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola prístupná v knižnici Katedry anorganickej chémie Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 29. 4. 2015

.....

Pod'akovanie:

Na tomto mieste chcem poďakovať Mgr. Pavlovi Štarhovi, Ph.D. za odborné vedenie a cenné pripomienky pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďalej chcem poďakovať kolektívu Katedry anorganické chemie, a to konkrétne Mgr. Tomášovi Šilhovi, Ph.D. a pani Erike Bartoňkovej za prevedenie elementárnej analýzy, RNDr. Bohuslavovi Drahošovi, Ph.D. za prevedenie hmotnostnej spektrometrie, RNDr. Jane Gálikovej, Ph.D. za zmeranie infračervených spektier a Mgr. Radke Křikavovej, Ph.D. za prevedenie NMR spektroskopie. Ďalej chcem poďakovať vedúcemu Katedry anorganické chemie, Prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D., za možnosť vypracovať predloženú prácu na pôde uvedenej katedry. Taktiež ďakujem Mgr. Kateřině Kubešové, DiS. z Katedry buněčné biologie a genetiky, za prevedenie *in vitro* testov cytotoxicity a projektom Študentskej grantovej súťaže na UP IGA_PrF_2014_009 a IGA_PrF_2015_019 za finančnú podporu.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora: Bc. Lucia Pazderová

Názov práce: **Syntéza a štúdium vlastností karboxyláto komplexov platiny**

Typ práce: Diplomová

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

Vedúci práce: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Bolo pripravených a kompletne fyzikálno-chemicky charakterizovaných jedenásť karboxylátolapatných komplexov so všeobecným vzorcom $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})]$ **(1)–(3)**, *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2]$ **(4)–(7)**, $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{EtMal})]$ **(8)** a **(9)** a *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{MEE})_2]$ **(10)** a **(11)**, kde: *naza* = substituovaný derivát 7-azaindolu, Mal = malonátový dianión, Dec = dekanoátový anión, EtMal = ethylmalonátový dianión a MEE = 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetátový anion. Látky **(1)–(7)** sa podrobili *in vitro* cytotoxickým testom na ľudských bunkových líniách karcinómu vaječníkov citlivých (A2780) a rezistentných (A2780R) na cisplatinu, na normálnych bunkových líniách ľudských fibroblastov (MRC5) a na primárnych kultúrach ľudských hepatocytov (Hep). U komplexov **(2)**, **(4)**, **(5)** a **(7)** bola zistená vyššia *in vitro* cytotoxicita voči A2780 ($\text{IC}_{50} = 13,0\text{--}24,4 \mu\text{M}$) v porovnaní s klinicky používaným liečivom na báze platiny cisplatinou ($\text{IC}_{50} = 26,3 \mu\text{M}$). Všetky študované komplexy **(1)–(7)** boli účinné voči A2780R línii ($\text{IC}_{50} = 13,6\text{--}28,9 \mu\text{M}$), inak povedané sú schopné prekonať získanú rezistenciu tejto bunkovej línie na cisplatinu ($\text{IC}_{50} > 50,0 \mu\text{M}$). Farmakologicky najzaujímavejšími sa javia komplexy **(3)** (A2780: $\text{IC}_{50} = 26,6 \pm 8,9 \mu\text{M}$; A2780R: $28,9 \pm 6,7 \mu\text{M}$) a **(4)** (A2780: $14,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$; A2780R: $14,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$), ktoré nie sú v testovanom koncentračnom rozsahu biologicky aktívne voči MRC5 ($\text{IC}_{50} > 50,0 \mu\text{M}$ pre **(3)** a $> 25,0 \mu\text{M}$ pre **(4)**) a Hep ($\text{IC}_{50} > 250,0 \mu\text{M}$ pre **(3)** a **(4)**), čo poukazuje na schopnosť týchto látok pôsobiť selektívne na nádorové bunky.

Kľúčové slova: platnaté komplexy; deriváty 7-azaindolu; karboxyláto; syntéza; charakterizácia; *in vitro* cytotoxicita

Počet strán: 81

Jazyk: Slovenčina

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Lucia Pazderová

Title: **Synthesis and study of properties of platinum carboxylato complexes**

Type of thesis: Diploma

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

Supervisor: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: Eleven platinum(II) carboxylato complexes of the general formula $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})]$ **(1)–(3)**, *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2]$ **(4)–(7)**, $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{EtMal})]$ **(8)** a **(9)** and *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{MEE})_2]$ **(10)** a **(11)** were synthesized and fully characterized; *naza* = 7-azaindole derivatives, Mal = malonate dianion, Dec = decanoate anion, EtMal = ethylmalonate dianion and MEE = 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetate anion. Compounds **(1)–(7)** were tested for their *in vitro* cytotoxicity against cisplatin sensitive (A2780) and resistant (A2780R) human ovarian carcinoma cell lines, normal human fibroblast cell line (MRC5) and primary culture of human hepatocytes (Hep). The complexes **(2)**, **(4)**, **(5)** and **(7)** were found to be more *in vitro* cytotoxic against the A2780 cells ($\text{IC}_{50} = 13.0\text{--}24.4 \mu\text{M}$) than the clinically used platinum-based drug cisplatin ($\text{IC}_{50} = 26.3 \mu\text{M}$). All the studied complexes **(1)–(7)** were effective against A2780R cell line ($\text{IC}_{50} = 13.6\text{--}28.9 \mu\text{M}$) and thus circumvented the acquired resistance of the cancerous cells against cisplatin ($\text{IC}_{50} > 50.0 \mu\text{M}$). Complexes **(3)** (A2780: $\text{IC}_{50} = 26.6 \pm 8.9 \mu\text{M}$; A2780R: $28.9 \pm 6.7 \mu\text{M}$) and **(4)** (A2780: $14.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$; A2780R: $14.5 \pm 3.8 \mu\text{M}$) seem to be the most pharmacologically promising ones, because these substances were not biologically active against MRC5 ($\text{IC}_{50} > 50.0 \mu\text{M}$ for **(3)** and $> 25.0 \mu\text{M}$ for **(4)**) and Hep ($\text{IC}_{50} > 250.0 \mu\text{M}$ for **(3)** and **(4)**) non-cancerous cells within the tested concentration range. The obtained biological data show on selective biological effect of **(3)** and **(4)** against cancerous cells.

Keywords: Platinum(II) complexes; 7-azaindole; Carboxylato; Synthesis; Characterization; *In vitro* cytotoxicity

Number of pages: 81

Language: Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Platina ako cytostaticky zaujímavé koordinačné centrum.....	9
2.2	Cisplatina.....	10
2.3	Mechanizmus účinku cisplatiny	12
2.3.1	Tvorba DNA aduktov	13
2.3.2	HMG proteíny	16
2.4	Odpoveď bunky na liečivo	17
2.4.1	Apoptóza.....	17
2.4.2	Rezistencia.....	19
2.4.2.1	Znížený influx	19
2.4.2.2	Zvýšený eflux	20
2.4.2.3	Intracelulárne thioly.....	22
2.4.2.4	Oprava poškodenej DNA.....	23
2.5	Karboxyláto komplexy platiny v oxidačnom stupni (II)	27
2.5.1	Karboplatina	27
2.5.2	Oxaliplatina	28
2.5.3	Nedaplatina.....	30
2.5.4	Heptaplatina.....	31
2.5.5	Lobaplatina	32
2.5.6	Karboxyláto komplexy Pt(II) vyradené z klinického testovania.....	32
2.6	7-azaindol	36
2.7	Platnaté komplexy s derivátmi 7-azaindolu.....	37
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	40
3.1	Chemikálie a prístroje.....	40
3.2	Syntéza Pt(II) komplexov so substituovanými derivátmi 7-azaindolu.....	41
3.2.1	Syntéza prekurzorov (<i>cis</i> -dijodoplatnaté komplexy).....	41
3.2.2	Syntéza malonáto komplexov.....	42
3.2.3	Syntéza dekanoáto komplexov	43
3.2.4	Syntéza ethylmalonáto komplexov.....	44
3.2.5	Syntéza 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexov	46
3.3	<i>In vitro</i> cytotoxicita	48
3.4	Štúdium hydrolýzy a interakcie s biomolekulami	49
3.5	Štúdium lipofility komplexov.....	50
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	51

4.1	Malonáto a dekanoáto komplexy.....	52
4.2	Ethylmalonáto a 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexy	60
4.3	<i>In vitro</i> cytotoxicita	64
4.4	Štúdium hydrolýzy a interakcií s biomolekulami.....	66
4.5	Štúdium lipofility komplexov.....	68
5	ZÁVER.....	70
6	SKRÁTKY	72
7	LITERATÚRA	73

1 ÚVOD

Rakovina je jednou z najzávažnejších civilizačných chorôb. WHO (World Health Organization) vo vydaní World Cancer Report 2014 uvádza nové údaje a prognózy zaťaženia sveta rakovinou. Upozorňuje hlavne na problém výskytu rakoviny, ktorý sa zvýšil z 12,7 miliónov v roku 2008 na 14,1 miliónov v roku 2012. Znepokojujúce je, že takýto trend sa očakáva aj naďalej. Predpokladá sa, že počet nových prípadov zaznamená nárast o ďalších 75 %, čo prinesie v priebehu nasledujúcich dvoch desaťročí počet prípadov výskytu rakoviny blížiaci sa k 25 miliónom [1].

Z chemoterapeutík používaných k liečbe nádorových ochorení sú najčastejšie podávané liečiva na báze komplexov platiny. Niet pochyb, že cisplatina a jej klinicky využívané analógy sú nezastupiteľné pri celom rade onkologických ochorení. Vývoj zahŕňa tiež komplexy ďalších kovov, a to predovšetkým paládia, ruthénia a irídia. Ako najperspektívnejšie z nich sa ukazuje ruthénium, i keď dnes sú už pripravené aj zaujímavé komplexy irídia.

Aj táto práca mala ambíciu prispieť do mozaiky protinádorových terapeutík. Cieľom bolo nasyntetizovať karboxyláto komplexy platiny v oxidačnom stupni II, obsahujúce *N*-donorové ligandy zo skupiny derivátov 7-azaindolu a *O*-donorové ligandy vybrané z biologicky relevantných mono- alebo bidentálnych aniónov karboxylových kyselín. Ďalším čiastkovým cieľom bolo na pripravených komplexoch previesť komplexnú fyzikálno-chemickú charakterizáciu vhodnými experimentálnymi metódami (elementárna analýza, NMR spektroskopia, hmotnostná spektrometria, infračervená spektroskopia), za účelom stanovenia ich zloženia a čistoty. V neposlednom rade bolo cieľom predloženej práce podrobiť pripravené látky testom *in vitro* cytotoxicity na vybraných ľudských bunkových líniiach karcinómu vaječníkov citlivých a rezistentných na cisplatinu, na normálnych bunkových líniiach ľudských fibroblastov a na primárnych kultúrach ľudských hepatocytov. Následne, v rámci pochopenia základných aspektov mechanizmu účinku nasyntetizovaných karboxyláto komplexov, previesť štúdium ich hydrolýzy a interakcie s vybranými biomolekulami prostredníctvom ¹H NMR a ESI-MS experimentov a stanoviť lipofilitu pripravených látok, ktorá je dôležitá pre akumuláciu liečiva v nádorovej bunke.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Platina ako cytostaticky zaujímavé koordinačné centrum

V rámci 10. skupiny PSP (VIII. B skupina, podskupina niklu) sa nachádza neušľachtilý kov nikel, zaradovaný do triády železa, a ušľachtilé platinové kovy paládium a platina. Atómy niklu majú v základnom stave elektrónovú konfiguráciu $[\text{18Ar}]4s^23d^8$, paládia $[\text{36Kr}]5s^04d^{10}$ a platiny $[\text{54Xe}]6s^14f^{14}5d^9$. Vo svojich zlúčeninách, vrátane zlúčení koordinačných, nadobúdajú oxidačné stavy od $-I$ do VI , pričom charakteristickým oxidačným stavom niklu je II a paládia a platiny II a IV [2,3].

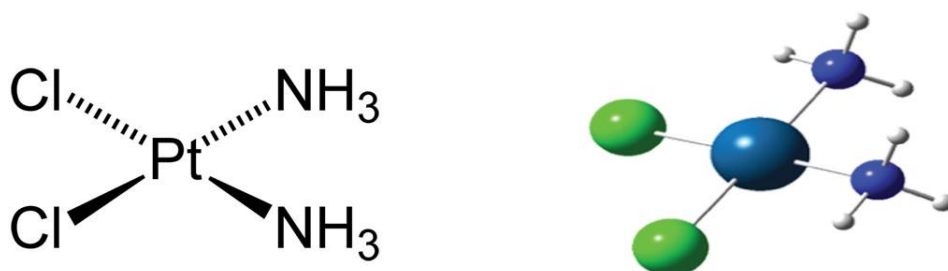
Na rozdiel od $Ni(II)$ komplexov, u ktorých sú bežné komplexy v štvorcovom aj tetraedrickom usporiadaní, $Pt(II)$ komplexy tvoria takmer výlučne štvorcové komplexy. Tendencia $Pd(II)$ a $Pt(II)$ v porovnaní s $Ni(II)$ k tvorbe štvorcových komplexov sa vysvetľuje rastúcim štiepením orbitálov vplyvom kryštálového poľa v 10. skupine [4]. Sú náznaky, že vo voľných oktaedrických polohách štvorcových $Pt(II)$ komplexov sa môžu tvoriť ďalšie, i keď slabé väzby. V roztokoch môžu byť tieto polohy obsadené molekulami rozpúšťadla. Doklad interakcie atómov ligandu s neväzobnou elektrónovou hustotou pramení z anomálnych väzbových a deformačných frekvencií väzby $N-H$ v komplexoch, ako sú *trans*- a *cis*- izoméry $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$. Tu bola postulovaná interakcia typu vodíkovej väzby medzi atómami vodíka a zaplnenými orbitálmi d_{xy} alebo d_{xz} atómu kovu [5,6].

Dvojmocná platina v komplexoch preferuje ako donorové atómy dusík (v alifatických aminiach a v NO_2), halogény, kyanidovú skupinu a ťažké donorové atómy, ako fosfor, arzén, síru a selén. Pomerne malú afinitu má ku kyslíku a fluóru. Dôvodom silnej väzby s atómami ťažkých donorov je vo veľkej miere tvorba π -väzieb kov-ligand prekryvom obsadených $d\pi$ orbitálov (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) kovu s prázdnyimi $d\pi$ orbitálmi válenčných vrstiev ťažkých kovov [5,7]. Je známy veľký počet rôznorodých koordinačných zlúčení platiny. Veľmi dobre sú preskúmané komplexy, ktoré obsahujú ako ligand molekuly amoniaku, pričom osobitná pozornosť sa venovala izomérii týchto komplexov. Štvorcové, prípadne oktaedrické usporiadanie ligandov v komplexoch platiny v oxidačnom stupni II , prípadne IV a kinetická inertnosť týchto komplexov, najmä pri $Pt(II)$, dovolili pripraviť veľký počet rôznorodých priestorových izomérov [8,9].

Je všeobecným pravidlom, že paladnaté komplexy sú menej stále, termodynamicky aj kineticky, ako ich platnaté analógy [5]. To môže byť kľúčové pre vysvetlenie, prečo je platina vhodnejšia ako koordinačné centrum pre tvorbu cytostatík. Hydrolyza v komplexoch paládia je príliš rýchla, 10^5 -krát rýchlejšia ako u zodpovedajúcich analógov platiny. Ľahko disociujú v roztokoch, čo vedie k veľmi reaktívnym časticiam, ktoré nie sú schopné dosiahnuť svoj farmakologický cieľ [10].

2.2 Cisplatina

Látka s názvom *cis*-diammin-dichloroplatnatý komplex (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], *cis*-DDP, CDDP), ktorá je v dnešnej dobe známa širokej odbornej verejnosti, a to nie len v oblasti medicíny, bola známa už v polovici 19. storočia. Prvé zmienky o jej nasynťetizovaní sa objavili v roku 1845, a to pod názvom Peyronov chlorid [11,12]. Ide o komplexnú zlúčeninu s heterogénnou koordinačnou sférou. Komplex je tvorený dvojicou chloro ligandov (tzv. odstupujúce skupiny) a dvojicou ammin ligandov (tzv. orientujúce/nosné skupiny) so štvorcovou geometriou a *cis*-izomérou (viď. Obrázok 1). Chromofórom je {PtN₂Cl₂}.



Obrázok. 1 Cisplatina (prevzaté z [13,14])

Ako mnoho prevratných vedeckých zistení, aj účinok cisplatiny bol objavený zvláštnym sledom udalostí. Jej antiproliferačnú aktivitu objavil v roku 1965 biofyzik Barnett Rosenberg z Michigan State University, USA [11,12,15]. Rosenberg sa venoval experimentom, pri ktorých študoval účinok elektrického poľa na rast buniek baktérie *Escherichia coli*. Mal hypotézu, že počas bunkového delenia je možné orientáciu deliaceho vretienka ovplyvniť lokálnym elektrickým poľom. Miesto očakávaného zastavenia rastu, pozoroval filamentózný rast buniek bez bunkového delenia. Dôvodom zastavenia bunkového delenia nebolo elektrické pole ako také, ale produkt elektrolýzy, ktorá prebiehala na

platinových elektródach ponorených do elektrolytu obsahujúceho salmiak (NH_4Cl). Po prevedení ďalších testov sa ukázalo, že aktívnou časticou je už spomínaná komplexná zlúčenina platiny, a to *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$. Táto látka inhibovala bunkové delenie aj bez prítomnosti elektrického poľa. Po biologických experimentoch prevádzaných na myšacom sarkóme 180, bola v roku 1968 preukázala výrazná regresia nádoru. Táto skutočnosť urýchlila postup cisplatiny k testovaniu *in vivo*, a už v roku 1971 bolo zahájené liečenie prvých pacientov. Schválená bola v roku 1978 organizáciou FAD (Food and Drug Administration), čo pre cisplatinu znamenalo vstup na svetový trh z protinádorovými liečivami [11,15,16].

Rokmi experimentov sa vyčlenili skupiny nádorov, na ktoré cisplatina zaberá a na ktoré, naopak, účinok nemá. Medzi nádorové ochorenia, ktoré sú vhodné na liečenie cisplatinou patrí jednoznačne rakovina semenníkov. Pri tomto type karcinómu sa preukázala viac ako 90 % účinnosť použitej liečby a takmer 100 % účinnosť za predpokladu včasného diagnostikovania [16,17]. Taktiež je veľmi vhodná pre pacientov trpiacich rakovinou vaječníkov, močového mechúra, malobunkových nádorov pľúc a na melanómy, lymfómy a myelómy [17]. Nanešťastie ani táto skupina ochorení nie je liečená bez vyskytujúcich sa problémov. Aj tu je totiž známy pojem rezistencia (obrana bunky pred cytotoxickými účinkami chemoterapeutík), ktorý výrazne ovplyvňuje liečebnú kúru (viď. kapitola 2.4.2).

Ďalšou nepríjemnosťou spojenou s terapiou na báze cisplatiny sú veľmi vážne vedľajšie účinky. Prvým znepokojujúcim vedľajším efektom bolo toxické pôsobenie liečiva na obličky, tzv. nefrotoxicita, ktorá takmer zabránila prijatiu cisplatiny medzi cytostatiká. Tento problém z časti prekonal onkológ Dr. Esteban Cvitkovic zo Sloan-Kettering Memorial Hospital, USA, ktorý podával pacientom liek intravenózne spolu s veľkým množstvom vody a diuretikom. Prehydratácia rýchlejšie odstránila ťažký kov z obličiek, čím sa zmiernila vysoká toxicita a dávka podávaného liečiva sa mohla zvýšiť až trojnásobne. Z tohto dôvodu sa hydratačná terapia stala súčasťou podávania cisplatiny [12,15,16,18,19]. Okrem nefrotoxicity trápí pacientov aj neuropatia, ototoxicita, myelosupresia, nevoľnosti, emetogénne účinky, alergické reakcie a ďalšie nežiaduce účinky obmedzujúce klinické použitie cisplatiny [18,20,21]. Neselektívnosť terapie, jej toxicita a častá rezistencia viedli k tomu, že sa začali syntetizovať analógy cisplatiny, ktorá je aj napriek vyššie uvedeným komplikáciám, stále najčastejším liekom prvej voľby pri spomínaných nádorových ochoreniach [17,18,21].

Prvé všeobecné pravidlá, ktoré platili pri syntéze analógov cisplatiny, boli neutralita zlúčenín, čím sa zabezpečil jeho ľahší vstup do bunky, ďalej bifunkčnosť alebo potenciálna bifunkčnosť molekuly po strate dvoch monodentálnych ligandov v *cis*-polohe alebo slabého chelátu, ako bidentátneho ligandu [11,16,21,22]. Obe pravidlá majú dnes už mnoho výnimiek. Príkladom je vyvrátenie presvedčenia, ktoré sa objavilo po preukázaní biologickej inaktivity transplatiny. Verilo sa, že ammin ligandy so štvorcovou geometriou musia byť, pre zachovanie biologickej aktivity látky, v *cis*-polohe. Hoci je zrejmé, že transplatina aktívna nie je, neplatí to o jej analógoch všeobecne [21–23].

Od uvedenia cisplatiny do klinickej praxe boli pripravené tisícky látok, ktoré viac či menej prekonávali jej biologickú aktivitu [17,24]. Drvivá väčšina platinových zlúčenín bola stiahnutá kvôli nízkej účinnosti, vysokej toxicite alebo nízkej rozpustnosti vo vode. Iba pár desiatok nasyntetizovaných látok vykazovalo adekvátne farmakologické výhody oproti cisplatine a dosiahlo klinické štúdie. Žiaľ aj v tejto časti testovania bola väčšina látok neúspešná (viď. kapitola 2.5.6) [16,20,22,24]. V súčasnosti je na trhu päť analógov cisplatiny, a to karboplatina, oxaliplatina (registrované celosvetovo), nedaplatina (registrovaná v Japonsku), heptaplatina (registrovaná v Južnej Kórei) a lobaplatina (registrovaná v Číne) (viď. kapitola 2.5) [20,21].

Na vzdory všeobecnej platnosti tvrdenia o škodlivosti ťažkých kovov na ľudský organizmus, bol objav cisplatiny ako liečiva, štartér pre nový náhľad na ich využitie. Zrodila sa tak syntetická éra, ktorá poskytla mnoho nových zlúčenín s variabilným terapeutickým spektrom [15,17,21,24].

2.3 Mechanizmus účinku cisplatiny

Cisplatina je do tela pacienta podávaná intravenózne. Keďže je v extracelulárnom prostredí vyššia koncentrácia chloridových iónov (~ 100 mM), než aká je koncentrácia pripadajúca na podávané liečivo, molekula je stabilná. Nedochádza k strate ani k náhrade chloro ligandov a liečivo sa dostáva k bunke v nezmenenej tzv. inaktívnej podobe [12,21].

Ďalším krokom je vstup cisplatiny do intracelulárneho priestoru. Dlhú dobu sa predpokladalo, že jedinou možnosťou vstupu je pasívna difúzia molekuly, po smere elektrochemického gradientu chloridových iónov (~ 4 mM). Dnes sa však považuje aktívny transport za ďalšiu možnú cestu vstupu do bunky. Konkrétne ide o transport cez aktívne

prenášače pre med' Ctr1, z rodiny Ctr, uložené v plazmatickej membráne [17,24,25]. Avšak pri štúdiách interakcií liečivo-Ctr1 na modelových peptidoch sa ukázalo, že cisplatina a jej analógy sa viažu na oblasť transportného systému bohatú na methionín. Táto interakcia zapríčiní, že centrálny atóm stratí všetky ligandy a štruktúra komplexnej zlúčeniny nie je viac obnovená. Preto je tento spôsob transportu diskutabilný a výskum v tejto oblasti stále aktívny [12,20,22].

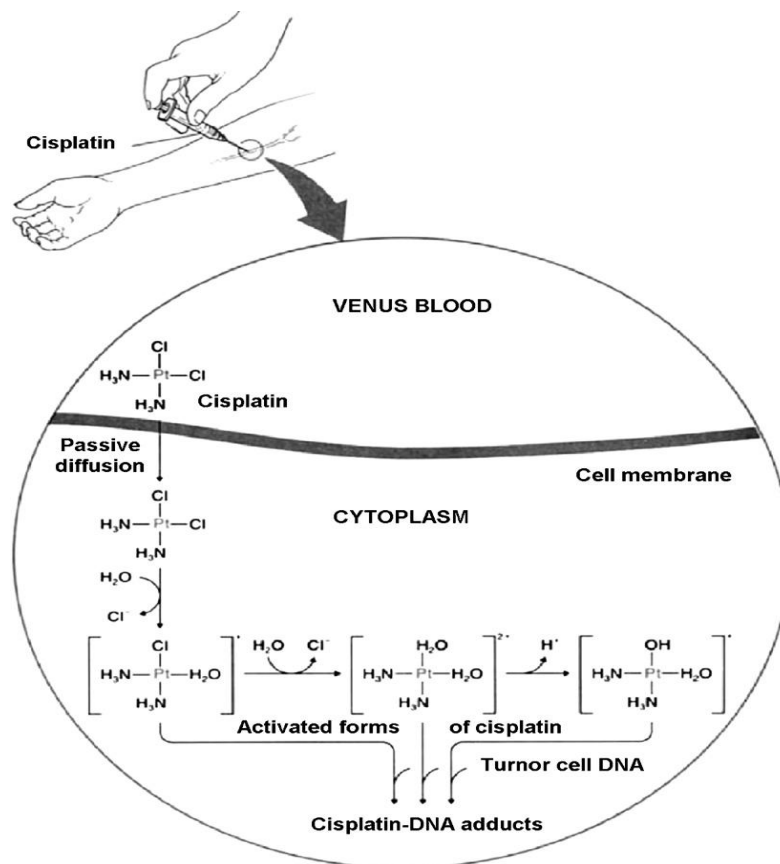
Keď sa cisplatina dostane do vnútra bunky, nastáva jej aktivácia hydrolyzov. Ide o substitúciu chloro ligandov za molekuly vody, ktorá je umožnená zrovnateľnou alebo menšou koncentráciou aniónov chlóru v bunke, v porovnaní s koncentráciou podávaného liečiva. Práve hydrolyza je krok obmedzujúci rýchlosť väzby na DNA ($t_{1/2} \sim 2$ h) [26]. Vznikajú tak mono a/alebo diaqua Pt(II) komplexy, ktoré sú považované za reaktívnu formu cisplatinového liečiva (viď. Obrázok 2) [12,15,16].

2.3.1 Tvorba DNA aduktov

Molekula DNA, ako nositeľka genetickej informácie, predstavuje štruktúrny a funkčný základ každej jadrovej bunky v ľudskom tele. Na jej replikácii a transkripcii závisí celý rad biochemických metabolických dráh, ktorých funkčnosť a presnosť zabezpečuje nie len homeostázu bunky, ale i jedinca samotného. Keďže z definície nádorovej bunky vyplýva, že k jej vzniku je potrebná akumulácia mutácií onkogénov a nádorových supresorov v DNA somatickej alebo kmeňovej bunky, je evidentné, že aj pre transformovanú bunku je DNA základom. To je dôvodom, prečo je vhodné cieľiť kancerostatické činidlá práve na túto molekulu [18,19,21,22].

Vlastnosťou cisplatiny a jej analógov je schopnosť interakcie s určitými nukleotidovými bázami DNA a vytváranie tzv. aduktov. Adukty sú schopné interferovať s procesmi nevyhnutne spojenými s touto molekulou, a tak narušiť normálne fungovanie bunky. Tento stav pretrváva až do doby, keď zvýšená genetická nestabilita privedie bunku do apoptózy [11,16,17,18]. Molekula DNA je v mieste veľkého žliabku atakovaná aktivovanými časticami liečiva [15]. Experimenty ukázali, že väzba cisplatiny na DNA je riadená skôr kineticky, než termodynamicky. V relatívne rýchlom reakčnom kroku ($t_{1/2} \sim 0,1$ h) dochádza k naviazaniu hydratovanej cisplatiny na N7 atómy purínových báz a k vytlačeniu

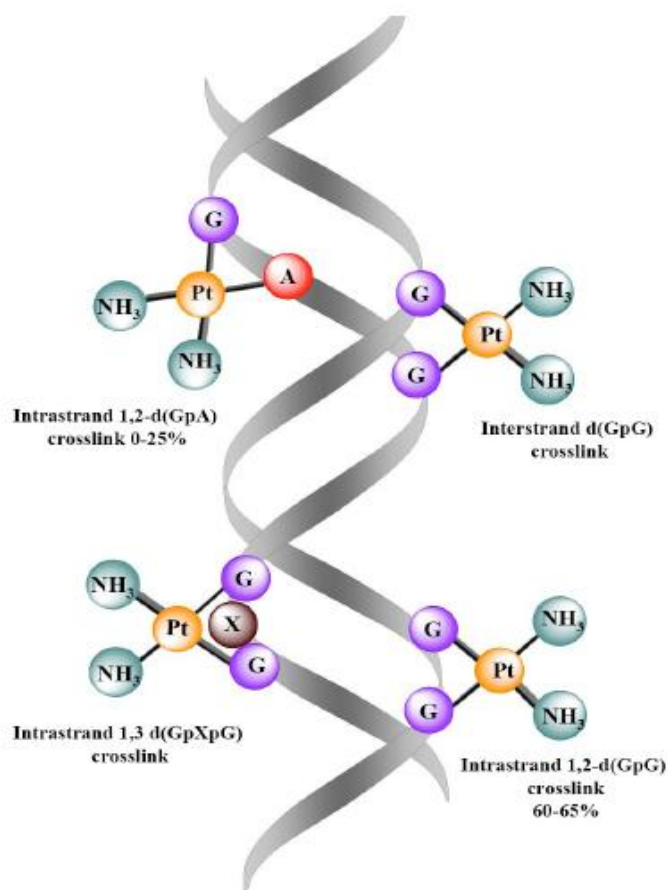
koordinovaných molekúl vody [26,27]. Týmto mechanizmom vznikajú na DNA adukty (viď. Obrázok 2).



Obrázok 2 Aktivácia cisplatiny v bunke (prevzaté z [29])

Medzi najčastejšie cisplatina-DNA adukty patria tie, ktorých lokalizácia je v rámci jedného reťazci DNA. Zahŕňajú purínové bázy nachádzajúce sa vedľa seba. Ide o 1,2-d(GpG) a 1,2-d(ApG) mostíky, pričom u 1,2-d(ApG) mostíku dochádza vždy najskôr k väzbe na adenín. Tieto typy aduktov spôsobujú lokálny ohyb helixu o 32°–34° a odvíjajú ho o 13° [26]. Predstavujú 80–90 % z celkovej kvantifikácie vzniknutých aduktov, a to konkrétne 60–65 % pre mostíky vytvorené na susediacich guanínoch a 20–25 % pre interakciu s adenínom a guanínom. To je dôvod, prečo práve oni hrajú najvýznamnejšiu úlohu pri zastavení bunkovej replikácie a transkripcie [12,15,18,21,24,28]. Ďalšiu skupinu aduktov predstavujú 1,3-d(GpXpG) vnútroreťazcové mostíky (X = A, C alebo T), ktoré ohýbajú DNA o ~ 35° a odvíjajú ju o 23°, monofunkčné adukty na guaníne a proteín-DNA mostíky na guaníne. Veľmi zaujímavým je zriedkavý a ťažko opravitelný mostík prepájajúci dva reťazce DNA.

Táto priečna väzba je sprostredkovaná dvoma guanínovými bázami a dokáže spôsobiť ohyb až o $\sim 45^\circ$ – 55° a odvinutie o $\sim 79^\circ$ [26]. U všetkých troch typov je 2% pravdepodobnosť výskytu, a preto sa ich úloha, pri zastavení transformovaných buniek, považuje za minoritnú (viď. Obrázok 3) [30].



Obrázok 3 Adukty cisplatiny: jednoreťazcové bifunkčné adukty (1,2-d(ApG), 1,2-d(GpG) a 1,3-d(GpXpG)) a medzireťazcový mostík (d(GpG)) (prevzaté z [31])

Mnoho biomakromolekúl je schopných rozpoznávať poškodenia na DNA. Afinity týchto proteínov k DNA modifikovanej cisplatinou, môže byť prispievať k terapeutickým účinkom liečiva alebo naopak pôsobiť na cisplatinové lézie kontraproduktívne [30,32]. V prvom prípade ide o stabilizáciu cisplatin-DNA aduktov, čo privádza transformovanú bunku do nepríjemnej situácie (viď. kapitola 2.3.3). V prípade druhom, ide o makromolekuly opravných mechanizmov, ktoré prispievajú k bunkovej rezistencii, čo je pre liečbu nechcený scenár (viď. kapitola 2.4.2.4) [33].

Preto ak uvažujeme o mechanizme, ktorým na nádorovú bunku pôsobí cisplatinové liečivo, nie je možné skončiť s úvahou pri naviazaní sa aduktov na určité pozície v DNA. Početné štúdie ukázali, že rozhodujúcu úlohu pri protinádorovom pôsobení cisplatinu zohráva typ proteínov, ktorý je v bunke zastúpený v hojnom počte. Ide o nehistonové chromozomálne HMG (high mobility group) proteíny. Ich funkciu postulujeme v nasledujúcej kapitole [34].

2.3.2 HMG proteíny

Interakcie proteínov s DNA zohrávajú veľmi významnú úlohu pri regulácii rozličných bunkových procesov, ako je replikácia, transkripcia, rekombinácia i oprava DNA. Hoci väčšina štúdií venovaných chromatinu sa zameriava na interakcie DNA s histónmi, nedávno sa pozornosť začala venovať aj proteínom nehistónovej povahy, a to zaslúžene [35]. HMG proteíny predstavujú najväčšiu a najrozsiahlejšie charakterizovanú skupinu nehistonových chromozomálnych proteínov. Môžu sa viazať na špecifické štruktúry v DNA i v chromatine, s malou alebo žiadnou špecifitou pre cieľovú sekvenciu DNA [34,36]. Ich prítomnosť je považovaná za rozhodujúcu a korelujúcu s citlivosťou nádorov na cisplatinu [37]. Najväčšia pozornosť bola venovaná štúdiu proteínov HMGB1 a HMGB2 a ich rozpoznávaniu lokalít na DNA, modifikovaných cisplatinou. Konkrétne ide o selektívne rozpoznávanie 1,2-d(GpG) a 1,2-d(ApG) vnútroreťazcových mostíkov [12,37]. V princípe dôjde naviazaním cisplatinového liečiva k štruktúrnym zmenám. Nastane ohyb osi DNA a rozvinutie dvojzávitnice v dôsledku toho, že vzdialenosť dvoch chloro ligandov koordinovaných na platine je menšia ako vzdialenosť dvoch guanínov na reťazci DNA [12,34,38].

Afinita HMG proteínov k vzniknutým štruktúrnym distorziám je o niekoľko radov väčšia, ako ich afinita k prirodzeným väzobným miestam na DNA. To vedie k vytitrovaniu HMG proteínov a k ich absencii na prirodzených väzbových miestach. Dochádza k porušeniu regulácie génovej expresie a k bunkovej smrti. Taktiež je porušená možnosť opravy DNA, pretože naviazané HMG proteíny slúžia ako bariéra pre enzýmy opravného mechanizmu [39–42]. Z tejto skutočnosti môžeme vyvodit' záver, že práve HMG proteíny predstavujú významný mechanizmus pôsobenia cisplatinovej terapie [43,44].

2.4 Odpoveď bunky na liečivo

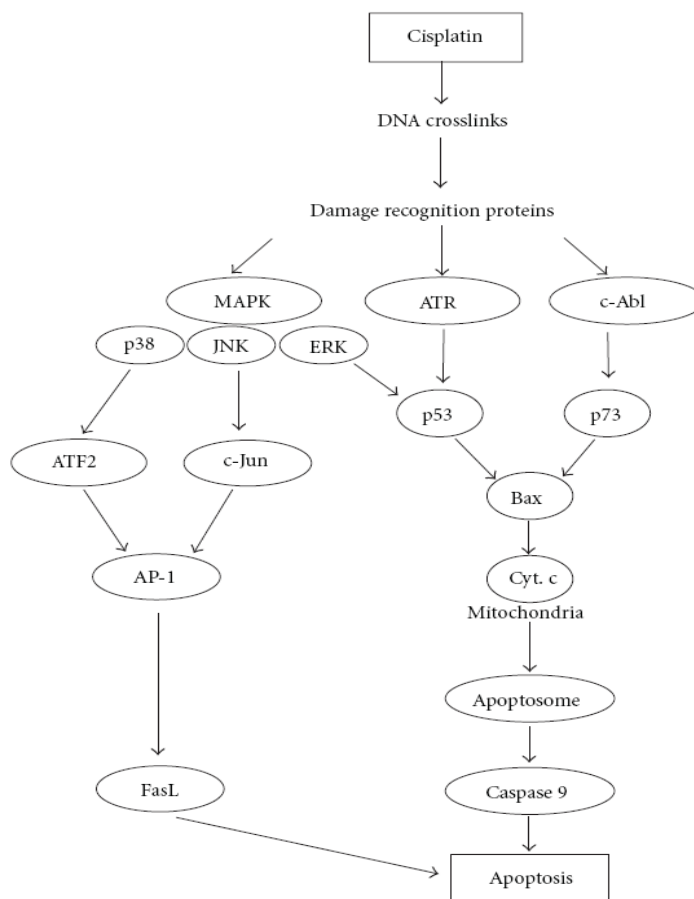
S názvom tejto kapitoly je neoddeliteľne spojený proces programovanej bunkovej smrti a rezistencie bunky na terapeutikum. Ide o antagonistické reakcie organizmu a je nutné ich poznať pre pochopenie mechanizmu účinku lieku a tiež pre vývoj nových generácií cytostatík.

2.4.1 Apoptóza

Apoptóza je geneticky regulovaný mechanizmus, zahrňujúci sled biochemických procesov, charakterizovaný unikátnymi morfológickými rysmi. Je sprevádzaná degradáciou cytoskeletu a následnou zmenou tvaru cytoplazmatickej membrány, zmrštením bunky, stratou kontaktu bunka-bunka, fragmentáciou jadra i chromatinu vo vnútri a rozpoznávaním fagocytujúcimi bunkami [45–48].

Značné dôkazy naznačujú, že cisplatina je schopná zabíjať bunky práve indukciou apoptózy [46,49]. Jej adukty vytvárané na DNA blokujú replikáciu i transkripciu, čo neostáva bez povšimnutia. Takéto poškodenie je rozpoznávané viac ako dvadsiatimi rôznymi proteínmi, medzi ktoré radíme hMSH2 komplex opravy chybného párovania (mismatch repair, MMR), nehistonové chromozomálne HMG proteiny skupiny 1 a 2 a transkripčný faktor viažuci sa na TATA box (TATA-binding protein, TBP). Úlohou týchto proteínov je odovzdať informáciu o poškodení molekuly DNA signalizačnej kaskáde, zahrňujúcej proteín p53, MAP-kinázu (mitogen-activated protein kinase) a proteín p73, ktorý nakoniec indukuje apoptózu [28,37,50]. Je známe, že transkripčná aktivácia a stabilita nádorového supresora p53 je regulovaná dvomi kinázami, a to ATM (ataxia telangiectasia-mutated protein) a ATR (ATM- and Rad3-related protein). Cisplatina-DNA adukty preferenčne aktivujú ATR-kinázu, ktorá fosforiluje p53 na seríne-15, čím ho aktivuje. Z MAP-kinázových signálov, ktoré sa podieľajú na toxických účinkoch indukovaných cisplatinou, sa zdá byť ERK (extracellular signal-related kinase) najdôležitejšia, pretože ako aktivovaná taktiež fosforiluje p53 na seríne-15. Navyše výsledkom aktivácie JNK/p38 (c-Jun N-terminal kinase/p38 kinase) je fosforilácia transkripčných faktorov c-Jun a aktivácia transkripčného faktora ATF-2, ktorý sa môže viazať na AP-1 väzobné miesta promotorov viacerých cieľových génov. Táto kaskáda nakoniec indukuje apoptózu cez expresiu proapoptického FasL génu [28,31,37,51]. Aj keď sa dráha proteínu p53 považuje za kľúčovú pri určovaní

efektívnosti proapoptickej signalizácie [31,52,53], úloha samotného proteínu zostáva zatiaľ nejasná, pričom sa zdá byť závislá od typu novotvaru. Zvýšená expresia p53 po expozícii cisplatinou môže aktivovať mechanizmy vedúce k apoptóze alebo naštartovať procesy opravy DNA a bunkového prežitia [37,54,55].



Obrázok 4 Apoptické signálne dráhy (prevzaté z [28])

p73 je jadrový proteín príbuzný proteínu p53 a obidva sa ako proapoptické proteíny akumulujú v bunkách liečených cisplatinou. Akumulácia proteínu p73 závisí na proteínoch MLH1 a MMR, pretože ak sú tieto v bunkách deficitné, k akumulácii nedochádza. Cisplatinou indukovaná aktivácia proteínu MMR závislého na dráhe p73 sa líši od jeho aktivácie proteínom p53 v tom, že aktivácia proteínom p73 nezahŕňa ATR fosforiláciu. Spojením medzi proteínom rozpoznávajúcim poškodenia DNA a aktiváciou p73 môže byť onkogénna tyrozín-kináza c-Abl. Aktivácia c-Abl je regulovaná prostredníctvom MMR, pretože bunky deficitné na MLH1 nie sú schopné aktivovať c-Abl v priebehu liečby

cisplatinou. Navyše, cytotoxicita cisplatiny je redukovaná v bunkách deficitných na c-Abl [28,56,57]. Ďalší pravdepodobný sled udalostí v oboch dráhach, dráhy p73 a p53, vyvolaný cisplatinou je taký, že cytochrom c prechádza mitochondriálnou membránou prostredníctvom indukcie Bax a Bak, čo vyústí do apoptózy, a to aktiváciou kaspázy 9 (viď. Obrázok 4) [28,58].

2.4.2 Rezistencia

Na začiatku cisplatinovej terapie karcinómu vaječníkov na liečbu odpovedá viac ako 70 % pacientok. Avšak oddialenie ochorenia je krátkodobé, pretože miera prežitia po piatich rokoch je iba 25 %. Podobne výskyt relapsu u malobunkového karcinómu pľúc po liečbe cisplatinou je hrozivých 95 %. Nádory hlavy a krku, pre ktoré je cisplatina liekom prvej voľby, odpovedajú na liečbu iba v 20–30 % prípadov [59,60]. Z vyššie uvedených údajov jednoznačne vyplýva, že rezistencia je pri terapii na báze cisplatiny vážnym problémom a je nutné venovať jej zvýšenú pozornosť. Môže sa jednať o rezistenciu, ktorá sa vytvorí v priebehu liečby (získaná rezistencia) po tom, čo dávky podávané pacientom pôsobia na nádory subletálne a tumory sú schopné odporovať pôsobeniu ďalšej liečby (typické pre vyššie spomínaný karcinóm vaječníkov). Alebo sa môže jednať o rezistenciu nádorom prirodzenú (vrodená rezistencia), ktorá má za následok, že rakovina hrubého čreva, prostaty, pľúc alebo prsníkov na cisplatinovú chemoterapiu nereaguje [15,17,18].

Na vzniku rezistencie sa podieľajú predovšetkým nasledovné mechanizmy [17,37,61]:

- zníženie influxu liečiva do bunky,
- zvýšenie efluxu liečiva z bunky,
- degradácia a deaktivácia liečiva prostredníctvom intracelulárnych thiolov,
- zlepšenie opravy a/alebo tolerancia aduktov cisplatina-DNA.

2.4.2.1 Znížený influx

Jedným z hlavných mechanizmov rezistencie je zníženie efektívnej koncentrácie liečiva v bunke. V bunkových líniah rezistentných na cisplatinu bolo pozorované zníženie koncentrácie cisplatinu o 20–70 %. Redukcia koncentrácie môže byť spôsobená buď znížením

influxu alebo zvýšením efluxu liečivá [59]. Už dlho sa predpokladá, že cisplatina sa do bunky dostáva pasívnou difúziou. Jej vstup nie je saturovaný dávkou ani inhibovaný štruktúrnymi analógmi, ale mení sa vplyvom metabolických inhibítorov, ktoré nemajú vplyv na eflux [59,62]. Súčasné štúdie sa rozchádzajú v hodnotení významu pasívneho transportu cisplatiny do bunky. Niektoré uvádzajú, že fluidita bunkovej membrány, ktorá výrazne ovplyvňuje pasívnu difúziu, nekoreluje so vstupom cisplatiny do bunky. Iné práce však ukazujú, že rezistentné nádorové línie so zníženým influxom majú rigidnú cytoplazmatickú membránu s vysokým obsahom sfingomyelinu a cholesterolu [62,63]. Je tiež zaujímavé, že malá molekula ouabainu, ktorá inhibuje membránovú sodno/draselnú ATP-ázovú pumpu, blokuje import cisplatiny. To môže ukazovať na súvislosť medzi influxom liečivá a membránovým potenciálom [59,61]. Zdá sa, že so vstupom cisplatiny do bunky sú spojené i transportéry pre med' Ctr1 (viď. Obrázok 5). Expozícia cisplatinou zabraňuje medi v transporte prostredníctvom tohto vysokoafinitného transportéra (kompetitívna inhibícia) a tiež rapídne znižuje jeho expresiu. Bunky, ktoré sú deficitné na Ctr1, sú rezistentné voči cisplatine. Napríklad rezistentné línie malobunkového karcinómu pľúc exprimujú menej ako polovicu proteínu Ctr1 v porovnaní s ich citlivým náprotivkom (viď. Obrázok 5) [37,59,62,64].

Rozsah, v akom znížený influx prispieva k rezistencii na cisplatinu, zostáva zatiaľ v klinickej praxi nejasný [62].

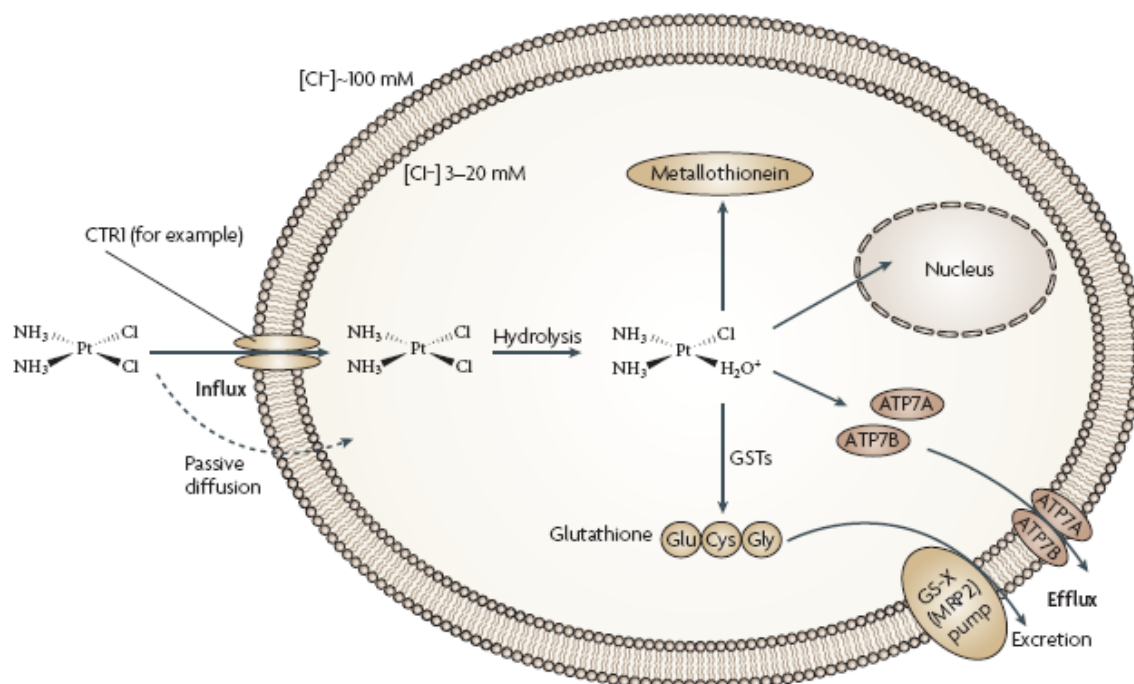
2.4.2.2 Zvýšený eflux

Rezistencia môže byť taktiež spojená so zvýšením efluxu z bunky do medzibunkového priestoru alebo z jadra do cytoplazmy.

Med' nielenže súperí s cisplatinou o influx do bunky, ale zároveň znižuje eflux cisplatiny a môže tak zvýšiť jej akumuláciu a cytotoxicitu. Za export medi z bunky sú zodpovedné adenosíntrifosfáty typu P, a to konkrétne ATP7A a ATP7B, ktoré prepravujú med' medzi Golgiho aparátom a cytoplazmatickou membránou. ATP7A je schopný zabalit' do vezikul nie len cisplatinu, ale aj karboplatinu a oxaliplatinu [37,59,62,64,65]. Pacientky s rakovinou vaječníkov, ktorých karcinómy exprimujú vo zvýšenej miere ATP7B, majú signifikantne horšiu prognózu, ako pacientky s nádormi exprimujúcimi ATP7B v nízkej miere [59,66]. Nadexpresia ATP7B je taktiež spojená so zlými výsledkami pacientov liečených cisplatinou pri rakovine pažeráka a spinocelulárnych karcinómov hlavy a krku [62].

V rezistencií na cisplatinu zohráva dôležitú úlohu aj ATP závislá pumpa MRP2 (multidrug-resistance-associated-protein-2) [29,59].

Použitie rezistentných a na cisplatinu citlivých bunkových línií ukázalo, že expresia MRP2 sa zvýšila v rezistentných líniách. Avšak ďalšie štúdie na bunkových líniách karcinómu pečene dospeli k rozporuplným výsledkom. Expresia MRP2 sa v rezistentných bunkových líniách znížila. Z toho možno usudzovať, že u niektorých typov tkanív, môže expresia MRP2 zohrávať významnú úlohu pri rezistencii na cisplatinu. Nejde však o všeobecný mechanizmus, ktorým k cisplatinovej rezistencii dochádza [59,67].



Obrázok 5 Influx a eflux cisplatinu a jej inaktivácia intracelulárnymi thiolmi (prevzaté z [15])

Je zrejme, že niektoré transportéry môžu byť závislé na type bunky a každý bunkový typ môže mať viac transportérov. Týmto sa situácia s prepravou liečivá ďalej komplikuje. Opäť, ako v prípade influxu platí, že klinický význam každého z mechanizmov efluxu ostáva neistý [59,62,68].

2.4.2.3 Intracelulárne thioly

V cytoplazme sa nachádza mnoho thiol obsahujúcich biomakromolekúl. V dôsledku vysokej afinity síry k platine dochádza k vychytávaniu platinového liečiva a jeho následnej inaktivácii. To je dôvod prečo zvýšená koncentrácia týchto zlúčenín indukuje rezistenciu voči cisplatine [59,62,69].

Glutathion (GSH), najhojnejšie zastúpený intracelulárny thiol, vytvára prostredníctvom glutathion-S-transferázy (GST) cisplatina-thiol konjugáty. GST, predovšetkým GST- π , katalyzuje vytvorenie väzby glutathionu s liečivom. Neboli však získané konzistentné výsledky medzi expresiou GST- π a rezistenciou na cisplatinu. A tak sa zdá, že hladina GST- π môže mať určitú úlohu pri niektorých typoch rakoviny, ale nejde o globálny indikátor cisplatinovej rezistencie [59,70]. Naproti tomu, zníženie intracelulárnej hladiny glutathionu, môže byť racionálnou stratégiou pri prekonávaní rezistencie na cisplatinu [69]. U niekoľkých bunkových línií karcinómu vaječníkov rezistentných na cisplatinu sa ukázala korelácia medzi stupňom rezistencie a hladinou glutathionu, a to pravdepodobne v dôsledku zvýšenia hladiny γ -glutamylcystein syntetázy. Taktiež, keď sa bunkové línie karcinómu močového mechúra rezistentné na cisplatinu vystavili látkam znižujúcim koncentráciu bunkového glutathionu, butionin sulfoximínu (BSO) alebo nesteroidnému protizápalovému liečivu indometacínu, vzrástla citlivosť buniek karcinómu na cisplatinu [57,59].

Ďalší člen obranného antioxidantného systému, thioredoxín (Trx), podobne ako glutathion, reguluje oxidačno-redukčné prostredie v bunke. Je zapojený do regulácie transkripčných faktorov, apoptózy a syntézy DNA. V klinických vzorkách bola pozorovaná súvislosť medzi jeho hladinou v bunke a cisplatinovou rezistenciou v nádoroch močového mechúra, prostaty, pečene, žalúdka a hrubého čreva [21,59]. Cisplatina inhibuje thioredoxín reduktázu (TrxR), ktorá redukuje Trx a tým mu umožňuje zapojiť sa do oxidácie NADPH. Avšak rovnakú schopnosť má i transplatina, ktorá je cytotoxický neúčinná. A preto je inhibícia TrxR skôr dôkaz potlačujúci dôležitosť Trx v mechanizme rezistencie na cisplatinu [59,71].

Poslednou uvádzanou thiol obsahujúcou skupinou látok sú metalothioneiny (MT). Ide o proteíny s malou molekulovou hmotnosťou, podieľajúce sa na regulácii homeostázy medi a zinku, rovnako ako na ochrane bunky pred oxidatívnym stresom a toxicitou spojenou

s ťažkými kovmi. Zvýšené hladiny metalothioneinu II boli popísané v bunkových líniách rakoviny močového mechúra rezistentných voči cisplatine. Cisplatina taktiež indukuje zvýšenú expresiu MT v nádoroch hlavy, krku a v hepatocelulárnom karcinóme. Na druhej strane, v nádoroch semenníkov nebol pozorovaný žiadny vzťah medzi hladinou MT a cisplatinou. Z uvedených skutočností sa usudzuje, že spojenie koncentrácie metalothioneinu a rezistencie voči cisplatine, môže byť tkanivovo špecifické (vid'. Obrázok 5) [59,62,65].

2.4.2.4 Oprava poškodenej DNA

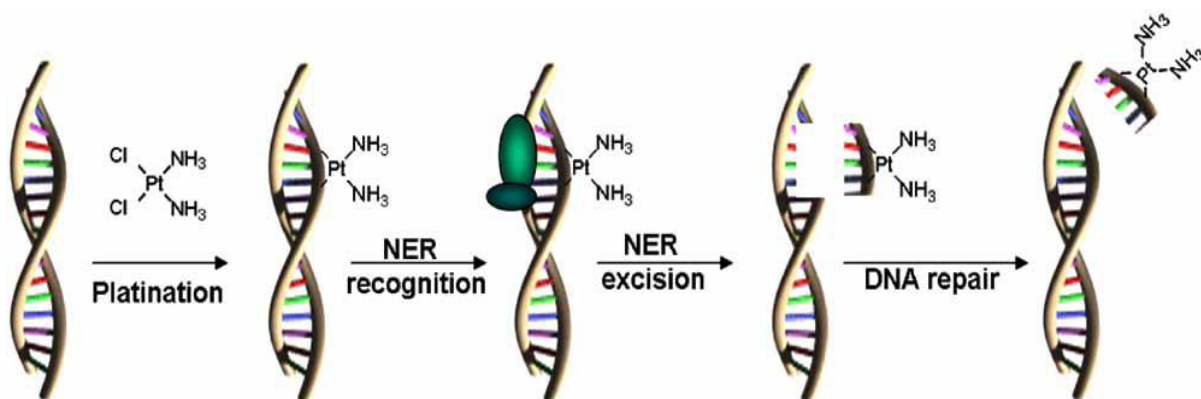
Molekula DNA je jedinou molekulou, pre ktorú si bunka vytvorila opravné mechanizmy. Súvisí to s už spomínanou jedinečnosťou tejto štruktúry. V prípade nasyntetizovania RNA, ktorá produkuje nefunkčné proteíny, bunka zdegraduje proteíny i RNA a nepredstavuje to pre ňu žiaden problém. Poškodenie DNA však nemôže byť vyriešené jej degradáciou, pretože by sa v bunke viac nenachádzal templát, ktorý by poslúžil k syntéze [47,56]. Bunka čelí poškodeniam DNA neustále. Len spontánne dochádza k mutáciám radovo asi 10^{-6} mutácií na gén a bunkové delenie, pričom za spontánne mutácie považujeme napríklad depurináciu, depyrimidináciu, deamináciu alebo inkorporáciu uracilu. Ak by tieto poškodenia neboli riešené, organizmus by nebol schopný prežiť. Preto má bunka na vysporiadanie sa s mutáciami celý rad opravných mechanizmov [72,73].

Keďže cisplatinové adukty patria medzi chemické mutagény, tzv chemomutagény, oprava DNA prispieva k rezistencii transformovaných buniek. Z množstva opravných mechanizmov, ktorými bunka disponuje a sú zapojené do bunkovej rezistencie voči cisplatine, zohrávajú najvýznamnejšiu úlohu nasledujúce [37,69]:

- nukleotidová excízna oprava (nucleotide-excision repair, NER),
- oprava chybného párovania (mismatch repair, MMR),
- oprava dvojreťazcových zlomov,
- tolerantná oprava/replikačný bypass (replicative bypass, RB).

Nukleotidová excízna oprava

Nukleotidová excízna oprava je hlavnou dráhou opravy poškodenia DNA. Je primárne zodpovedná za opravu cisplatina-DNA aduktov, pričom rozpoznáva všetky tri typy intrareťazcových mostíkov (1,2-d(ApG), 1,2-d(GpG), 1,3-d(GpXpG)). 1,2-vnútroreťazcové mostíky sú opravované menej účinne ako 1,3-d(GpXpG) mostíky, čo podporuje hypotézu, že práve 1,2-vnútroreťazcové mostíky sú cytotoxickými léziami cisplatiny a jej analógov (vid'. Obrázok 6) [59,69]. Zvýšená expresia niekoľkých NER génov sa ukázala byť v korelácii s cisplatinovou rezistenciou. Pri nádoroch vaječníkov sa zvýšila expresia XPA a ERCC1-XPF u pacientok rezistentných na cisplatinovú liečbu. Súlad spojený s ERCC1-XPF a rezistenciou bol pozorovaný aj pri rakovine žalúdka. Významnosť NER mechanizmu na oprave lézií potvrdzuje taktiež nízka hladina XPA a ERCC1-XPF pri rakovine vaječníkov, ktorá je všeobecne veľmi citlivá na cisplatinu [37,59,69].



Obrázok 6 NER mechanizmus opravy cisplatina-DNA aduktov (prevzaté z [38])

Viacere štúdie uvádzajú, že prítomnosť nukleozómov pozdĺž DNA je schopná inhibovať NER v bunkách liečených DNA-poškodzujúcimi činidlami, vrátane cisplatiny a UV žiarenia. V synteticky generovaných platinových oligonukleotídoch sa znížila účinnosť NER systému približne o 10 %, v porovnaní s platinovými oligonukleotidmi bez nukleozómov. Takáto inhibícia NER môže byť prekonaná aktivitou SWI/SNF chromatin remodulujúceho komplexu, ktorý sa aktivuje pri rozpoznaní poškodenia prostredníctvom NER faktorov XPA a SPC [59,74]. V súčasnosti je rastúci záujem o hodnotenie potenciálnej úlohy ERCC1, ako biomarkeru cisplatinovej rezistencie u rakoviny vaječníkov. Avšak žiadny

definitívny záver, v zmysle prediktívnej a/alebo prognostickej úlohy ERCC1, nebol zatiaľ vyslovený [56,69].

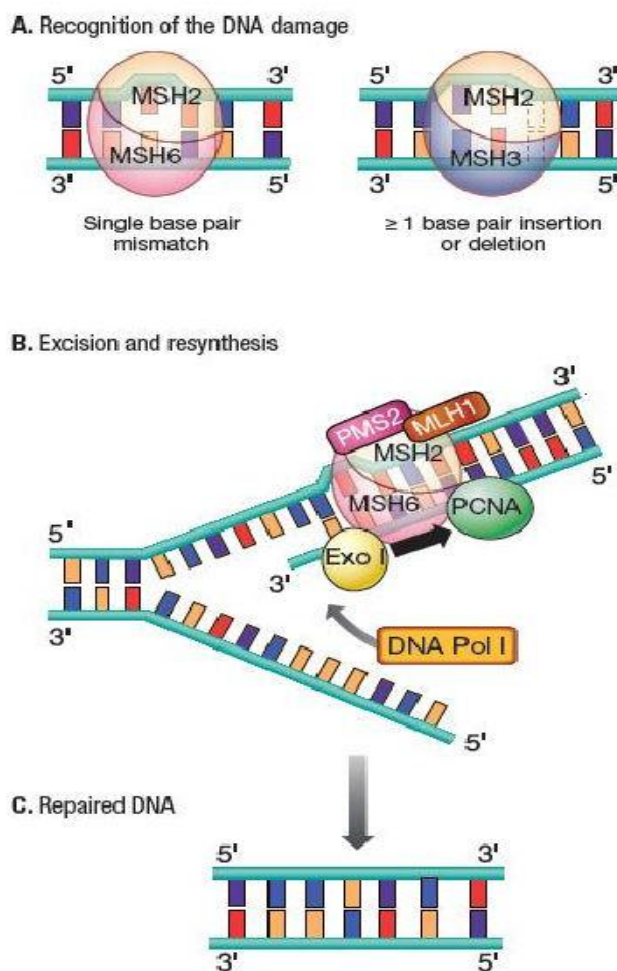
Oprava chybného párovania

Oprava chybného párovania je reťazcovo špecifická oprava DNA, podieľajúca sa na postreplikačnom odstraňovaní chýb spôsobených DNA-polymerázou, ktoré unikli spätnému korekčnému mechanizmu. MMR pozostáva z troch krokov – iniciácia, excízia, resyntéza – a zúčastňujú sa na nej proteíny, ako MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 a PMS2 (viď. Obrázok 7). Tieto sú schopné rozpoznať novonasyntetizovaný reťazec na základe odlišnej metylácie pôvodného a nového reťazca [37,49,69].

Keď DNA-polymeráza pri replikácii dôjde na miesto, kde je na templáte cisplatinový adukt, zaradí do novosyntetizovaného reťazca nesprávny nukleotid. MMR proteíny chybu rozpoznajú a vyštiepia úsek reťazca s nesprávnym nukleotidom. Na templáte však adukt ostáva a DNA-polymeráza opätovne zaraďuje chybný nukleotid. Bunka túto situáciu nie je schopná zvládnuť a smeruje do apoptózy.

Nádorové bunky deficitné v MMR sú dva až trikrát odolnejšie voči cisplatinovej liečbe v porovnaní s bunkami s účinnou MMR. Mnoho karcinómov deficitných v oprave chybného párovania má mutácie v MLH1 alebo MSH2 génoch.

Bola preukázaná súvislosť medzi expresiou týchto génov s klinickými prognózami, ako



Obrázok 7 Schéma krokov MMR opravného mechanizmu (prevzaté z [69])

aj odpoveďou na liečbu a celkovým prežitím pacientov [49,69]. Pozoruhodný je rozdiel v mechanizmoch MMR pri cisplatine a karboplatine oproti oxaliplatine. Sú aktivované rôzne bunkové kaskády a deficiencia v MMR mená vplyv na cytotoxicitu oxaliplatiny. To je dôležité najmä pre jej použitie v liečbe kolorektálneho karcinómu, pretože v týchto nádoroch je oprava chybného párovania často deficitná [59,68].

Oprava dvojreťazcových zlomov

Chemoterapia na báze cisplatiny vedie k tvorbe medzireťazcových mostíkov na DNA, ktoré spôsobujú vznik dvojreťazcových zlomov (double-strand breaks, DSBs) počas replikácie. DSBs patria medzi najtoxickejšie lézie na DNA. Keďže sa dotýkajú oboch reťazcov duplexu, nie je k dispozícii komplementárny reťazec, ktorý by poslúžil ako templát pri oprave. Ak tieto lézie nie sú opravené, bunka smeruje do apoptózy. Pri nesprávne prevedenej oprave, môže dôjsť k vytvoreniu sekundárnych lézií [59,69,75].

Bunky si vyvinuli dve hlavné dráhy pre opravu dvojreťazcových zlomov, a to:

- nehomológne spájanie (non-homologous end-joining, NHEJ),
- homológna rekombinácia (homologous recombination, HR).

Pokiaľ ide o opravu dvojreťazcových zlomov, bunky preferujú HR systém. Je to vysoko konzervatívny systém, všeobecne považovaný za mechanizmus bez chýb. Vyžaduje intaktné sesterské chromatidy, ktoré slúžia ako templát pre správnu opravu zlomov bez straty informácie [56,69,76].

Kľúčovými prvkami tohto opravného procesu sú proteíny BRCA1, BRCA2, RAD51 a PALB2. BRCA1 je súčasťou mnohých superkomplexov, z ktorých každý zohráva dôležitú úlohu pri aktivácii odpovede bunky na poškodenie DNA, aktivácii kontrolného bodu bunkového cyklu a/alebo pri oprave dvojreťazcových zlomov. V skutočnosti práve interakcia medzi špecifickými doménami BRCA1 a PALB2 je kľúčom v oprave DSBs [69,77].

Mutácie v doménach BRCA1 môžu potenciálne narušiť väzobnú afinitu na PALB2, čo má za následok zníženie funkcie HR opravného mechanizmu. Strata špecifickej funkcie BRCA1 v oprave dvojreťazcových zlomov je zdrojom genetickej nestability [54,69].

Línie malobunkového karcinómu pľúc rezistentné na cisplatinu a línie citlivé na cisplatinu sa výrazne nelíšili vo výskyte dvojreťazcových zlomov. To poskytuje nepriamy dôkaz, že cytotoxickými léziami cisplatiny sú mostíky v rámci jedného reťazca [59].

Tolerantná oprava/replikačný bypass

V niektorých bunkových líniách môže byť dosiahnutá tolerancia na cisplatinu aj bez nutnosti opravy DNA. Aby DNA modifikovaná cisplatinou mohla byť replikovaná a zároveň tolerovala lézie, musí DNA-polymeráza preskočiť cisplatinový adukt. Klasické replikačné DNA-polymerázy (α , δ , ϵ) nie sú schopné lézie obchádzať. Avšak bolo preukázané, že niekoľko polymeráz (η , ζ , ι) dokáže obísť jednoreťazcové mostíky, a to prostredníctvom transléznej syntézy [59,77].

Vo všeobecnosti môže s rezistenciou na cisplatinu súvisieť aj jej naviazanie na proteíny v krvnej plazme alebo v intersticiálnom priestore. Cisplatina sa na plazmatické proteíny viaže nevratne, čo podstatne znižuje jej vstup do bunky. Dodávka chemoterapeutika do tkanív sa mení aj s prietokom krvi. Vzhľadom k tomu, že autoregulácia prietoku krvi v nádoroch je defektná, kolísanie krvného tlaku má väčší vplyv na krvné zásobenie nádoru, ako v normálnych tkanivách. Preto činidla, ktoré menia krvný tlak, môžu selektívne meniť prietok krvi nádorovým tkanivom, a tým aj vstup liečivá do bunky. Je však nutné povedať, že v súčasnosti nie je známe, do akej miery tkanivový tlak a prietok krvi v nádoroch ovplyvňujú aktivitu cisplatiny [62].

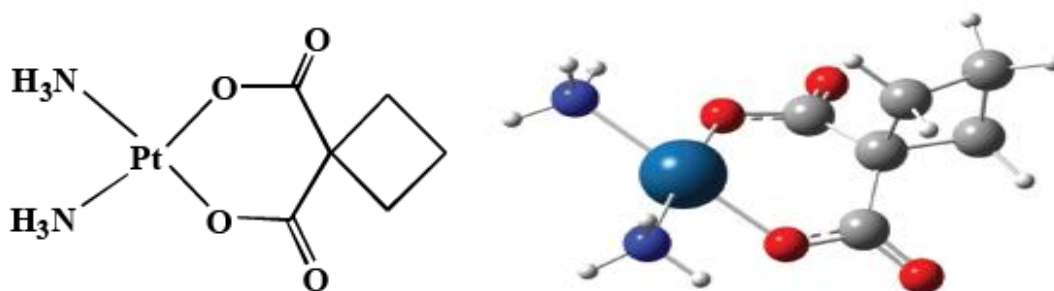
2.5 Karboxyláto komplexy platiny v oxidačnom stupni (II)

Od svojho schválenia sa cisplatina stala dôležitou súčasťou protinádorovej chemoterapie. V nasledujúcich troch desaťročiach, sa do klinických štúdií dostalo 23 liečiv na báze platiny. Iba päť z nich (karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina a heptaplatina) získalo medzinárodnú alebo národnú licenciu [17].

2.5.1 Karboplatina

Karboplatina, predávaná pod obchodným názvom Paraplatin[®] a predstavená spoločnosťou Johnson Matthey Plc. Institute of Cancer Research London, UK, je prvým z druhej generácie analógov cisplatiny [78]. Diammin-[1,1'-cyklobutandikarboxyláto(2-)]-

O,O'-platnatý komplex (vid'. Obrázok 8) bol navrhnutý špeciálne pre zníženie vedľajších účinkov spojených s podávaním cisplatiny. Predpokladalo sa, že toxicita liečiv na báze platiny je v priamom vzťahu s rýchlosťou, s akou sú jednotlivé odstupujúce skupiny hydrolyzované [15,17,79]. To sa potvrdilo úspešným znížením toxicity náhradou odstupujúcich dichloro-ligandov v cisplatine, bidentatným 1,1'-cyklobutandikarboxylátom v karboplatine, ktorý hydrolyzuje s rýchlostnou konštantou 10^{-8} s^{-1} v porovnaní s 10^{-5} s^{-1} dvoch chloridových aniónov cisplatiny. Práve vďaka nižšej reaktivite, môže byť karboplatina podávaná v oveľa vyšších dávkach ($300\text{--}450 \text{ mg.m}^{-2}$) ako cisplatina ($20\text{--}120 \text{ mg.m}^{-2}$), a to v závislosti od harmonogramu podávania [17,80]. Rovnako ako cisplatina, aj karboplatina vykazuje protinádorovú aktivitu pri rakovine vaječníkov, pľúc, hlavy a krku [78], pretože po hydratácii poskytuje rovnakú účinnú zložku a tvorí rovnaké adukty na DNA. Je teda klinicky účinná pri liečení rovnakých karcinómov. Vedľajšími účinkami - leukopénia, neutropénia, trombocytopénia - sa však od cisplatiny líši. Ide o toxicitu limitujúcu dávku (dose limiting toxicity, DLT) [17,81]. Hlavný reakčný mechanizmus karboplatiny, zahŕňa priamy atak nukleofilov, a to cez otvorenie kruhu a následné naviazanie sa na zložky DNA [78].

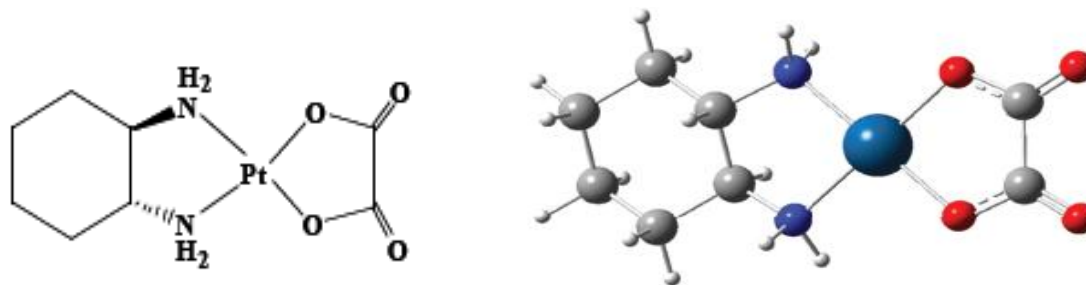


Obrázok 8 Karboplatina (prevzaté z [14,31])

2.5.2 Oxaliplatina

Oxaliplatina, ktorej systematický názov je [(1*R*,2*R*)-cyklohexan-1,2-diammin] [ethandioato-*O,O'*]platnatý komplex (vid'. Obrázok 9), bola, pod obchodným názvom Eloxatin[®], prvým liekom schváleným na prekonanie rezistencie voči cisplatine. Obsahuje bidentatný ligand (*R,R*)-cyklohexan-1,2-diammin (*R,R*-DACH), ktorý nahrádza dva ammin ligandy cisplatiny [78]. Alkalická hydrolýza produkuje monodentatný oxaláto komplex (disociačná konštanta $pK_a = 7,23$). Predpokladá sa, že monodentatný intermediát rýchlo

reaguje s endogénnymi zlúčeninami. Reaktívnym produktom hydrolýzy je (*R,R*-DACH)-diakva platnatý komplex, ktorý vznikne v druhom kroku hydrolýzy [12,31,82].

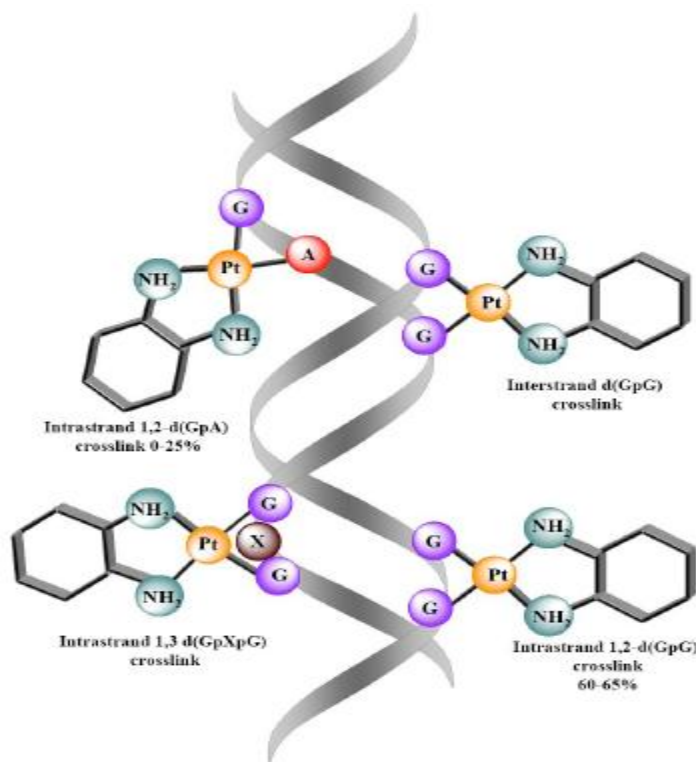


Obrázok 9 Oxaliplatina (prevzaté z [14,31])

Zdá sa, že oxaliplatina prekonáva previazanú (cross) rezistenciu voči cisplatine tým, že vytvára odlišné adukty na DNA (viď. Obrázok 10). Tvorí prevažne jednoreťazcové 1,2-d(GpG) mostíky, čím ohýba helix približne o 30° smerom k veľkému žliabku. Zároveň objemný hydrofóbny *R,R*-DACH ligand smerujúci do veľkého žliabku, bráni nasadnutiu opravných proteínov na DNA. V kryštálovej štruktúre komplexu oxaliplatina-DNA bola nájdená sekvencia 5'-d(CCTCTGGTCTCC) [17,31,83]. Bunkové a molekulové aspekty mechanizmu účinku oxaliplatiny neboli ešte celkom objasnené. Zdá sa však, že vnútorné chemické a stérické vlastnosti nehydrolyzovateľných (*R,R*-DACH)-platina aduktov na DNA, vyústia k vytvoreniu zlomu na DNA. Adukty oxaliplatiny sú opravované, rovnako ako adukty cisplatny, prevažne mechanizmom NER, a tiež rovnako ako cisplatina, je detoxikovaná enzýmami príbuznými glutathionu [31,82].

Ako už bolo uvedené, je oxaliplatina účinná voči kolorektálnemu karcinómu s lepším terapeutickým účinkom v porovnaní s cisplatinou alebo karboplatinou. V nedávnej dobe boli vykonané klinické štúdie, za účelom rozšírenia spektra aktivity oxaliplatiny, na liečbu metastázujúceho adenokarcinómu žalúdka a aesofagogastrického adenokarcinómu. Mnohé štúdie taktiež zahŕňajú testy účinnosti na rakovinu vaječovodov, vaječníkov, prsníkov, nemalobunkového karcinómu pľúc, karcinómu pankreasu, akútnej myeloidnej leukémii a heptómu [31,78]. Terapeutické účinky oxaliplatiny sú optimalizované synergickým efektom, pri podávaní v kombinácii s ďalšími protinádorovými preparátmi, ako sú 5-fluorouracil, cisplatina, karboplatina alebo inhibítory topoizomerázy I [31,83]. V neposlednom rade je potrebné uviesť, že oxalátový ligand výrazne znižuje závažnosť

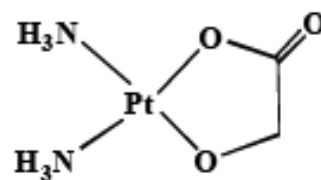
nežiaducích účinkov oxaliplatiny, oproti cisplatine alebo karboplatine [17], pričom kumulatívna neurosenzorická toxicita je toxicita limitujúca dávku [84].



Obrázok 10 Adukty oxaliplatiny: jednoreťazcové bifunkčné adukty (1,2-ApG, 1,2-GpG a 1,3-GpXpG) a medzireťazcový mostík (prevzaté z [31])

2.5.3 Nedaplatina

Nedaplatina, známa pod obchodným názvom Aqupla[®] a systematickým názvom diammin[hydroxyacetato(2-)-*O,O'*]platnatý komplex (vid'. Obrázok 11), bola nasyntetizovaná spoločnosťou Shionogi & Co., Ltd. Osaka, Japan. Spolu s karboplatinou patrí do druhej generácie cisplatinových analógov. Má desaťnásobne lepšiu rozpustnosť vo vode ako cisplatina a podstatne menšiu nefrotoxicitu v porovnaní s cisplatinou a karboplatinou



Obrázok 11 Nedaplatina (prevzaté z [31])

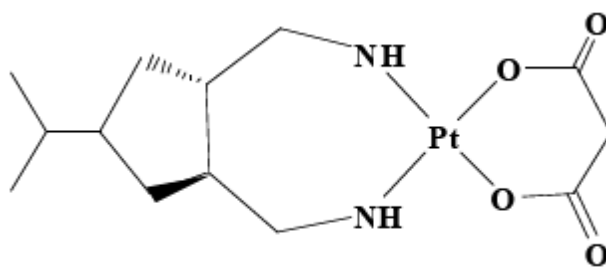
[17,78]. Keďže je nedaplatina štruktúrne podobná cisplatine, dajú sa očakávať rovnaké typy aduktov, ako tvoria cisplatina a karboplatina [12]. Od uvedenia na trh v roku 1995, bola nedaplatina používaná na liečbu nemalobunkového karcinómu pľúc, malobunkového karcinómu pľúc, karcinómu pažeráka a nádorov hlavy a krku. Maximálna tolerovaná dávka (MTD) je $90 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ s trombocytopéniou a neutropéniou ako toxicitami limitujúcimi dávku [17,78,85].

Sľubné výsledky boli získané v niekoľkých štúdiách vo fáze I a fáze II, kedy bola nedaplatina použitá v kombinovanej liečbe spinocelulárneho karcinómu ústnej dutiny. Nedaplatina, v režime s docetaxelom, dala čiastočnú odpoveď (partial response, PR) vo výške 33 %. Pri metastázujúcom karcinóme pažeráka poskytla, v kombinácii s paclitaxelom, úplnú odpoveď (complete response, CR) vo výške 3 % a PR 41 %. Navyše, terapia nemalobunkového karcinómu pľúc prostredníctvom nedaplatiny a irinotekanu, nasledovaná dávkami gefitinibu, mala celkovú odozvu (overall response, OR) vo výške 43 % [78,85].

2.5.4 Heptaplatina

Heptaplatina, ktorej systematický názov je [propandioato(2-)-*O,O'*][2-(1-methylethyl)-1,3-dioxolan-4,5-dimethanammin-*N,N'*]platnatý komplex (viď. Obrázok 12), bola vyvinutá a uvedená na trh S.K. Chemicals Life Sciences, Korea pod obchodným názvom Sunpla[®]. Do klinického testovania vstúpila vďaka vynikajúcej *in vitro* a *in vivo* toxicite na rôznych bunkových líniách [17,78,86].

Najvýraznejším rysom heptaplatiny je vysoká stabilita v roztoku, žiadna výrazná toxicita a silný protinádorový účinok na bunky rezistentné voči cisplatine. Maximálna tolerovaná dávka je $480 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ s hepatotoxicitou, nefrotoxicitou a myelosupresiou, ako toxicitami



Obrázok 12 Heptaplatina (prevzaté z [31])

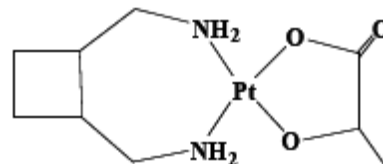
limitujúcimi dávku liečiva. V súčasnej dobe je heptaplatina používaná na liečbu karcinómu žalúdka [78, 86]. Po schválení liečiva, bola vykonaná štúdia vo fáze II, v kombinácii s 5-fluorouracilom a leukovorínom, na pacientoch s pokročilým štádiom rakoviny žalúdka.

Získala sa odpoveď vo výške 38 % , v porovnaní so 17 % pri použití samotného liečiva [17, 78, 86]. Výhoda liečby heptaplatinou, v porovnaní s cisplatinou, je v nižších vedľajších účinkoch pri neutropénii, v nižšom stupni proteinurie a emetogénnom účinku. Iné štúdie vo fáze III však zdôrazňujú, že nefrotoxicita je vyššia práve u heptaplatiny [17,78,86].

2.5.5 Lobaplatina

Lobaplatina, so systematickým názvom [2-hydroxypropanoato(2-)-*O,O'*][1,2-cyklobutandimethanammin-*N,N'*]platnatý komplex (viď. Obrázok 13), vyvinutá ASTA Medica (Degussa), Germany, je podávaná vo forme diastereomérskej zmesi, *S,S*- a *R,R*-konfigurácie nosného ligandu. Schválená bola pre liečbu chronickej myeloidnej leukémie, neoperovateľného karcinómu prsníkov a malobunkového karcinómu pľúc [17,78]. V poslednej dobe bola lobaplatina testovaná v kombinácii s vinorelbínom na liečenie neskorého štádia nemalobunkového karcinómu pľúc, avšak sa nepreukázalo žiadne výrazne zlepšenie oproti kombinácii cisplatina/vinorelbín, pričom PR bola vo výške 37 %. V súčasnosti je kombinácia lobaplatiny s 5-fluorouracilom a leukovorínom vo fáze III klinických testov na liečbu rekurentného alebo metastatického karcinómu pažeráka [17,78,87].

Je zaujímavé, že pri terapii lobaplatinou nebola zistená alopecia obličiek ani neurotoxicita alebo ototoxicita po podaní intravenózskej (IV) bolusovej injekcie. Ako vedľajšie účinky sú však pozorované anémia, nevoľnosť a emetogénny účinok, pričom toxicita limitujúca dávku je trombocytopenia [17,78,87].



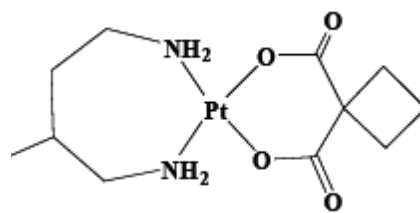
Obrázok 13 Lobaplatina (prevzaté z [31])

2.5.6 Karboxyláto komplexy Pt(II) vyradené z klinického testovania

Pre vývoj účinnejších a/alebo menej toxických liečiv je dôležité poznať aké látky už boli klinicky testované, i keď následne zlyhali. Dôvodom ukončenia klinických štúdií nemusí byť iba nedostatočná účinnosť alebo vysoká toxicita liečiv, ale aj nedostatok finančných prostriedkov. Niektoré z karboxyláto komplexov Pt(II), ktoré boli vyradené z klinického testovania sú uvedené nižšie.

Sebriplatina

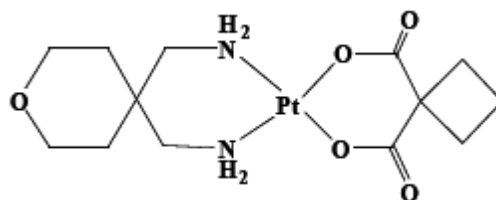
Sebriplatina so systematickým názvom [1,1-cyklobutandikarboxyláto(2-)-*O,O'*](2-methyl-1,4-butandiammin-*N,N'*) platnatý komplex (vid'. Obrázok 14), obsahujúca rovnakú odstupujúcu skupinu ako karboplatina, preukázala určitý potenciál na prekonanie rezistencie voči cisplatine u karcinómu vaječníkov a značný potenciál ako liek na leukémiu, čo je typ rakoviny, u ktorého lieky na báze cisplatiny nikdy u ľudí nepreukázali účinnosť [17]. Vo fáze I boli ukončené dve štúdie, a to ako denne päťkrát, respektíve mesačne jedenkrát, podávané IV infúzie. Pri opakovanom aplikovaní skúšobnej dávky bola neutropénia toxicitou limitujúcou dávkou. Vo fáze II bola doporučená dávka 30 mg.m⁻² za deň po dobu piatich dní. Vývoj liečiva bol ukončený z dôvodu nedostatočnej terapeutickkej účinnosti [17].



Obrázok 14 Sebriplatina (prevzaté z [31])

Enloplatina

Enloplatina, [1,1-cyklobutandikarboxyláto(2-)-*O,O'*][tetrahydro-4*H*-pyran-4,4-dimethylammin-*N,N'*]platnatý komplex (vid'. Obrázok 15), je vo vode rozpustné liečivo (450 mg.l⁻¹) s rovnakou odstupujúcou skupinou ako karboplatina a s nosným ligandom podobným zeniplatine (vid'. nižšie). Preklinické štúdie indikovali cytotoxicitu na rakovinu prsníkov, vaječníkov, na malobunkový karcinóm pľúc rezistentný voči cisplatine a embryonálny karcinóm. *In vivo* testy preukázali nízke toxické pôsobenie enloplatiny na obličky, dobrú fyzikálnu stabilitu a absenciu previazanej rezistencie s cisplatinou [17,88]. Počiatočné štúdie fázy I uvádzali, že nefrotoxicita bola zvládnuteľná a neutropénia limitovala dávku. V jedinej hlásenej štúdii vo fáze II bolo 18 pacientok s rakovinou vaječníkov rezistentných na cisplatinu liečených jednorazovou IV dávkou každých 21 dní bez prehydratácie, pričom bola pozorovaná iba jedna čiastočná odpoveď, preto boli ďalšie testy ukončené [17,88].



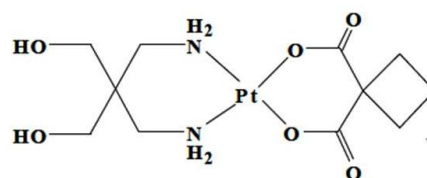
Obrázok 15 Enloplatina (prevzaté z [31])

Zeniplatina

Zeniplatina, [1,1-cyklobutandikarboxyláto(2-)-*O,O'*][2,2-bis(amminomethyl)-1,3-propandiol-*N,N'*]platnatý komplex (vid'. Obrázok 16), bola vybraná z rodiny dvadsiatich štruktúrne podobných komplexov. Je podstatne rozpustnejšia vo vode (7 mg.ml⁻¹) ako cisplatina (2 mg.ml⁻¹) [17,89].

Výsledky fázy I ukázali, že maximálna tolerovaná dávka je 145 mg.m⁻² s leukopéniou a neutropéniou ako toxicitami limitujúcimi dávku. Vo fáze II bola zeniplatina testovaná na 308 pacientoch s pokročilým štádiom rakoviny vaječníkov, prsníka, pokročilých maligných melanómov, metastatických melanómov, pokročilej renálnej rakoviny a pokročilého nemalobunkového karcinómu pľúc.

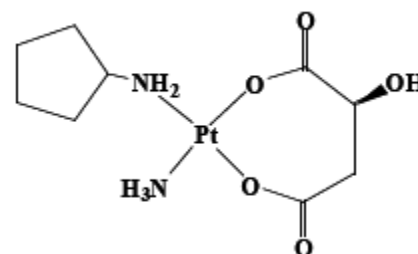
Miera odpovede bola väčšinou nízka (PR 10–14%). Len dvaja pacienti, s metastatickým melanómom lymfatických uzlín, podali úplnú odpoveď [17,90]. Klinický vývoj lieku bol zastavený z dôvodu vážnej nefrotoxicity, a to aj s použitím prehydratácie, hoci nebola pozorovaná v skorších fázach testovania [17,89].



Obrázok 16 Zeniplatina (prevzaté z [31])

Cykloplatam

Cykloplatam, [hydroxybutandioato(2-)-*O1,O4*][ammin(cyklopentanammin)]platnatý komplex (vid'. Obrázok 17), bol vyvinutý N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russia. Bol nasyntetizovaný v dvoch rôznych chirálnych formách s odstupujúcou hydroxylovou skupinou, buď v *cis*- alebo *trans*- polohe k cyklopentanovému kruhu, ako nosnému ligandu [17,91]. Preklinické štúdie uvádzajú, in vitro aktivitu najmä na bunkových líniách rakoviny vaječníkov, s určitou schopnosťou prekonať rezistenciu voči cisplatine a in vivo aktivitu na ľudské nádorové xenoimplantáty karcinómu pľúc. Vo fáze II sa cykloplatam testoval na liečbu rakoviny močového mechúra, karcinómu krčka maternice, prostaty a pleurálneho mezoteliómu. Dôvody ukončenia štúdie



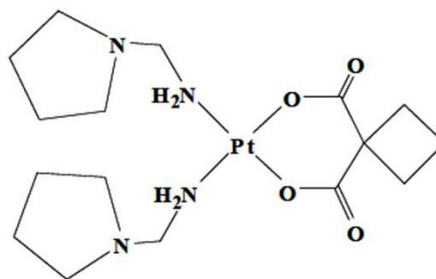
Obrázok 17 Cykloplatam (prevzaté z [31])

však nie sú známe [17,91].

Miboplatina

Miboplatina, [1,1-cyklobutandikarboxyláto(2-)-*O,O'*][(R)-2-amminomethylpyrolidin-*N,N'*]platnatý komplex (vid'. Obrázok 18), obsahujúca asymetrický alicyklický *N*-donorový ligand, bola vybraná pre ďalšie klinické testy vďaka svojej rozpustnosti vo vode, nižšej nefrotoxicite a silnej protinádorovej aktivite pri rakovine prostaty, prsníkov, hrubého čreva, pažeráka a pankreasu [17,92]. Na rozdiel od cisplatiny, *in vivo* štúdie ukázali, že protinádorový účinok miboplatiny je závislý na čase. Liečivo je účinnejšie, keď sa podáva v niekoľkých malých dávkach, oproti jednej veľkej bolusovej injekcii [17,92].

Vo fáze I klinických testov boli, ako toxicity limitujúce dávku, neutrocytopenia a gastrointestinálna toxicita. Odporúčaná bola dávka 800 mg.m^{-2} ako jednodinová IV infúzia opakovaná každé 3 až 4 týždne [17]. Vo fáze II klinických testov dosiahla miboplatina OR 44 % pri liečbe rakoviny vaječníkov a 21 % pri rakovine prsníka [17]. Vo fáze III bola porovnávaná účinnosť miboplatiny s cisplatinou na liečbu karcinómu vaječníkov. Miera odozvy bola 39 % pri aplikovaní miboplatiny a 47 % pri použití cisplatiny. Nižšia účinnosť miboplatiny viedla k zastaveniu ďalších testov [17,92].



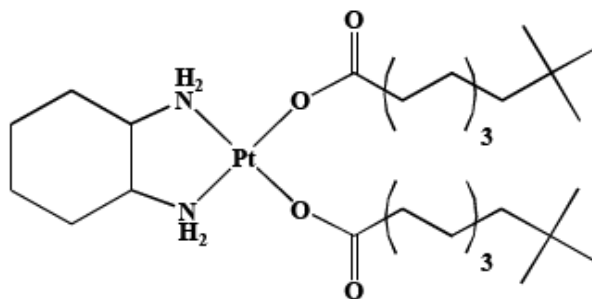
Obrázok 18 Miboplatina (prevzaté z [31])

Aroplatina

Aroplatina, známa tiež ako L-NDDP, sa skladá z lipofilného oxaliplatinového analógu, *cis*-bis-neodekanoáto-*trans*-(1*R*,2*R*-diamminocyklohexan)platnatý komplex (vid'. Obrázok 19), lipozomálne zapuzdreného v dimyristoyl fosfatidylcholine (DMPC) a dimyristol fosfatidylglycerole (DMPG) v pomere 1:15 (liečivo : lipid) [17,93]. Preklinické štúdie preukázali, že biologická dostupnosť NDDP je závislá na lipozomálnom zapuzdrení. DMPG je dôležitý pre riadenie stability a protinádorovej aktivity, pretože zvyšuje kyslosť prostredia lipozomálnej suspenzie, čím zvyšuje premenu NDDP proliečiva na aktívnu látku [17,93]. Štúdia vo fáze I na pacientoch s metastatickými nádormi, skúmajúca dávkovanie formou jednej IV injekcie každé štyri týždne, stanovila MTD na 312 mg.m^{-2} a myelosupresiu ako DLT. Fáza II tohto režimu bola vykonaná u pacientov s liečbou rezistentného pokročilého

kolorektálneho karcinómu. Liečba bola vo všeobecnosti dobre tolerovaná, so 45 % mierou odpovede u pacientov užívajúcich eskalované dávky, čo je zrovnateľné s monoterapiou pri oxaliplatine [17,93].

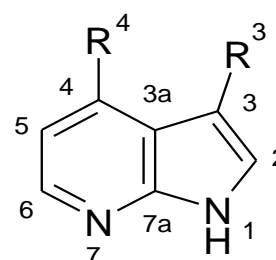
Druhá štúdia vo fáze I, skúmajúca intrapleurálne podávanie Aroplatiny po dobu 30 minút vždy po 21 dňoch, u pacientov s maligným pleurálnym vypotkom, určila MTD na 400 mg.m⁻² s chemickou pleuritídou ako DLT. Opäť bola pozorovaná nefrotoxicita, ale na rozdiel od IV podania, tu bola absencia myelosupresie. Následná fáza II používala intrapleurálne podanie, pričom dosiahla 42 % mieru odpovede s významnou, ale zvládnuteľnou toxicitou. Účinnosť však bola obmedzená na oblasť v priamom kontakte s pleurálnou dutinou [17,31,93]. Až donedávna aroplatina prechádzala rôznymi štúdiami vo fáze I a I/II ako monoterapia a tiež v kombinovaných terapiách, pri liečení pokročilej rakoviny hrubého čreva a konečníka, pokročilých pevných malignít a maligného pleuralného mezoteliómu. Z ekonomických dôvodov bol však ďalší vývoj liečiva zastavený [17].



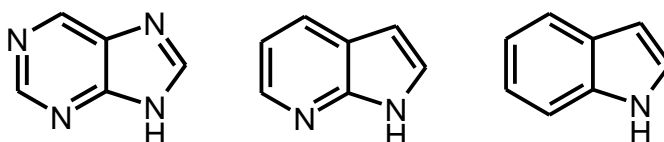
Obrázok 19 Aroplatina (prevzaté z [31])

2.6 7-azaindol

7-azaindol (1*H*-pyrrolo(2,3-*b*)pyridin) možno považovať za bioizostér indolovej alebo purínovej častice (vid'. Obrázok 21) [94,95]. Obsahuje jeden atóm dusíka v päťčlennom pyrrolovom kruhu a jeden atóm dusíka v šesťčlennom pyridinovom kruhu [96], pričom sú tieto kruhy prepojené väzbami C-C [97]. Atóm dusíka pyridinového kruhu sa chová ako π a σ akceptor, zatiaľ čo pyrrolový kruh pôsobí ako π donor a σ akceptor. Novšie štúdie uvádzajú, že na pyrrolovom atóme dusíka je lokalizovaný menší záporný náboj a atóm uhlíka v polohe 3 (vid'. Obrázok 20) vykazuje najvyššiu elektrónovú hustotu [96].



Obrázok 20 Štruktúrny vzorec a číslovanie atómov v 7-azaindole



Obrázok 21 9H-purín, 7-azaindol, indol

Prirodzene sa vyskytujúce 7-azaindoly sú relatívne zriedkavé v porovnaní so samotnými indolmi. Sú prítomné len v niekoľkých prírodných produktoch, ako sú alkaloidy z rodiny variolinu, ktoré boli izolované z huby *Kirkpatrickia variolosa*. Ukázali sa ako účinné proti bunkám myšacej leukémie P388 [95, 96]. Deriváty 7-azaindolu, okrem protinádorovej aktivity, vykazujú aj protizápalové a antivirálné účinky. Zároveň sa využívajú ako inhibítory proteínkináz a na liečbu kinázami indukovaných chorôb [98]. 7-azaindol bol tiež predmetom intenzívneho skúmania fluorescenčnou spektroskopiou. Pri izbovej teplote dochádza k tvorbe tautomérov vplyvom prenosu protónov. Keďže prechody medzi krajnými polohami sú veľmi rýchle, nebola zistená žiadna emisia dimérov. Tá sa objavila až po znížení teploty [96]. Fluorescencia 7-azaindolu je závislá aj od pH s maximom pri pH = 6. Jeho fluorescenčný profil je v rozmedzí pH 6–9, preto je 7-azaindol vhodný fluorofor pre použitie v biologických systémoch [67].

Pri štúdiu komplexu *cis*-[Pt(NH₃)(aza)Cl₂] sa zistilo, že po naviazaní 7-azaindolu na platínu, nedochádza k fluorescencii. Tá sa obnoví až po jeho uvoľnení z komplexu [67]. Uvedená skutočnosť môže poskytnúť cenné informácie o bunkovom metabolizme komplexov s nakoordinovanými derivátmi 7-azaindolu a pomôcť tak pri vytváraní účinnejších zlúčenín s nižšou toxicitou [99].

2.7 Platnaté komplexy s derivátmi 7-azaindolu

Predkladaná diplomová práca nadväzuje na výskum komplexov platiny s derivátmi 7-azaindolu, ktorý v posledných rokoch prebieha na Katedre anorganickej chémie. Boli študované *cis*-dichloro, oxaláto, cyklobutan-1,1'-dikarboxyláto a *cis*-dijodo komplexy s derivátmi 7-azaindolu, u ktorých bola študovaná ich *in vitro* cytotoxicita voči vybraným ľudským nádorovým bunkovým líniam, ako sú karcinómy vaječníkov, prostaty, prsníkov, pľúc alebo krčku maternice, osteosarkóm a malígný melanóm [98,100–103].

V prípade *cis*-dichloro komplexov (*cis*-[Pt(*naza*)₂Cl₂]) boli študované zlúčeniny s 3-chlor-7-azaindolom (*3Claza*), 3-brom-7-azaindolom (*3Braza*), 3-jod-7-azaindolom (*3Iaza*), 4-chlor-7-azaindolom (*4Claza*), 4-brom-7-azaindolom (*4Braza*), 5-brom-7-azaindolom (*5Braza*), 3-chlor-5-brom-7-azaindolom (*3Cl5Braza*) a 3-jod-5-brom-7-azaindolom (*3I5Braza*). U týchto zlúčenín bola stanovená *in vitro* cytotoxicita voči panelu ľudských nádorových bunkových línií (A2780, A2780R, MCF7, HOS, A549, HeLa, G361, LNCaP). Najaktívnejším sa ukázal komplex s *5Braza*, ktorý bol na uvedených ľudských nádorových bunkových líniách približne 6,7×, 12,9×, 9,8×, 13,7×, 5,3×, 2,3×, 5,7× resp. 2,5× aktívnejší ako cisplatina. Z výsledkov mechanistickej štúdie týchto látok vyplýva, že v porovnaní s cisplatinou sú až 45-krát viac akumulované v bunke, viac platinujú DNA a výrazne viacej indukujú apoptózu. Je preto možné usudzovať, že zmeny vyvolané vytvorením Pt-DNA aduktov s komplexmi obsahujúcimi 7-azaidol, môžu byť pre bunku oveľa závažnejšie, ťažšie opraviteľné a efektívnejšie smerujú bunku do apoptózy. U komplexov s *3Claza*, *3Iaza* a *5Braza* bola študovaná *in vivo* protinádorová aktivita na myšacom modeli lymfocytárnej leukémie L1210. Terapeutický účinok, z pohľadu doby života liečených myší, bol u komplexov so 7-azaindolmi (%T/C = 97,1–100,0) výrazne lepší v porovnaní s cisplatinou (%T/C = 93,3). Pri cisplatine bol síce zistený najvýraznejší úbytok hmotnosti nádorového tkaniva, avšak bol sprevádzaný značným znížením celkovej hmotnosti testovaných zvierat. Vplyv platnatých komplexov so 7-azaindolmi na hmotnosť nádorového tkaniva nebol tak výrazný. Tieto látky však v ďaleko menšej miere pôsobili na celkovú hmotnosť testovaných zvierat.

Taktiež boli pripravené a študované oxalátoplastnaté komplexy s derivátmi 7-azaindolu, ktoré boli, okrem komplexu s *3Braza*, neaktívne voči HOS a MCF7. V prípade komplexu [Pt(*3Braza*)₂(ox)], ktorý vykazoval dobrú *in vitro* cytotoxicitu voči HOS (IC₅₀ = 27,5 μM), MCF7 (IC₅₀ = 18,3 μM), G361 (IC₅₀ = 17,3 μM), HeLa (IC₅₀ = 31,8 μM) a A2780 (IC₅₀ = 19,2 μM), nebola na líniách A2780R, A549 a LNCaP zistená žiadna aktivita.

Ďalším typom doposiaľ študovaných komplexov sú diiodoplastnaté komplexy (*cis*-[Pt(*naza*)₂I₂]), ktoré boli použité i v predkladanej práci ako syntetické medziprodukty pre prípravu karboxyláto komplexov. U uvedených diiodo komplexov bola študovaná ich *in vitro* cytotoxicita voči A2780, A2780R, MCF7, HOS, A549, G361, HeLa a 22Rv1 (karcinóm prostaty) (vid'. Tabuľka 1). Ako môžeme vidieť, študované komplexy vykazovali vo väčšine prípadov výrazne vyššiu biologickú aktivitu v porovnaní s cisplatinou [98,100–103].

Tabuľka 1 *In vitro* cytotoxicita *cis*-dijodoplatnatých komplexov voči vybraným ľudským nádorovým bunkovým líniam

	A2780	A2780R	MCF7	HOS	A549	G361	HeLa	22Rv1
<i>cis</i> -[Pt(aza) ₂ I ₂]	3,5±0,7	3,3±0,3	1,7±0,8	0,8±0,4	12,3±1,1	2,9±0,6	7,0±0,6	4,6±1,2
<i>cis</i> -[Pt(3Claza) ₂ I ₂]	4,1±0,8	3,3±0,5	1,5±0,4	1,3±0,8	6,4±1,4	2,3±1,0	4,8±0,4	4,8±2,4
<i>cis</i> -[Pt(3Iaza) ₂ I ₂]	2,8±0,3	3,2±0,2	1,9±0,5	2,2±1,2	8,8±2,2	3,1±0,2	4,7±0,8	4,2±1,2
<i>cis</i> -[Pt(3Braza) ₂ I ₂]	2,3±1,1	2,6±0,8	1,8±0,3	2,8±1,0	9,8±1,3	1,6±0,7	6,2±0,7	4,5±1,6
<i>cis</i> -[Pt(4Claza) ₂ I ₂]	3,7±1,1	3,4±0,2	1,5±0,5	0,5±0,2	4,7±0,3	3,2±0,2	3,8±0,3	4,2±0,1
<i>cis</i> -[Pt(4Braza) ₂ I ₂]	3,7±1,1	3,3±0,4	1,0±0,4	0,4±0,1	4,3±0,9	3,2±0,2	3,8±0,2	3,8±0,1
<i>cis</i> -[Pt(5Braza) ₂ I ₂]	3,4±0,2	3,5±0,5	1,6±0,8	1,4±1,1	7,3±1,6	3,4±0,3	5,4±1,2	5,1±0,8
cisplatina	21,6±0,6	20,2±4,7	17,9±3,5	18,9±1,7	>50,0	5,3±0,7	30,4±11,0	26,9±3,5

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Chemikálie a prístroje

Chemikálie:

N-donorové ligandy: (1*R*,2*R*)-(-)-1,2-diaminocyklohexan (DACH; ≥ 98 %), 3-brom-7-azaindol (3*Braza*; 97 %), 4-brom-7-azaindol (4*Braza*; 96 %), 5-brom-7-azaindol (5*Braza*; 97 %), 3-chlor-7-azaindol (3*Claza*; 97 %), 4-chlor-7-azaindol (4*Claza*; 97 %), 3-jod-7-azaindol (3*Iaza*; 95 %) (Acros Organics, Fisher Scientific, Sigma-Aldrich)

O-donorové ligandy: kyselina ethylmalonová (H₂EtMal; 97%), kyselina malonová (H₂Mal; 99 %), kyselina 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octová (HMEE; ≥ 90 %), sodná soľ kyseliny dekanovej (NaDec; ≥ 98 %) (Sigma-Aldrich)

Rozpúšťadlá: acetonitril ($\geq 99,5$ %), ethanol (EtOH; ≥ 96 %), triethylamin (≥ 99 %), diethylether (Et₂O; ≥ 99 %), chloroform (≥ 99 %), methanol (MeOH; $\geq 99,5$ %), *N,N'*-dimethylformamid (DMF; ≥ 99 %), n-oktanol (≥ 99 %) (Fisher Scientific, Lach-ner, Penta)

Ostatné: cisplatina (CDDP; $\geq 99,9$ %), dusičnan strieborný (AgNO₃; ≥ 99 %), glutathion (GSH; ≥ 98 %), hydrát disodnej soli guanozín 5'- monofosfátu (GMP; ≥ 99 %), hydroxid sodný (NaOH; ≥ 97 %), tetrachloroplatnatan draselný (K₂[PtCl₄]; 98 %), jodid draselný (KI; ≥ 99 %) (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Penta)

Prístroje:

Elementárna analýza (C, H, N) bola prevedená na prístroji Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific).

¹H, ¹³C a ¹⁹⁵Pt NMR a ¹H-¹H gs-COSY, ¹H-¹³C gs-HMQC, ¹H-¹³C gs-HMBC a ¹H-¹⁵N gs-HMBC 2D NMR experimenty (gs = gradient selected, COSY = correlation spectroscopy, HMQC = heteronuclear multiple quantum coherence, HMBC = heteronuclear multiple bond coherence) boli merané na prístroji Varian 400 pri 400,00 MHz (¹H), 100,58 MHz (¹³C) a 86,00 MHz (¹⁹⁵Pt). Rozpúšťadlom bol DMF-*d*₇ a jednotlivé analýzy prebiehali pri teplote 300 K. ¹H a ¹³C NMR spektrá boli kalibrované voči reziduálnym signálom použitého rozpúšťadla (¹H NMR: 8,03, 2,92 a 2,75 ppm; ¹³C NMR: 163,15, 34,89 a 29,76 ppm).

Štiepenie vodíkových signálov je definované nasledovne: s = singlet, br = široký signál, d = dublet, dd = dublet dubletov, t = triplet, qui = kvintet, m = multiplet.

ESI-MS hmotnostné spektrá boli namerané v pozitívnom ionizačnom móde (ESI+) i v negatívnom ionizačnom móde (ESI-). Meranie prebiehalo na komplexoch rozpustených v methanole na prístroji LCQ Fleet od firmy Thermo Scientific (software QualBrowser, verzia 2.0.7).

Ďalšou použitou metódou bola infračervená spektroskopia (komplexy **(1)**–**(7)**). Infračervené spektrá boli zaznamenané za použitia ATR techniky na zariadení Nexus 670 FT-IR (Thermo Nicolet) v rozsahu vlnočtov 400–4000 cm^{-1} (mid-IR).

Koncentrácia platiny vo vodnej fáze nasýtenej n-oktanolom, za účelom stanovenia rozdeľovacieho koeficientu n-oktanol - voda, bola zistená prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) na prístroji Agilent 7700x.

3.2 Syntéza Pt(II) komplexov so substituovanými derivátmi 7-azaindolu

3.2.1 Syntéza prekurzorov (*cis*-dijodoplatnaté komplexy)

Syntéza *cis*-[Pt(*naza*)₂I₂], kde *naza* predstavuje *3Braza*, *4Braza*, *5Braza*, *3Claza*, *4Claza* alebo *3Iaza*, vychádzala z tetrachloroplatnatanu draselného (K₂[PtCl₄]; M = 415,09 g.mol⁻¹). Do varnej banky s rovným dnom (50 ml) bolo vnesených 0,5 mmol K₂[PtCl₄] (m = 207,5 mg). Látka bola rozpustená v minimálnom objeme destilovanej vody za pomoci sonifikácie ultrazvukom. K roztoku bolo pridaných 2,5 mmol jodidu draselného (KI; M = 166,00 g.mol⁻¹; m = 415,0 mg). Zmes bola intenzívne miešaná po dobu 1 h pri 25 °C, čím vznikol roztok K₂[PtI₄]. Po uplynutí tejto doby boli k reakčnej zmesi pridané dva molárne ekvivalenty, vzťahnuté ku K₂[PtCl₄], príslušného *N*-donorového ligandu, a to *3Braza*, *4Braza*, *5Braza* (M = 197,03 g.mol⁻¹; m = 197,0 mg), *3Claza*, *4Claza* (M = 152,58 g.mol⁻¹; m = 152,6 mg) alebo *3Iaza* (M = 244,03 g.mol⁻¹; m = 224,0 mg), rozpusteného v minimálnom objeme methanolu pôsobením ultrazvuku. Syntéza prebiehala cez noc za intenzívneho miešania pri 25 °C (vid'. Schéma 1). Práškový produkt žltej farby, *cis*-[Pt(*naza*)₂I₂], bol odfiltrovaný, premytý destilovanou vodou, MeOH a Et₂O a dosušený v exsikátore za zníženého tlaku. Výťažnosť reakcie bola 80–90 %.

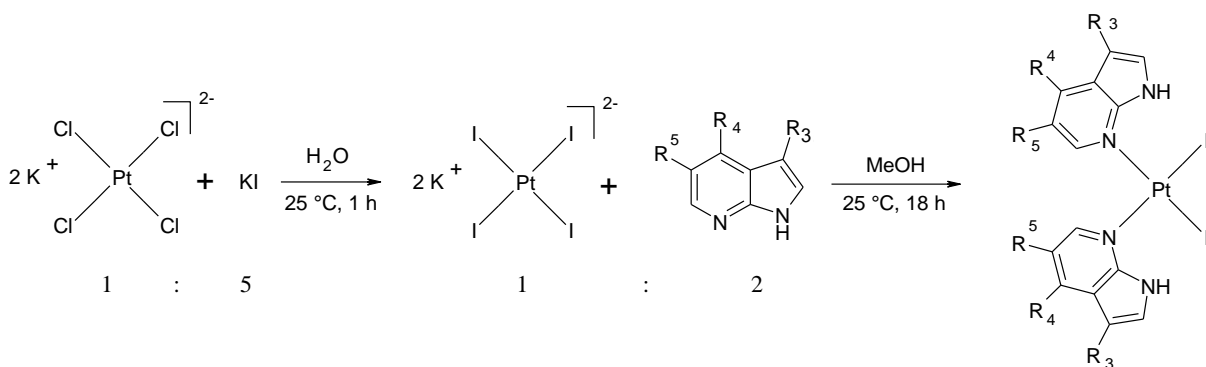


Schéma 1 Príprava Pt(II) prekursoru o zložení *cis*-[Pt(*naza*)₂I₂] (*3Braza*: R₃ = Br, R₄ = H, R₅ = H; *4Braza*: R₃ = H, R₄ = Br, R₅ = H; *5Braza*: R₃ = H, R₄ = H, R₅ = Br; *3Claza*: R₃ = Cl, R₄ = H, R₅ = H; *4Claza*: R₃ = H, R₄ = Cl, R₅ = H; *3Iaza*: R₃ = I, R₄ = H, R₅ = H)

3.2.2 Syntéza malonáto komplexov

Použitý *O*-donorový ligand (Mal = malonátový dianión) bol získaný syntézou pozostávajúcou z neutralizácie kyseliny malonovej (H₂Mal) a prípravy jej striebornej soli (Ag₂Mal).

H₂Mal, o látkovom množstve 1 mmol (M = 104,06 g.mol⁻¹; m = 104,1 mg), bola pôsobením ultrazvuku rozpustená v minimálnom objeme destilovanej vody. K roztoku kyseliny bolo pridané ekvimolárne množstvo roztoku NaOH (c = 1 M; M = 40,00 g.mol⁻¹; V = 2 ml). Zmes bola krátko premiešaná (cca 2 minúty), následne boli k reakčnej zmesi pridané 2 mmol AgNO₃ (M = 169,87 g.mol⁻¹; m = 339,7 mg). Reakcia prebiehala za tmy, ktorá sa docielila prekrytím reakčnej nádoby (25 ml) hliníkovou fóliou. Intenzívnym miešaním po dobu 10 minút pri teplote 25 °C vznikla biela zrazenina, ktorá predstavovala striebornú soľ kyseliny malonovej (Ag₂Mal; vid'. Schéma 2). Zlúčenina bola odfiltrovaná, premytá (destilovaná voda, MeOH, Et₂O) a uschovaná v tme a chlade.

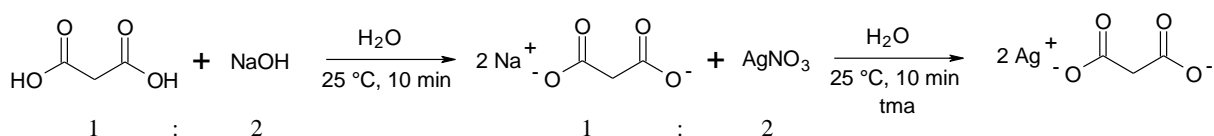


Schéma 2 Neutralizácia kyseliny malonovej a príprava jej striebornej soli

Príprava samotných komplexov prebiehala rozpustením 0,25 mmol konkrétneho prekursoru, a to *cis*-[Pt(*3Braza*)₂I₂], *cis*-[Pt(*4Braza*)₂I₂] (pre oba izoméry: M = 842,95 g.mol⁻¹; m = 210,7 mg) alebo *cis*-[Pt(*3Iaza*)₂I₂] (M = 936,95 g.mol⁻¹; m = 234,2 mg), v minimálnom objeme DMF s využitím sonifikácie. K roztoku bola pridaná Ag₂Mal v molárnom pomere 1 : 1 (M = 317,78 g.mol⁻¹; m = 79,4 mg). Reakčná zmes bola miešaná 48 h v tme (hliníková fólia) pri 25 °C (vid'. Schéma 3). Po uplynutí tejto doby boli jednotlivé komplexy prefiltrované cez fritu (S4), na ktorej ostal precipitát AgI s časťou produktu. Z tohto dôvodu bol AgI so zvyškom produktu premývaný DMF až do odfarbenia filtrátu. K filtrátu bola následne pridaná destilovaná voda, čím sa vylúčil produkt v podobe zrazeniny bledohnedej farby. Opäť nasledovala filtrácia a premytie destilovanou vodou, MeOH a Et₂O. Produkty [Pt(*3Braza*)₂(Mal)] (**1**), [Pt(*4Braza*)₂(Mal)] (**2**), [Pt(*3Iaza*)₂(Mal)] (**3**) boli dosušené v exsikátore za zníženého tlaku. Výťažnosť reakcie bola cca 60 %.

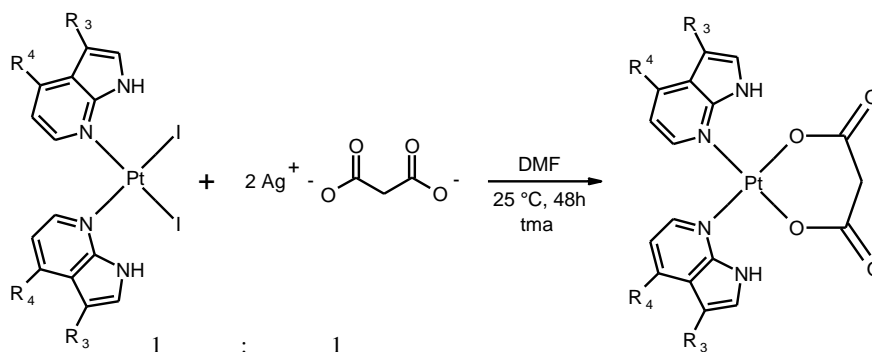


Schéma 3 Syntéza malonáto komplexov [Pt(*3Braza*)₂(Mal)] (**1**), [Pt(*4Braza*)₂(Mal)] (**2**) a [Pt(*3Iaza*)₂(Mal)] (**3**) (*3Braza*: R₃ = Br, R₄ = H; *4Braza*: R₃ = H, R₄ = Br; *3Iaza*: R₃ = I, R₄ = H)

3.2.3 Syntéza dekanoáto komplexov

Strieborná soľ kyseliny dekanovej (AgDec) bola pripravená rozpustením 1 mmol NaDec (M = 194,23 g.mol⁻¹; m = 194,2 mg) v minimálnom objeme destilovanej vody pôsobením ultrazvuku. K roztoku bolo pridané stechiometrické množstvo AgNO₃ (m = 169,9 mg) a zmes bola miešaná 10 minút v tme (hliníková fólia) pri 25 °C (vid'. Schéma 4). Vznikol precipitát bielej farby, ktorý bol od reakčnej zmesi oddelený filtráciou, premytý (destilovaná voda, MeOH a Et₂O) a uschovaný v tme a chlade.

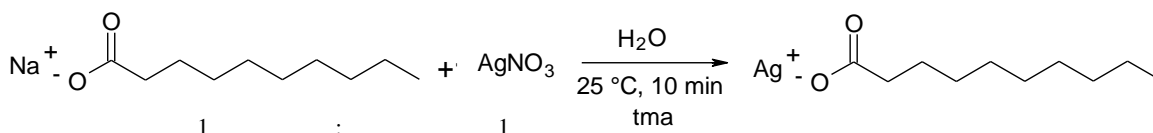


Schéma 4 Príprava striebornej soli kyseliny dekanovej

Na prípravu dekanooáto komplexov bolo rozpustených 0,25 mmol platnatého prekursoru, a to *cis*-[Pt(3Braza)₂I₂], *cis*-[Pt(4Braza)₂I₂] (pre oba izoméry: *m* = 210,7 mg), *cis*-[Pt(4Claza)₂I₂] (*M* = 754,05 g.mol⁻¹; *m* = 188,5 mg) alebo *cis*-[Pt(3Iaza)₂I₂] (*m* = 234,2 mg), v minimálnom objeme chloroformu (sonifikácia). Následne bola pridaná AgDec v molárnom pomere 1 : 2 (*M* = 279,11 g.mol⁻¹; *m* = 139,6 mg). Zmes bola miešaná počas 48 h v tme (hliníková fólia) pri 25 °C (vid'. Schéma 5). Po uplynutí tejto doby bol produkt, rozpustený v chloroforme, oddelený od zrazeniny (AgI) filtráciou. Precipitát (AgI) bol následne premývaný chloroformom až do odfarbenia filtrátu. Odparením organického rozpúšťadla vznikla gélovitá forma produktu. Pevný produkt tmavohnedej farby bol získaný pridaním Et₂O (20 ml) a jeho odparením dosucha. Komplexy *cis*-[Pt(3Braza)₂(Dec)₂] (**4**), *cis*-[Pt(4Braza)₂(Dec)₂] (**5**), *cis*-[Pt(4Claza)₂(Dec)₂] (**6**), *cis*-[Pt(3Iaza)₂(Dec)₂] (**7**) boli dosušené v exsíkátore za zníženého tlaku. Výťažnosť reakcie bola cca 50 %.

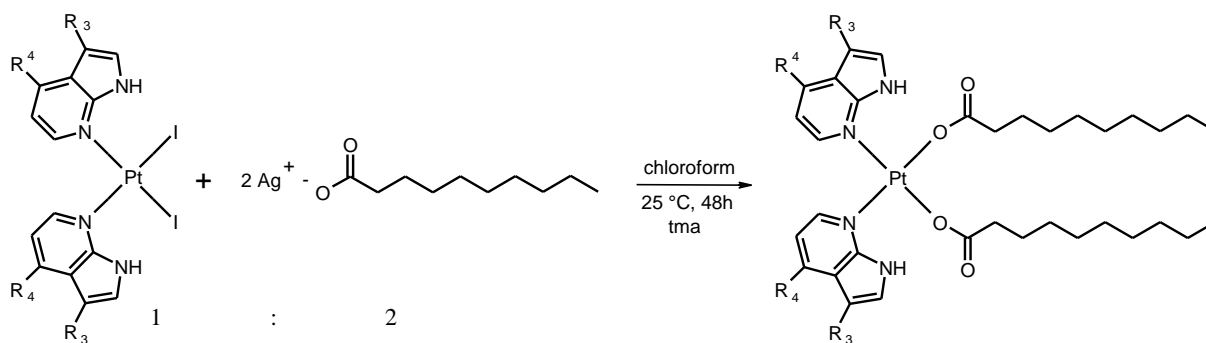


Schéma 5 Syntéza dekanooáto komplexov *cis*-[Pt(3Braza)₂(Dec)₂] (**4**), *cis*-[Pt(4Braza)₂(Dec)₂] (**5**), *cis*-[Pt(4Claza)₂(Dec)₂] (**6**) a *cis*-[Pt(3Iaza)₂(Dec)₂] (**7**) (3Braza: R₃ = Br, R₄ = H; 4Braza: R₃ = H, R₄ = Br; 4Claza: R₃ = H, R₄ = Cl; 3Iaza: R₃ = I, R₄ = H)

3.2.4 Syntéza ethylmalonáto komplexov

Rozpustením 1 mmol kyseliny ethylmalonovej (H₂EtMal; *M* = 132,11 g.mol⁻¹; *m* = 132,1 mg) v minimálnom objeme destilovanej vody (ultrazvuk) a jej zneutralizovaním

3.2.5 Syntéza 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexov

Pri príprave striebornej soli kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej (AgMEE) sa vychádzalo zo syntézy publikovanej v práci [105], s prepočtom na 1 mmol AgNO₃, upravením reakčnej doby a teploty.

V 127 μ l acetonitrilu a 2 ml EtOH bol rozpustený 1 mmol AgNO₃ ($m = 169,5 \cdot 10^{-3}$ g). Do roztoku bolo za stáleho miešania pridaných 195 μ l kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej (HMEE; $M = 178,19$ g.mol⁻¹; $\rho = 1,161$ g.ml⁻¹ pri 25 °C), 111 μ l triethylaminu ($M = 101,19$ g.mol⁻¹; $\rho = 0,726$ g.ml⁻¹ pri 25 °C) a 3 ml EtOH. Reakčná zmes bola miešaná v tme (hliníková fólia) po dobu 10 minút pri 25 °C, 30 minút pri 0 °C a 12 h pri -15 °C (vid'. Schéma 8). Po uplynutí tejto doby, bola zmes prefiltrovaná, premytá (EtOH a Et₂O) a ihneď použitá na syntézu 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexov.

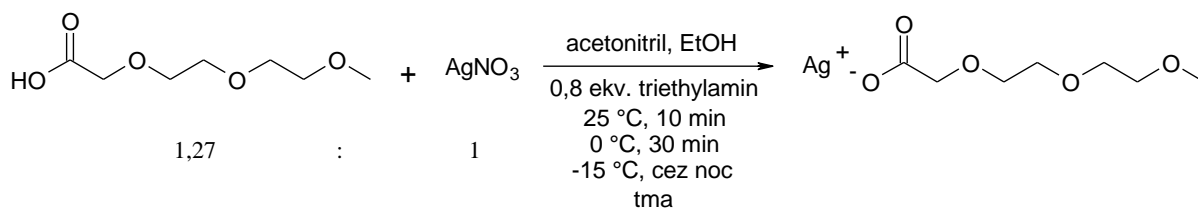


Schéma 8 Príprava striebornej soli kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej

Syntéza komplexov s derivátmi 7-azaindolu

V minimálnom objeme chloroformu bolo za pomoci ultrazvuku rozpustených 0,25 mmol *cis*-[Pt(3Braza)₂I₂] alebo *cis*-[Pt(4Braza)₂I₂] (pre oba izoméry: $m = 210,7$ mg). Po pridaní 0,5 mmol AgMEE ($M = 285,03$ g.mol⁻¹, $m = 142,5$ mg) bola reakčná zmes miešaná 48 h v tme (hliníková fólia) pri teplote 25 °C (vid'. Schéma 9). Následne bola zmes prefiltrovaná cez fritu (S4), na ktorej ostal AgI a časť produktu. Tieto boli premyté dostatočným objemom chloroformu (do odfarbenia filtrátu), ktorý bol následne odparený. Vznikla gélovitá forma produktu, ku ktorému bolo pridaných 20 ml Et₂O (sonifikácia). Odparením organického rozpúšťadla bol získaný pevný tmavohnedý produkt. Komplexy *cis*-[Pt(4Braza)₂(MEE)₂] (**10**) a *cis*-[Pt(3Braza)₂(MEE)₂] (**11**) boli následne dosušené v exsikátore za zníženého tlaku.

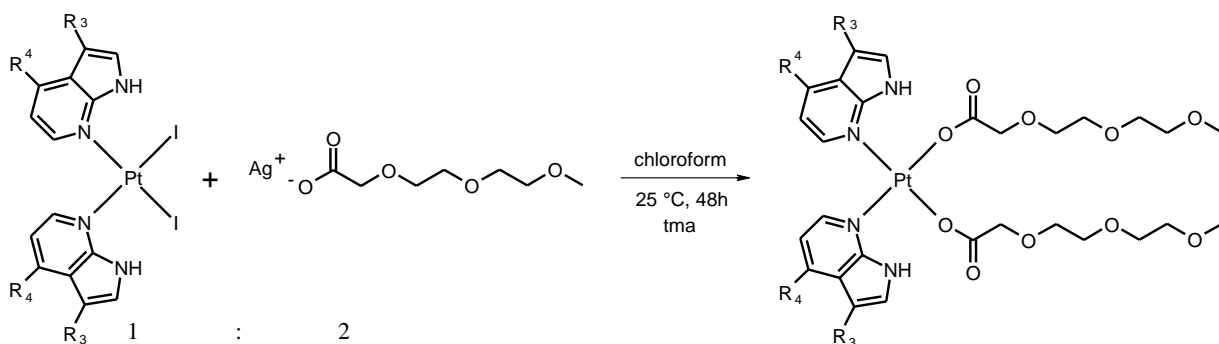


Schéma 9 Syntéza 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexov s derivátmi 7-azaindolu o složení *cis*-[Pt(*4Braza*)₂(MEE)₂] (**10**) a *cis*-[Pt(*3Braza*)₂(MEE)₂] (**11**) (*3Braza*: R₃ = Br, R₄ = H; *4Braza*: R₃ = H, R₄ = Br)

Syntéza komplexu s 1,2-diaminocyklohexanom

Syntéza [Pt(DACH)I₂], podobne ako syntéza *cis*-[Pt(*naza*)₂I₂], vychádzala zo zlúčeniny K₂[PtCl₄]. Do čerstvého roztoku K₂[PtCl₄] (vid'. kapitola 3.2.1) bolo pridané ekvimolárne množstvo, vzťahnuté ku K₂[PtCl₄], DACH (M = 114,19 g.mol⁻¹; m = 57,1 mg) rozpusteného v minimálnom objeme methanolu (sonifikácia). Syntéza prebiehala cez noc za intenzívneho miešania pri 25 °C (vid'. Schéma 10). Produkt [Pt(DACH)₂I₂] bol odfiltrovaný, premytý (destilovaná voda, MeOH a Et₂O) a dosušený v exsikátore za zníženého tlaku.

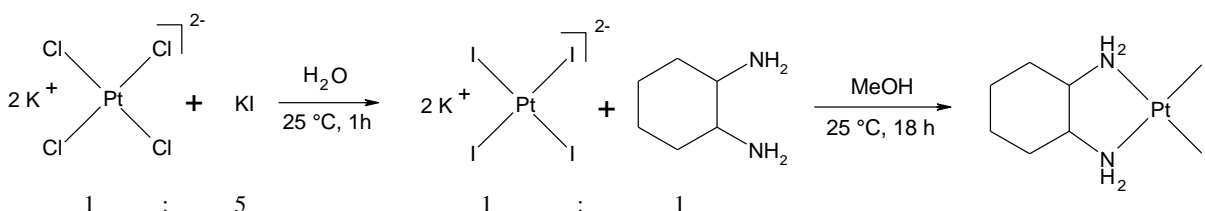


Schéma 10 Príprava [Pt(DACH)I₂]

Na prípravu [Pt(DACH)(MEE)₂] (**12**) bolo rozpustených 0,25 mmol [Pt(DACH)I₂] (M = 563,06 g.mol⁻¹; m = 140,8 mg) v minimálnom objeme chloroformu za pomoci ultrazvuku. Následne bola pridaná AgMEE v molárnom pomere 1 : 2 (m = 142,5 mg). Zmes bola miešaná počas 48 h v tme (hliníková fólia) pri 25 °C (vid'. Schéma 11). Produkt, rozpustený v chloroforme, bol od zrazeniny (AgI) oddelený filtráciou, pričom zrazenina AgI bola následne premyvaná chloroformom až do odfarbenia filtrátu. Odparením organického rozpúšťadla vznikla gélovitá forma produktu. Pevný produkt bledohnedej farby bol získaný

pridaním Et₂O (20 ml) a jeho odparením dosucha. Nasledovalo dosušenie v exsikátore za zníženého tlaku.

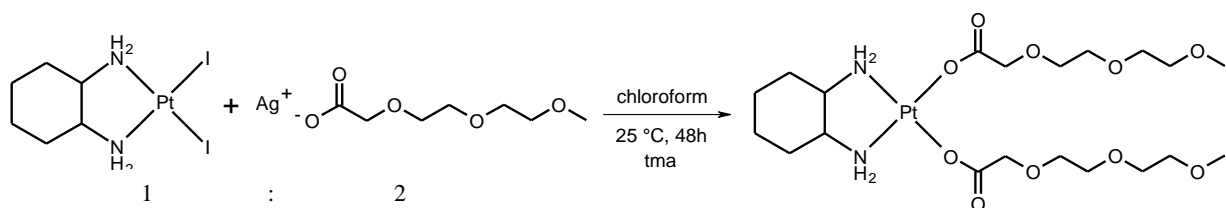


Schéma 11 Syntéza 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexu s DACH

3.3 *In vitro* cytotoxicita

U vybraných komplexov bola stanovená *in vitro* cytotoxicita na nádorových bunkových líniah ľudského karcinómu vaječníkov A2780 (citlivé na cisplatinu) a A2780R (rezistentné na cisplatinu) a na normálnych bunkových líniah ľudských fibroblastov MRC5, zakúpených od European Collection of Cell Cultures (ECACC). Bunkové línie boli kultivované podľa inštrukcií ECACC a boli udržiavané vo zvlhčenej atmosfére inkubátora s obsahom 5 % oxidu uhličitého pri teplote 37 °C.

Taktiež bola stanovená *in vitro* cytotoxicita na kultúrach ľudských hepatocytov (Hep) izolovaných z pečeneového tkaniva 70 ročného muža, ako multiorganového darcu, a to v súlade s protokolom vydaným etickou komisiou Českej republiky. Hepatocyty boli izolované dvojstupňovou perfúziou perfúznym médiom s obsahom enzýmu kolagenáza. Bunky boli nanosené na kolagénom potiahnuté kultivačné misky s hustotou 140 000 buniek/cm², spolu s Williamsovým a Ham F-12 (1 : 1) kultivačným médiom obohateným o penicilín, streptomycín, kyselinu askorbovú, kyselinu listovú, holotransferín, ethanolamín, glukagón, inzulín, dexamethazón, pyruvát, glukózu, glutamín, amfotericín a 2 % fetálne tel'acie sérum [106]. Po 24 hod bolo médium vymenené za bezsérové a kultúra bola stabilizovaná ďalších 24 hod vo zvlhčenej atmosfére inkubátora s obsahom 5 % oxidu uhličitého pri teplote 37 °C.

In vitro cytotoxicita bola stanovená pomocou MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) testu, ktorý využíva schopnosť živých buniek redukovať žltú soľ MTT, pričom vzniká modré formazanové farbivo. Suspenzie buniek boli nanosené na mikrotitračné doštičky s 96 jamkami. Ľudské hepatocyty a bunkové línie A2780, A2780R

a MRC5 boli po dobu 24 hodín vystavené pôsobeniu testovaných komplexov a cisplatiny s koncentráciou do 50 μM (A2780, A2780R, MRC5) resp. 250 μM (Hep) v prípade, že nebola obmedzená rozpustnosťou komplexov. Následná MTT analýza bola prevedená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm na prístroji TECAN Infinite M200 Pro, Schoeller Instruments LLC.

Meraním boli získané tri parciálne hodnoty IC_{50} , pričom výsledná hodnota IC_{50} bola vypočítaná ako aritmetický priemer. Významnosť rozdielov získaných výsledkov ($p < 0,05$ štatisticky významné) bola vyhodnotená ANOVA analýzou (QC Expert 3.2, Statistical software, TriloByte Ltd.).

3.4 Štúdium hydrolyzy a interakcie s biomolekulami

V rámci štúdia hydrolyzy a interakcie nasyntetizovaných malonáto komplexov s biomolekulami prebehlo päť experimentov (A–E). Základom každého bol komplex (**2**), vybraný ako reprezentatívny, o navážke 5,0 mg ($M = 691,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $n = 7,23\cdot 10^{-3} \text{ mmol}$) rozpustený v 0,25 ml DMF- d_7 .

Štúdium hydrolyzy zastrešoval *experiment A*. K rozpustenému komplexu sa pridalo 0,25 ml H_2O a ihneď bola prevedená ^1H NMR spektroskopia (0 h). Ďalšie meranie prebehlo po 24 hodinách státia vzorky pri 25 $^\circ\text{C}$ (24 h).

Experiment B pozostával z rozpustenia 1,5 mg NaCl ($M = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $n = 2,6\cdot 10^{-5} \text{ mol}$; $c = 104 \text{ mM}$) v 0,25 ml vody a následného pridania k rozpustenému komplexu. Opäť bola prevedená ^1H NMR spektroskopia v čase 0 h a 24 h.

Na *experiment C* sa použila látka GSH ($M = 307,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $m = 4,4 \text{ mg}$) a na *experiment D* látka GMP ($M = 407,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $m = 5,9 \text{ mg}$). Dva molárne ekvivalenty oboch látok sa rozpustili v 0,25 ml vody s následným pridaním ku komplexu rozpustenému v DMF- d_7 . ^1H NMR spektrá boli získané v čase 0 h a 24 h.

Posledný experiment, *experiment E*, sa týkal oboch, GSH i GMP. Voda o objeme 0,25 ml, v ktorej sa rozpustili dva molárne ekvivalenty GSH a dva molárne ekvivalenty GMP, sa pridala ku komplexu rozpustenému v DMF- d_7 . Nasledovala analýza interakcií komplexu s biomolekulami prostredníctvom ^1H NMR spektroskopie (0 h; 24 h).

3.5 Štúdium lipofility komplexov

Odmerným valcom sa odmeralo 150 ml destilovanej vody a 150 ml n-oktanolu. Rozpúšťadlá sa zmiešali a následne intenzívne miešali 24 h pri 25 °C, aby došlo k ich nasýteniu. Po uplynutí tejto doby sa jednotlivé fázy oddelili pomocou deliaceho lievika (500 ml). Do siedmych reakčných nádob (25 ml) sa odobralo 15 ml vody saturovanej n-oktanolom (OSW) a pridal sa 1 mg testovaných komplexov alebo cisplatiny, ako štandardu. Roztoky boli sonifikované 15 minút a následne centrifugované po dobu 5 minút. Odobrali sa 4 ml z každého roztoku a stanovila sa koncentrácia platiny (c_{wso}) prostredníctvom ICP-MS. Ďalších 10 ml roztoku sa zmiešalo s rovnakým objemom n-oktanolu saturovaného vodou (WSO). Zmesi boli pretrepávané 1 h a po oddelení fáz bola opäť stanovená koncentrácia platiny vo vodnej fáze pomocou ICP-MS, pričom rozdiel koncentrácií platiny vo vode pred a po pretrepávaní je rovný c_{wso} .

Rozdeľovací koeficient n-oktanol–voda je definovaný ako pomer rovnovážnych koncentrácií rozpustenej látky v dvojfázovom systéme rozpúšťadiel n-oktanol a voda, najčastejšie vyjadrený vo forme dekadického logaritmu (1):

$$\log P_{ow} = \log \frac{c_{wso}}{c_{osw}}, \quad (1)$$

kde: P_{ow} je rozdeľovací koeficient oktanol–voda, c_{osw} je koncentrácia Pt v OSW (voda), c_{wso} je koncentrácia Pt vo WSO (n-oktanol).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa vyššie popísaných syntéz sa pripravili štyri typy karboxylátplatnatých komplexov (*O*-donorovými ligandmi boli malonát (Mal), dekanoát (Dec), ethylmalonát (EtMal) a 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetát (MEE)) so substituovanými derivátmi 7-azaindolu, ako nosnými *N*-donorovými ligandmi. Predpokladané zloženie pripravených komplexných zlúčenín je uvedené v tabuľke 2. Taktiež sa pripravil jeden 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplex obsahujúci rovnaký *N*-donorový ligand (DACH), ako oxaliplatina. K tomuto kroku nás viedla skutočnosť, že použitý odstupujúci ligand (MEE) je zatiaľ z pohľadu bioanorganickej chémie platnatých komplexov neznámy. Preto je žiaduce zrovnanie jeho komplexov odvodených od klinicky používaných liečiv (napr. spomínaná oxaliplatina) s komplexmi novými, ako sú v tejto práci popísané komplexy so 7-azaindolmi. Dôvodom prípravy rôznych typov látok bola snaha rozšíriť portfólio karboxylátplatnatých komplexov a nájsť vhodné *O*-donorové ligandy, ktoré zvýšia rozpustnosť komplexov a budú vhodnými odstupujúcimi skupinami pre biologicky aktívne látky. Dianióny malonátu a ethylmalonátu sa použili pre svoju štruktúrnú podobnosť s *O*-donorovým ligandom registrovaného liečiva karboplatiny, pričom u ethylmalonátu sa očakáva zvýšenie lipofility z dôvodu prítomnosti skupiny CH_3CH_2- . Dekanoátový anión bol zvolený za účelom zvýšenia lipofility, ktorú môže komplexu zabezpečiť značne nepolárna štruktúra dlhého uhľohľovodíkového reťazca. Posledným použitým *O*-donorovým ligandom je 2-[2-(2-metoxyetoxy)etoxi]acetátový anión, ktorý bol vybraný kvôli štruktúrnej podobnosti s polyetylglykolom. Polyetylglykol je látka biodegradabilná a biokompatibilná, ktorá sa neakumuluje v organizme. Je zaujímavá ako nosný systém pre liečivá. Našla uplatnenie pri funkcionalizácii nanočastíc, ktorým udáva maskovací charakter a schopnosť dlhodobej cirkulácie v tele bez rozpoznania imunitným systémom.

Komplexné zlúčeniny sa podrobili elementárnej analýze, ktorá ukázala, že pri komplexoch (**1**)–(**11**) je rozdiel medzi vypočítanými a nameranými hodnotami percentuálneho zastúpenia prvkov C, H, N menší ako 0,5 % (vid'. Tabuľka 2). Komplex $[\text{Pt}(\text{DACH})(\text{MEE})_2]$ (**12**) je značne znečistený. Obsah nečistôt spôsobil záporný nárast odchýlky vypočítaných a nameraných hodnôt percentuálneho zastúpenia uhlíka v zlúčenine o 2,0 %, čím prekročil stanovený limit pre čistotu látky a bol vyradený z ďalších experimentov. Syntéza, ktorá je vyššie popísaná, sa tak nejaví byť univerzálnou pre všetky platnaté komplexy s karboxyláto alebo dikarboxyláto ligandami a je potrebné ju optimalizovať.

Tabuľka 2 Výsledky elementárnej analýzy komplexov

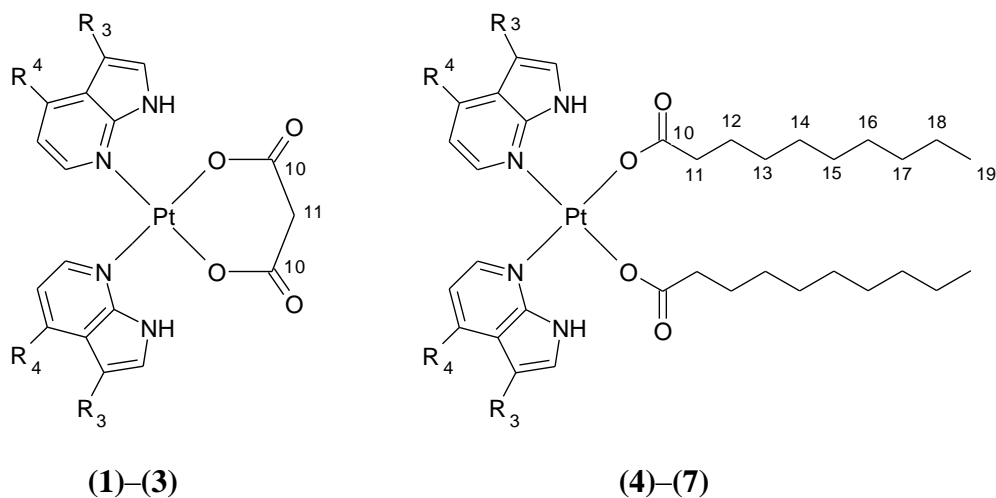
Komplex	C [%]	H [%]	N [%]
	vyp. / naj.	vyp. / naj.	vyp. / naj.
(1) [Pt(3Braza) ₂ (Mal)]	29,5 / 29,5	1,8 / 1,8	8,1 / 7,7
(2) [Pt(4Braza) ₂ (Mal)]	29,5 / 29,6	1,7 / 1,6	8,1 / 7,8
(3) [Pt(3Iaza) ₂ (Mal)]	26,0 / 25,8	1,5 / 1,5	7,1 / 6,9
(4) <i>cis</i> -[Pt(3Braza) ₂ (Dec) ₂]	43,8 / 44,1	5,2 / 5,4	6,0 / 5,6
(5) <i>cis</i> -[Pt(4Braza) ₂ (Dec) ₂]	43,8 / 43,4	5,1 / 5,4	6,0 / 5,6
(6) <i>cis</i> -[Pt(4Claza) ₂ (Dec) ₂]	48,5 / 45,2	5,7 / 5,8	6,6 / 6,3
(7) <i>cis</i> -[Pt(3Iaza) ₂ (Dec) ₂]	39,8 / 39,6	4,7 / 4,7	5,5 / 5,1
(8) [Pt(4Braza) ₂ (EtMal)]	31,7 / 31,5	2,2 / 2,2	7,8 / 7,0
(9) [Pt(5Braza) ₂ (EtMal)]	31,7 / 31,6	2,2 / 2,0	7,8 / 6,8
(10) <i>cis</i> -[Pt(3Braza) ₂ (MEE) ₂]	35,6 / 35,2	3,8 / 3,6	5,9 / 5,7
(11) <i>cis</i> -[Pt(4Braza) ₂ (MEE) ₂]	35,6 / 35,2	3,8 / 3,5	5,9 / 5,8

4.1 Malonáto a dekanoáto komplexy

Komplexy (1)–(7) (viď. Obrázok 22) boli podrobené charakterizácii prostredníctvom experimentov ¹H, ¹³C a ¹⁹⁵Pt NMR a 2D NMR experimentmi (¹H-¹H gs-COSY, ¹H-¹³C gs-HMQC, ¹H-¹³C gs-HMBC) a v prípade komplexu (2) a (7) i ¹H-¹⁵N gs-HMBC, hmotnostnou spektrometriou s ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom (ESI+) a negatívnom ionizačnom móde (ESI-), infračervenou spektroskopiou s použitím ATR techniky v rozsahu vlnočtov 400–4000 cm⁻¹. Monokryštalová rentgenoštruktúrna analýza komplexov žiaľ nebola prevedená. Nepodarilo sa vypestovať monokryštal u žiadneho z pripravených komplexov.

(1): ¹H NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 13,46 (s, N1-H), 8,90 (d, 4,9, C6-H), 8,10 (d, 2,2, C2-H), 8,07 (d, 7,9, C4-H), 7,30 (dd, 7,9, 5,7, C5-H), 3,74 (s, C11-H₂). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 175,3 (C10), 148,3 (C7a), 147,6 (C6-H), 131,2 (C4-H), 128,6 (C2-H), 123,3 (C3a), 118,6 (C5-H), 90,0 (C3), 51,1 (C11-H₂). ¹⁹⁵Pt NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ -1718,1. ESI+ MS (methanol, *m/z*): 715,1 (vyp. 714,9; 100%; {[Pt(Mal)(3Braza)₂]+Na}⁺), 693,2 (vyp. 692,9; 25%; {[Pt(Mal)(3Braza)₂]+H}⁺), 197,1 (vyp. 197,0; 20%; {(3Braza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 691,2 (vyp. 690,9; 100%; {[Pt(Mal)(3Braza)₂]-H}⁻), 493,4 (vyp. 492,9; 10%; {[Pt(Mal)(3Braza)₂]-H}⁻), 195,2 (vyp. 195,0; 2%; {(3Braza)-H}⁻), 103,1 (vyp. 103,0; 3%; {(Mal)+H}⁻). IR (ν_{ATR}/cm⁻¹): 453w, 512w, 551w, 598w, 648m, 679w, 749s,

789m, 894w, 940m, 1002s, 1103m, 1128m, 1162m, 1206m, 1274s, 1337s, 1377s, 1443s, 1487m, 1605vs, 1633vs, 1713w, 2823m, 2903m, 3104s, 3203m, 3346m, 3626w.



Obrázok 22 Pripravené malonáto (1) - (3) a dekanóáto (4) - (7) komplexy

(2): ^1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,42 (s, N1–H), 8,70 (d, 6,2, C6–H), 7,99 (t, 2,9, C2–H), 7,49 (d, 6,2, C5–H), 6,68 (m, C3–H), 3,73 (s, C11–H $_2$). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 175,4 (C10), 148,0 (C7a), 147,2 (C6–H), 130,2 (C2–H), 128,7 (C3a), 125,4 (C4), 121,3 (C5–H), 102,9 (C3–H), 51,2 (C11–H $_2$). ^{15}N NMR (DMF- d_7 , ppm): δ 151,2 (N7), 139,3 (N1–H). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , ppm): δ -1706,6, ESI+ MS (methanol, m/z): 715,2 (vyp. 714,9; 100%; $\{[\text{Pt}(\text{Mal})(4\text{Braza})_2]+\text{Na}\}^+$), 693,2 (vyp. 692,9; 40%; $\{[\text{Pt}(\text{Mal})(4\text{Braza})_2]+\text{H}\}^+$), 197,2 (vyp. 197,0; 10%; $\{(4\text{Braza})+\text{H}\}^+$). ESI– MS (methanol, m/z): 691,2 (vyp. 690,9; 100%; $\{[\text{Pt}(\text{Mal})(4\text{Braza})_2]-\text{H}\}^-$), 493,4 (vyp. 492,9; 20%; $\{[\text{Pt}(\text{Mal})(4\text{Braza})]-\text{H}\}^-$), 195,3 (vyp. 195,0; 5%; $\{(4\text{Braza})-\text{H}\}^-$). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 505w, 541w, 604w, 647w, 756m, 804m, 855m, 915w, 934w, 969w, 1071w, 1113w, 1172m, 1188m, 1259m, 1276m, 1340s, 1378s, 1482m, 1506m, 1587vs, 1634s, 1714w, 2737w, 2909w, 3095m, 3468w, 3520w, 3670w.

(3): ^1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,50 (s, N1–H), 8,88 (d, 4,9, C6–H), 8,11 (d, 2,2, C2–H), 7,91 (d, 7,9, C4–H), 7,29 (dd, 7,5, 5,7, C5–H), 3,73 (s, C11–H $_2$). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 175,0 (C10), 148,2 (C7a), 147,8 (C6–H), 133,4 (C2–H), 132,6 (C4–H), 126,3 (C3a), 118,4 (C5–H), 56,3 (C3), 50,9 (C11–H $_2$). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , ppm): δ -1718,6. ESI+ MS (methanol, m/z): 808,0 (vyp. 807,9; 10%; $\{[\text{Pt}(\text{Mal})(3\text{Iaza})_2]+\text{Na}\}^+$), 786,1

(vyp. 785,9; 5%; {[Pt(Mal)(3Iaza)₂]+H}⁺), 245,1 (vyp. 245,0; 5%; {(3Iaza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 784,1 (vyp. 783,9; 100%; {[Pt(Mal)(3Iaza)₂]-H}⁻), 540,2 (vyp. 539,9; 15%; {[Pt(Mal)(3Iaza)]-H}⁻), 243,2 (vyp. 242,9; 5%; {(3Iaza)-H}⁻). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 486w, 503w, 542w, 594m, 643m, 668m, 748s, 790m, 898w, 936m, 982m, 1000m, 1057m, 1099m, 1127m, 1161m, 1205m, 1271s, 1336s, 1372s, 1438m, 1487m, 1503m, 1593vs, 1634vs, 1729w, 2757m, 2909m, 3093s, 3584w, 3626w, 3645w.

(4): ¹H NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 13,59 (br, N1-H), 8,53 (d, 5,8, C6-H), 8,10 (s, C2-H), 7,99 (d, 7,4, C4-H), 7,14 (dd, 7,4, 5,8, C5-H), 2,08 (t, 7,4, C11-H₂), 1,40 (qui, C12-H₂), 1,20 (m, C13-C18-H₁₂), 0,87 (t, 7,4, C19-H₃). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 181,9 (C10), 148,1 (C6-H), 147,6 (C7a), 130,6 (C4-H), 128,4 (C2-H), 122,6 (C3a), 118,0 (C5-H), 89,8 (C3), 36,1 (C11-H₂), 29,6 (C13-C18-H₁₂), 26,4 (C12-H₂), 14,3 (C19-H₃). ¹⁹⁵Pt NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ -1605,6. ESI+ MS (methanol, *m/z*): 957,0 (vyp. 957,0; 100%; [Pt(Dec)(3Braza)₃]⁺ + {[Pt(Dec)₂(3Braza)₂]+Na}⁺), 932,8 (vyp. 933,2; 5%; {[Pt(Dec)₂(3Braza)₂]+H}⁺), 761,1 (vyp. 761,0; 25%; [Pt(Dec)(3Braza)₂]⁺), 197,1 (vyp. 197,0; 5%; {(3Braza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 955,1 (vyp. 955,0; 20%; {[Pt(Dec)(3Braza)₃]-2H}⁻), 931,2 (vyp. 931,2; 50%; {[Pt(Dec)₂(3Braza)₂]-H}⁻), 171,3 (vyp. 171,1; 5%; (Dec)⁻). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 472w, 509m, 567w, 596m, 647m, 721w, 752m, 791m, 861w, 997m, 1108m, 1209m, 1274vs, 1340s, 1377s, 1446m, 1492m, 1588vs, 1710w, 2851vs, 2921vs, 2955s, 3009m, 3091s, 3213m.

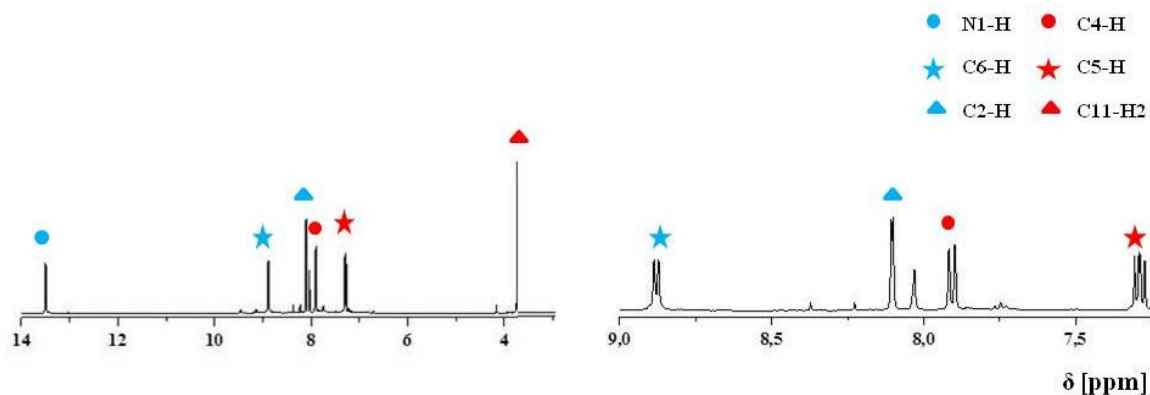
(5): ¹H NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 13,53 (br, N1-H), 8,39 (d, 6,2, C6-H), 7,96 (d, 3,5, C2-H), 7,32 (d, 6,2, C5-H), 6,65 (d, 3,5, C3-H), 2,06 (t, 7,3, C11-H₂), 1,39 (qui, 7,4, C12-H₂), 1,16 (m, C13-18-H₁₂), 0,87 (t, 7,1, C19-H₃). ¹³C NMR (DMF-*d*₇, SiMe₄, ppm): δ 181,7 (C10), 148,2 (C7a), 147,1 (C6-H), 129,9 (C2-H), 128,1 (C4-H), 124,8 (C3a), 120,8 (C5-H), 102,7 (C3), 36,9 (C11-H₂), 30,3 (C13-18-H₁₂), 32,6 (C14), 14,6 (C19-H₃). ¹⁹⁵Pt NMR (DMF-*d*₇, ppm): δ -1600,6. ESI+ MS (methanol, *m/z*): 957,1 (vyp. 957,0; 100%; [Pt(Dec)(4Braza)₃]⁺ + {[Pt(Dec)₂(4Braza)₂]+Na}⁺), 933,1 (vyp. 933,2; 20%; {[Pt(Dec)₂(4Braza)₂]+H}⁺), 761,3 (vyp. 761,0; 10%; [Pt(Dec)(4Braza)₂]⁺), 197,1 (calc. 197,0; 5%; {(4Braza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 931,4 (vyp. 931,2; 100%; {[Pt(Dec)₂(4Braza)₂]-H}⁻), 171,3 (vyp. 171,1; 100%; (Dec)⁻). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 502w, 543w, 601m, 622w, 649w, 677m, 724m, 780m, 807m, 854m, 914m, 933m, 974w, 1069m, 1108m, 1188s, 1260s, 1317s, 1341s, 1376s, 1435m, 1465m, 1482m, 1506m, 1583vs, 1609s, 1708w, 2851vs, 2921vs, 2953s, 3089m, 3268m.

(6): ^1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,56 (br, N1-H), 8,50 (d, 6,6, C6-H), 7,94 (d, 3,3, C2-H), 7,18 (d, 6,6, C5-H), 6,72 (d, 4,1, C3-H), 2,07 (t, 7,0, C11-H $_2$), 1,39 (qui, 7,4, C12-H $_2$), 1,24 (m, C13-C18-H $_{12}$), 0,86 (t, 7,4, C19-H $_3$). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 181,6 (C10), 148,8 (C7a), 147,2 (C6-H), 138,3 (C4), 129,6 (C2-H), 122,2 (C3a), 117,5 (C5-H), 100,9 (C3-H), 36,7 (C11-H $_2$), 29,6 (C13-C18-H $_{12}$), 26,8 (C12-H $_{12}$), 14,3 (C19-H $_3$). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , ppm): δ -1585,2. ESI+ MS (methanol, m/z): 865,3 (vyp. 865,3; 10%; {[Pt(Dec) $_2$ (4Claza) $_2$]+Na} $^+$), 823,4 (vyp. 823,1; 100%; [Pt(Dec)(4Claza) $_3$] $^+$), 671,4 (vyp. 671,1; 10%; [Pt(Dec)(4Claza) $_2$] $^+$), 153,1 (vyp. 153,0; 5%; {(4Claza)+H} $^+$). ESI- MS (methanol, m/z): 841,5 (vyp. 841,3; 100%; {[Pt(Dec) $_2$ (4Claza) $_2$]-H} $^-$), 171,3 (vyp. 171,1; 60%; (Dec) $^-$). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 439w, 510w, 551w, 606m, 677w, 726m, 781m, 810m, 860m, 883w, 920m, 952m, 985w, 1071m, 1108m, 1170m, 1198s, 1223m, 1261s, 1320s, 1343s, 1376s, 1437m, 1465m, 1487m, 1506m, 1586vs, 1710m, 2852vs, 2921vs, 2953s, 3092m, 3270m.

(7): ^1H NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 13,59 (s, N1-H), 8,50 (d, 5,3, C6-H), 8,09 (s, C2-H), 7,82 (m, C4-H), 7,12 (dd, 7,9, 5,7, C5-H), 2,08 (t, 7,1, C11-H $_2$), 1,40 (qui, 7,4, C12-H $_2$), 1,18 (m, C13-C18-H $_{12}$), 0,86 (t, 7,1, C19-H $_3$). ^{13}C NMR (DMF- d_7 , SiMe $_4$, ppm): δ 181,2 (C10), 148,2 (C7a), 147,7 (C6-H), 133,2 (C2-H), 132,4 (C4-H), 125,0 (C3a), 116,5 (C5-H), 55,6 (C3), 36,0 (C11-H $_2$), 31,8 (C13-C18-H $_{12}$), 26,3 (C12-H $_{12}$), 14,1 (C19-H $_3$). ^{15}N NMR (DMF- d_7 , ppm): δ 154,6 (N7), 146,3 (N1-H). ^{195}Pt NMR (DMF- d_7 , ppm): δ -1600,6. ESI+ MS (methanol, m/z): 1098,0 (vyp. 1098,0; 5%; [Pt(Dec)(3Iaza) $_3$] $^+$), 1048,3 (vyp. 1048,1; 40%; {[Pt(Dec) $_2$ (3Iaza) $_2$]+Na} $^+$), 1025,8 (vyp. 1026,2; 20%; {[Pt(Dec) $_2$ (3Iaza) $_2$]+H} $^+$), 854,3 (vyp. 854,0; 100%; [Pt(Dec)(3Iaza) $_2$] $^+$), 245,2 (vyp. 245,0; 5%; {(3Iaza)+H} $^+$). ESI- MS (methanol, m/z): 1024,2 (vyp. 1024,1; 100%; {[Pt(Dec) $_2$ (3Iaza) $_2$]-H} $^-$), 171,3 (vyp. 171,1; 20%; (Dec) $^-$). IR ($\nu_{\text{ATR}}/\text{cm}^{-1}$): 473w, 499m, 568m, 591m, 646m, 676w, 695w, 724w, 752m, 793m, 868w, 980s, 1111m, 1204m, 1225m, 1272s, 1333s, 1371s, 1440m, 1462m, 1504m, 1589vs, 1607s, 1706m, 2851s, 2920vs, 2953s, 3092m, 3252m, 3745w, 3796w.

^1H , ^{13}C a ^{195}Pt NMR detekovala všetky atómy H, C a Pt zapojené do štruktúry komplexov (1)–(7), čím bolo ich zloženie jednoznačne preukázané (vid'. Tabuľka 3, Tabuľka 4). Detekcia atómov N1-H príslušných *naza* ligandov vo vodíkovom spektre indikuje, že *naza* ligandy sú na platínu koordinované prostredníctvom dusíka N7. Koordináciu cez atóm N7 jednoznačne potvrdili výrazne odlišné ^{15}N NMR koordinačné posuny ($\Delta\delta$), vypočítané ako rozdiel medzi koordinačným posunom komplexu (δ_{komplex}) a koordinačným

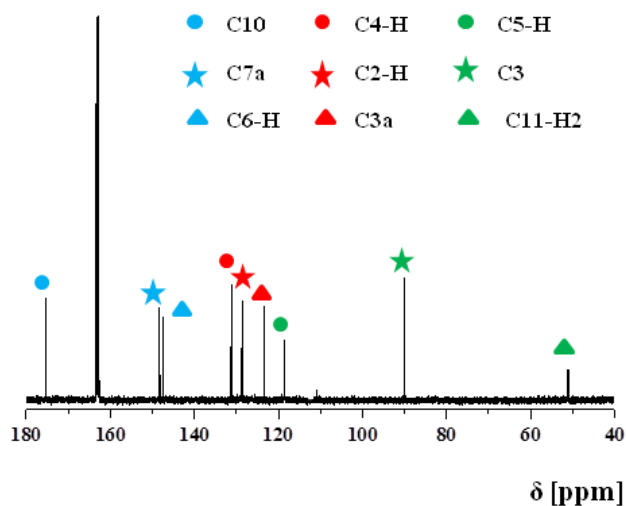
posunom ligandu (δ_{ligand}) pre reprezentatívne komplexy, a to konkrétne **(2)** ($\Delta\delta(\text{N1}) = -3,0$ ppm; $\Delta\delta(\text{N7}) = -118,2$ ppm) a **(7)** ($\Delta\delta(\text{N1}) = -2,0$ ppm; $\Delta\delta(\text{N7}) = -120,4$ ppm).



Obrázok 23 ^1H NMR spektrum komplexu **(3)**

Výsledky získané ^1H a ^{13}C NMR pre malonáto komplexy navzájom dobre korelujú. Rovnako dobrú súvzťažnosť vykazujú aj chemické posuny signálov pre izotopy ^1H a ^{13}C dekanoáto komplexov. Namerané hodnoty boli taktiež porovnané s údajmi pre dichloro a oxaláto komplexy zahrňujúce 7-azaindol, ktorých štruktúra, ako uvádzajú práce [98,100], bola jednoznačne určená RTG štruktúrnou analýzou. Zistila sa korelácia medzi malonáto a oxaláto komplexmi obsahujúcimi bidentátne *O*-donorové ligandy a medzi dekanoáto a dichloro komplexami s monodentátnymi odstupujúcimi ligandami.

Výsledky ^1H NMR sa medzi **(1)–(3)** a **(4)–(7)** komplexmi odlišovali, a to najmä koordinačné posuny signálov pre atómy N1–H, C5–H a C6–H. U malonáto komplexov sú tieto signály posunuté k slabším poliam o 1,29–1,33 ppm (N1–H), 0,09–0,14 ppm (C5–H) a 0,56–0,57 ppm (C6–H) rovnako,



Obrázok 24 ^{13}C NMR spektrum komplexu **(1)**

ako je tomu u štruktúrne podobných oxaláto komplexov. V prípade dekanoáto komplexov boli signály pre rovnaké atómy posunuté k slabším poliam o 1,41–1,49 ppm (N1–H) a 0,19–0,28 ppm (C6–H) a k silnejším poliam o 0,02–0,08 ppm (C5–H).

Pre ilustráciu sú pridané ^1H NMR (viď. Obrázok 23) a ^{13}C NMR (viď. Obrázok 24) spektrá komplexov (3) a (1).

Tabuľka 3 ^1H NMR koordinačné posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$ [ppm])

	^1H NMR					
	N1H	C2H	C3H	C4H	C5H	C6H
(1)	1,29	0,32	-	0,19	0,09	0,56
(2)	1,32	0,30	-	0,17	0,09	0,57
(3)	1,33	0,29	0,17	-	0,14	0,57
(4)	1,42	0,32	-	0,11	-0,07	0,19
(5)	1,41	0,28	-	0,08	-0,08	0,19
(6)	1,49	0,26	0,14	-	-0,02	0,28
(7)	1,44	0,26	0,14	-	-0,03	0,26

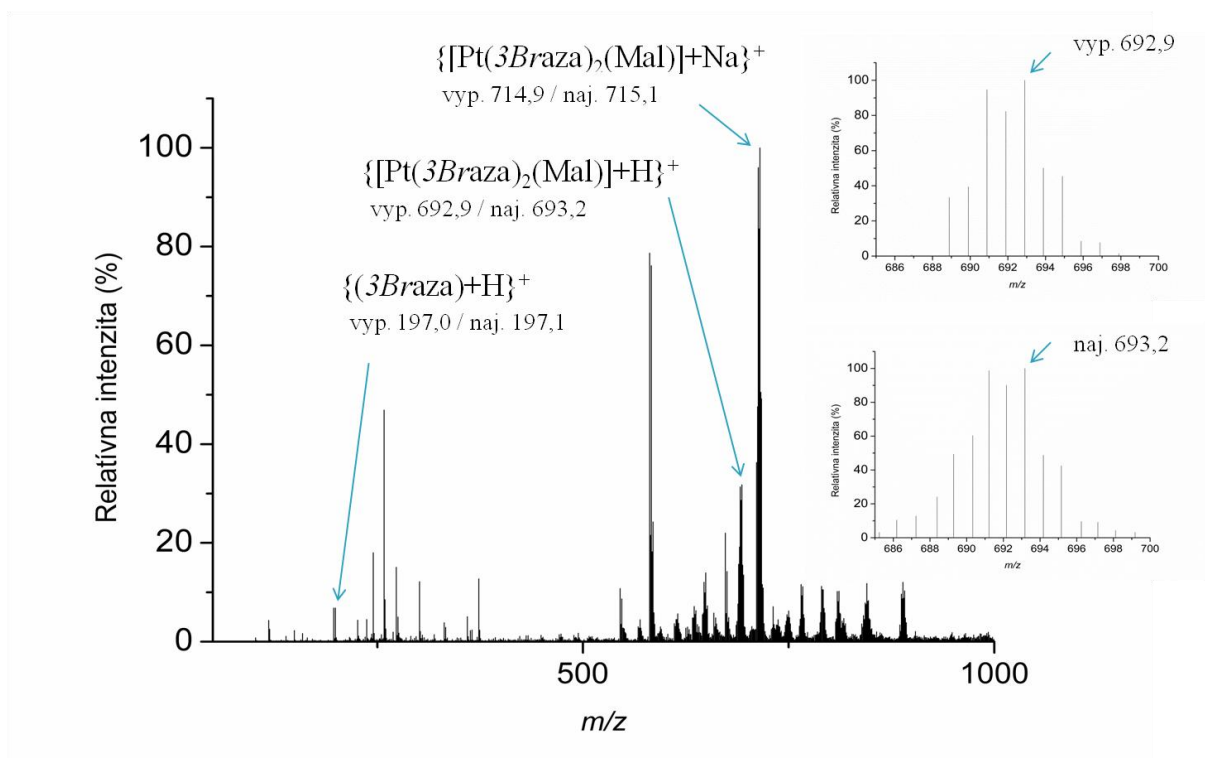
Tabuľka 4 ^{13}C NMR koordinačné posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$ [ppm])

	^{13}C NMR						
	C2	C3	C3a	C4	C5	C6	C7a
(1)	2,7	2,3	4,0	4,7	2,0	3,3	0,4
(2)	2,4	2,4	3,7	4,0	1,6	3,7	-0,5
(3)	2,7	3,1	4,8	4,0	2,5	3,8	-0,9
(4)	2,5	2,1	3,3	4,0	1,5	3,8	-0,3
(5)	2,2	1,7	2,5	4,1	-0,3	3,5	-0,5
(6)	2,2	2,6	3,0	3,8	1,8	3,7	-0,9
(7)	2,5	2,8	3,3	4,2	2,0	3,7	-0,8

Hmotnostné spektrá malonáto komplexov obsahujú molekulárne píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})] + \text{H}\}^+$, rovnako ako píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})] + \text{Na}\}^+$ aduktu s iónom sodíka detekované v ESI+ a píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})] - \text{H}\}^-$ častice detekované v ESI-.

Hmotnostné spektrá dekanoáto komplexov obsahujú molekulárne píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2] + \text{H}\}^+$. I tu boli zistené píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2] + \text{Na}\}^+$ aduktu s iónom

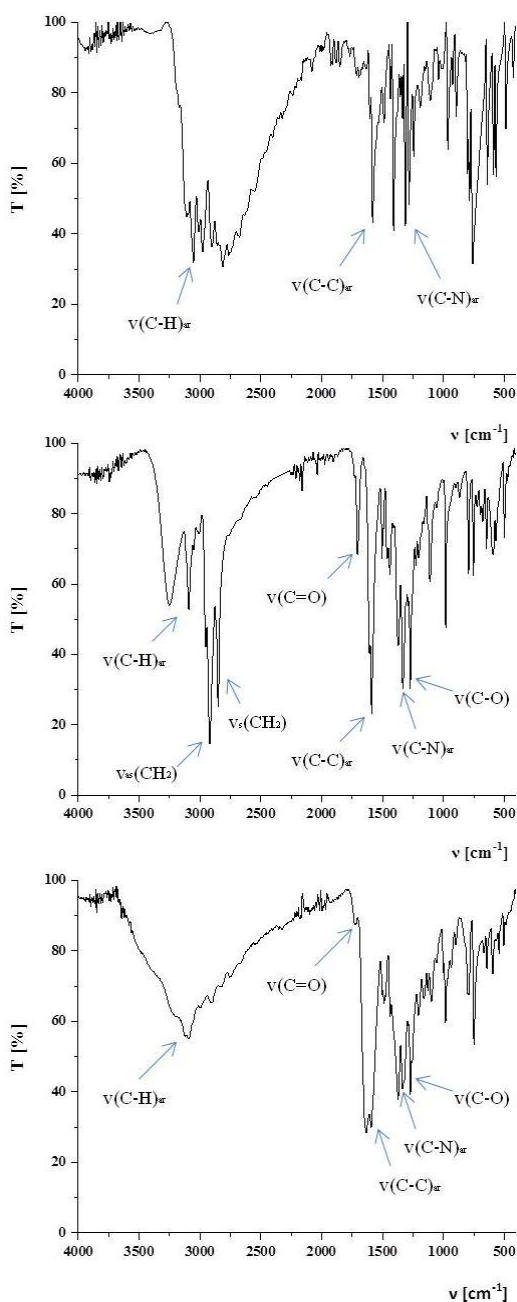
sodíka detekované v ESI+ a píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2] - \text{H}\}^-$ častice detekované v ESI-. Výsledky priamo potvrdzujú zloženie skúmaných látok. Okrem vyššie uvedených píkov vznikajú taktiež píky $\{[\text{Pt}(\text{naza})_3(\text{Dec})]\}^+$ a $\{[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})]\}^+$ častíc, a to v dôsledku straty dakanoáto ligandu alebo jeho nahradením *naza* ligandom v pozitívnom ionizačnom móde. Ako vzor sa vybralo hmotnostné spektrum komplexu (**1**) namerané v ESI+ s vyznačenými píkmí protonizovaného fragmentu, protonizovaného komplexu a aduktu komplexu so sodíkovým iónom (z ľava). Vypočítaný molekulárny pík je zobrazený vpravo hore a molekulárny pík zistený experimentálne vpravo dole (vid'. Obrázok 25).



Obrázok 25 Hmotnostné spektrum (ESI+) komplexu (**1**)

Na infračervených spektrách malonáto a dekanóato komplexov môžeme vidieť charakteristické vibrácie ako 7-azaindolevej časti, tak aj samotného karboxylátu. Dôkazom prítomnosti substituovaného 7-azaindolu sú charakteristické vibrácie väzieb $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{ar}}$ z intervalu $1506\text{--}1487\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{ar}}$ z intervalu $3104\text{--}3089\text{ cm}^{-1}$ a charakteristické vibrácie väzby $\nu(\text{C}-\text{N})_{\text{ar}}$ z oblasti vlnočtov $1343\text{--}1333\text{ cm}^{-1}$ s ďalším absorpčným pásom pri $1276\text{--}1261\text{ cm}^{-1}$ [106].

Dôkazom karboxylátov sú charakteristické vibrácie väzieb $\nu(\text{C}=\text{O})$ a $\nu(\text{C}-\text{O})$ nájdené v rozsahu vlnočtov $1729\text{--}1706\text{ cm}^{-1}$ resp. $1276\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$.



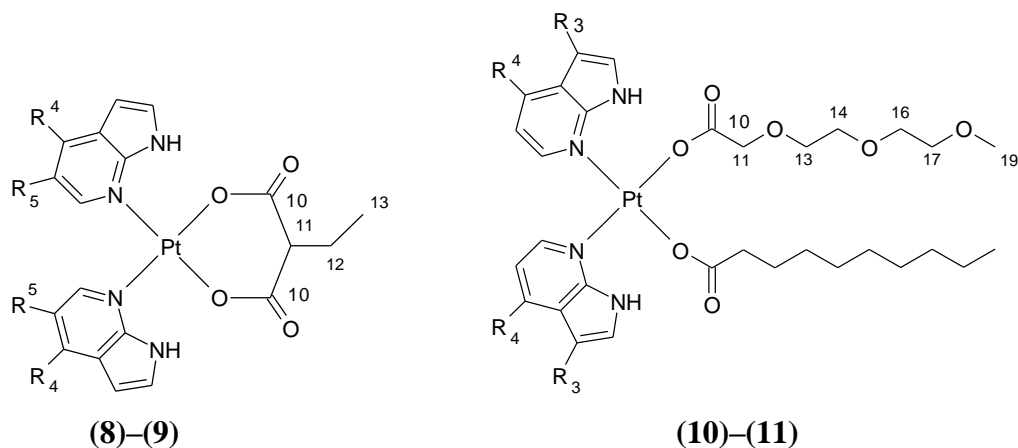
Obrázok 26 Infračervené spektrá *3Iaza* a komplexov (7) a (3)

Pre dlhé alifatické reťazce dekanóátov boli detekované pásy CH₂ a CH₃ skupín. Symetrické valenčné vibrácie CH₂ skupiny sa pohybujú v intervale $2852\text{--}2851\text{ cm}^{-1}$, zatiaľ čo jej antisymetrické valenčné vibrácie sú charakterizované pásom pri hodnote vlnočtu 2921 cm^{-1} pre všetky dekanóáto komplexu. Väzba CH₃ vykazuje antisymetrické valenčné vibrácie komplexu (4) pri 2955 cm^{-1} a komplexov (5)–(7) pri 2953 cm^{-1} . Asymetrické deformačné vibrácie CH₂ a CH₃ skupín sa pohybujú v intervale $1465\text{--}1446\text{ cm}^{-1}$ a kolísavé (rocking) deformačné vibrácie CH₂ skupiny v rozsahu $726\text{--}721\text{ cm}^{-1}$. Na obrázku 26 sú zobrazené spektrá komplexov, ktorých nosným ligandom je *3Iaza*. Pre porovnanie je doplnené i spektrum samotného ligandu.

Vyššie uvedené výsledky experimentálnych meraní nás oprávňujú predpokladať, že sa podarilo pripraviť komplexu požadovanej štruktúry (viď. Obrázok 22).

4.2 Ethylmalonáto a 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexy

Komplexy **(8)**–**(11)** (vid'. Obrázok 27) boli charakterizované prostredníctvom ^1H NMR spektroskopie a hmotnostnej spektrometrie s ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom (ESI+) a negatívnom ionizačnom móde (ESI-).



Obrázok 27 Pripravené ethylmalonáto **(8)**–**(9)** a 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto **(10)**–**(11)** komplexy

(8): ^1H NMR (methanol- d_4 , SiMe_4 , ppm): δ 8,29 (m, C6–H), 7,68 (m, C2–H), 7,33 (m, C5–H), 6,66 (m, C3–H), 4,02 (m, C11–H), 2,17 (m, C12–H₂), 1,06 (m, C13–H₃). ESI+ MS (methanol, m/z): 720,9 (vyp. 720,9; 80%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(4\text{Braza})_2]+\text{H}\}^+$), 197,0 (vyp. 197,0; 5%; $\{(4\text{Braza})+\text{H}\}^+$). ESI– MS (methanol, m/z): 719,0 (vyp. 718,9; 100%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(4\text{Braza})_2]-\text{H}\}^-$), 521,2 (vyp. 520,9; 30%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(4\text{Braza})]-\text{H}\}^-$).

(9): ^1H NMR (methanol- d_4 , SiMe_4 , ppm): δ 8,82 (m, C6–H), 8,26 (m, C2–H), 7,64 (m, C5–H), 6,63 (m, C3–H), 4,02 (m, C11–H), 2,17 (m, C12–H₂), 1,07 (m, C13–H₃). ESI+ MS (methanol, m/z): 720,9 (vyp. 720,9; 30%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(5\text{Braza})_2]+\text{H}\}^+$), 742,8 (vyp. 742,9; 20%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(5\text{Braza})_2]+\text{Na}\}^+$), 197,0 (vyp. 197,0; 5%; $\{(5\text{Braza})+\text{H}\}^+$). ESI– MS (methanol, m/z): 718,9 (vyp. 718,9; 100%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(5\text{Braza})_2]-\text{H}\}^-$), 521,2 (vyp. 520,9; 25%; $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(5\text{Braza})]-\text{H}\}^-$).

(10): ^1H NMR (chloroform- d , SiMe_4 , ppm): δ 13,12 (s, N1–H), 7,84 (d, 7,6, C6–H), 7,82 (d, 6,2, C2–H), 7,63 (d, 2,1, C4–H), 6,82 (dd, 7,9, 5,8, C5–H), 4,06 (s, C11–H₂), 3,65

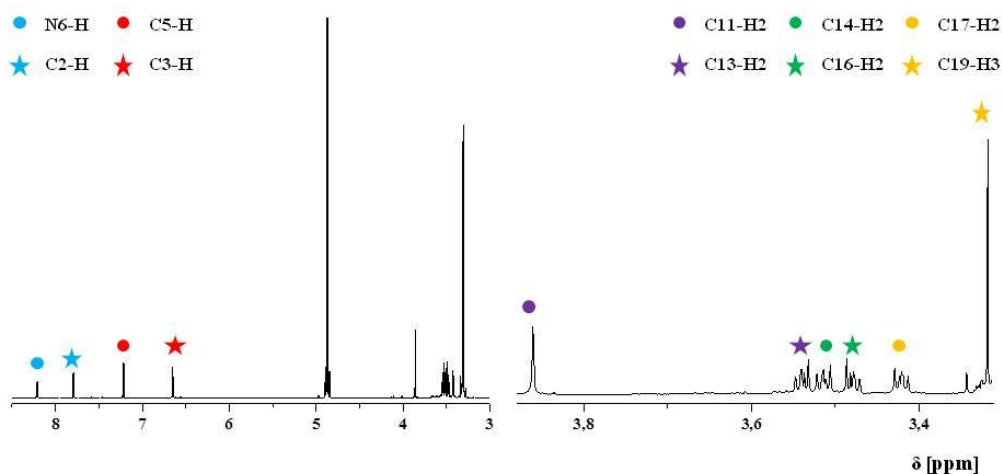
(m, C13-C16-H₆), 3,55 (dd, 6,2, 3,4, C17-H₂), 3,37 (s, C19-H₃). ESI+ MS (methanol, *m/z*): 966,8 (vyp. 967,0; 100%; {[Pt(MEE)₂(3Braza)₂]+Na}⁺), 788,9 (vyp. 789,0; 30%; {[Pt(MEE)(3Braza)₂]-H+Na}⁺), 767,0 (vyp. 767,0; 25%; [Pt(MEE)(3Braza)₂]⁺), 197,0 (vyp. 197,0; 5%; {(3Braza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 943,1 (vyp. 943,0; 100%; {[Pt(MEE)₂(3Braza)₂]-H}⁻), 177,3 (vyp. 177,1; 5%; (MEE)⁻).

(**11**): ¹H NMR (methanol-*d*₄, SiMe₄, ppm): δ 8,21 (d, 6,2, C6-H), 7,79 (d, 3,4, C2-H), 7,22 (d, 6,2, C5-H), 6,65 (d, 3,4, C3-H), 3,86 (s, C11-H₂), 3,54 (m, C13-H₂), 3,51 (m, C14-H₂), 3,48 (m, C16-H₂), 3,42 (dd, 6,2, 3,4, C17-H₂), 3,32 (s, C19-H₃). ESI+ MS (methanol, *m/z*): 966,8 (vyp. 967,0; 80%; {[Pt(MEE)₂(4Braza)₂]+Na}⁺), 944,7 (vyp. 945,0; 10%; {[Pt(MEE)₂(4Braza)₂]+H}⁺), 788,8 (vyp. 789,0; 5%; {[Pt(MEE)(4Braza)₂]-H+Na}⁺), 767,0 (vyp. 767,0; 100%; [Pt(MEE)(4Braza)₂]⁺), 197,0 (vyp. 197,0; 5%; {(4Braza)+H}⁺). ESI- MS (methanol, *m/z*): 943,2 (vyp. 943,0; 100%; {[Pt(MEE)₂(4Braza)₂]-H}⁻), 177,3 (vyp. 177,1; 5%; (MEE)⁻).

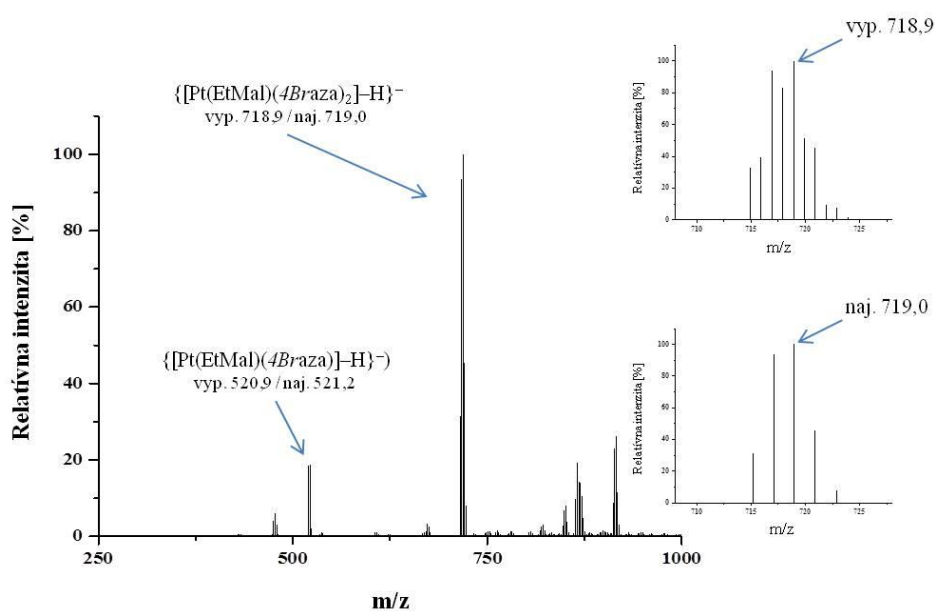
Signály atómov vodíka substituovaných derivátov 7-azaindolu boli pre ethylmalonátoplastnaté komplexy v ¹H NMR spektrách detekovaná ako multiplety pri hodnotách chemického posunu v intervale 8,29–6,66 ppm pre (**8**) a 8,82–6,63 ppm pre (**9**). Chemický posun *O*-donorového ligandu sa pre komplex (**8**) pohyboval v rozmedzí 4,02–1,06 ppm a pre komplex (**9**) pri hodnotách 4,02–1,07 ppm. ¹H NMR spektrá 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetátoplastnatých komplexov obsahovali chemické posuny signálov atómov vodíka *naza* ligandov v rozmedzí 13,12–6,82 ppm pre (**10**) pri detekcii piatich signálov a 8,21–6,65 ppm pre (**11**) pri detekcii štyroch signálov, z dôvodu použitia odlišných rozpúšťadiel pri prevádzaní merania (rýchla výmena N1-H vodíka v prostredí methanolu spôsobí stratu signálu vo vodíkovom spektre). Chemický posun signálov atómov vodíka MEE ligandov bol pre komplex (**10**) zaznamenaný pri 4,06–3,37 ppm a pre komplex (**11**) v rozmedzí intervalu 3,86–3,32 ppm (viď. Obrázok 28).

V hmotnostných spektrách ethylmalonáto a 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto komplexov sú detekované molekulové píky {[Pt(EtMal)(*naza*)₂]+H}⁺ a {[Pt(MEE)₂(*naza*)₂]+H}⁺ merané v pozitívnom ionizačnom móde a píky častíc {[Pt(EtMal)(*naza*)₂]-H}⁻ a {[Pt(MEE)₂(*naza*)₂]-H}⁻ detekované v negatívnom ionizačnom móde, čím bolo preukázané predpokladané zloženie pripravených látok.

Hmotnostné spektrá komplexov (9) - (11) obsahovali taktiež adukty s iónom sodíka detekované v ESI+, a to $\{[\text{Pt}(\text{EtMal})(5\text{Brza})_2]+\text{Na}\}^+$ pre komplex (9) a $\{[\text{Pt}(\text{MEE})_2(\text{naza})_2]+\text{Na}\}^+$ pre (10) a (11). Pre komplexy (10) a (11) bol v ESI+ detekovaný i pík odpovedajúci častici $[\text{Pt}(\text{MEE})(\text{naza})_2]^+$ z dôvodu straty jedného 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto ligandu.



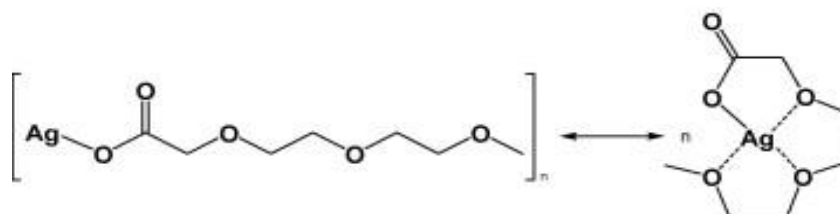
Obrázok 28 ^1H NMR spektrum komplexu (11)



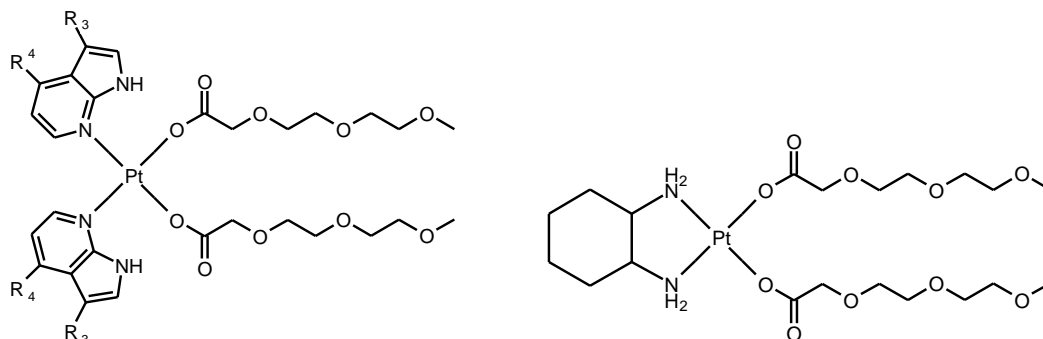
Obrázok 29 Hmotnostné spektrum komplexu (8)

Pri príprave ethylmatonáto komplexov bola použitá podobná syntetická stratégia, ako v prípade komplexov s dianiónom malonátu. S využitím striebornej soli kyseliny ethylmalonovej boli pripravené ethylmalonáty so *4Braza* (pre **(8)**) a *5Braza* (pre **(9)**), ako *N*-donorovými ligandmi.

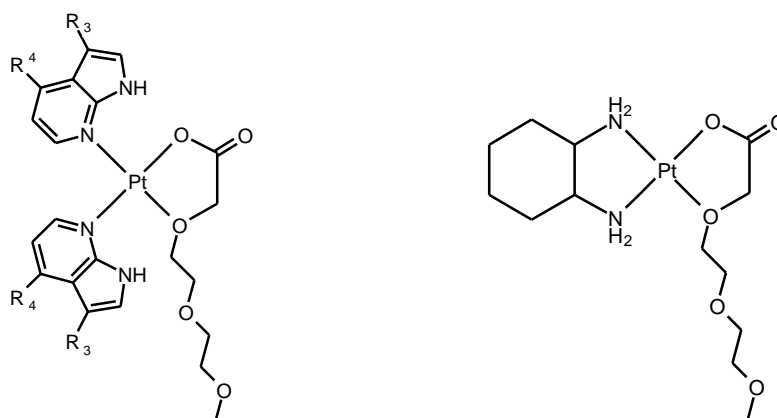
Postup prípravy striebornej soli kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej [104] bol upravený a overený elementárnou analýzou ($C_7H_{13}O_5Ag$: vypočítané: C, 29,50; H, 4,59 %; nájdené: C, 29,23; H, 4,50 %.). Ako uvádza publikácia [104], strieborná soľ kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej mení svoju štruktúru v závislosti na skupenstve, v ktorom sa nachádza. V pevnom skupenstve je alifatická, s jednou väzbou atómu kyslíka na atóm striebra. Avšak keď je v roztoku, chelátovo sa viaže štyrmi atómami kyslíka na striebro (vid'. Obrázok 30). Preto je diskutabilné, či vystupuje v komplexoch s platinou ako monodentátny alebo bidentátny ligand. Namiesto predpokladaného zloženia *cis*-[Pt(*naza*)₂(MEE)₂] a [Pt(DACH)(MEE)₂] (vid'. Obrázok 31) môžu vznikať komplexy typu [Pt(*naza*)₂(MEE)] a [Pt(DACH)(MEE)] (vid'. Obrázok 32). Výsledky elementárnej analýzy troch pripravených komplexov však naznačujú na monodentátnu koordináciu diskutovaného ligandu.



Obrázok 30 Štruktúra striebornej soli kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej v pevnom skupenstve (vľavo) a v roztoku (vpravo) (prevzaté z [104])



Obrázok 31 Predpokladané zloženie 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetátoplastnatých komplexov



Obrázok 32 Možné zloženie 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetátplatnatých komplexov

4.3 *In vitro* cytotoxicita

Malonáto a dekanóto komplexy **(1)–(7)** sa porobili testom *in vitro* cytotoxicity na ľudských bunkových líniách karcinómu vaječníkov citlivých (A2780) a rezistentných (A2780R) na cisplatinu, na normálnych bunkových líniách ľudských fibroblastov (MRC5), ako aj na primárnych kultúrach ľudských hepatocytoch (Hep) (vid'. Tabuľka 5).

Tabuľka 5 Hodnoty IC_{50} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$] komplexov **(1)–(7)**

	A2780	A2780R	MRC5	Hep
(1)	>50,0 ¹	27,3±8,9	>50,0 ¹	32,8
(2)	24,4±1,2	22,8±2,0	21,9±3,1	nt
(3)	26,6±8,9	28,9±6,7	>50,0 ¹	>250,0 ¹
(4)	14,5±0,6 ²	14,5±3,8	>25,0 ¹	>250,0 ¹
(5)	14,1±4,0 ²	19,5±2,1	26,2±4,8	nt
(6)	>50,0 ¹	24,6±1,2	>50,0 ¹	105,1
(7)	13,0±1,1 ²	13,6±4,9	>25,0 ¹	nt
cisplatina	26,3±3,6	>50,0 ^a	>50,0 ¹	>250,0 ¹

¹- IC_{50} nedosiahlo danú koncentráciu

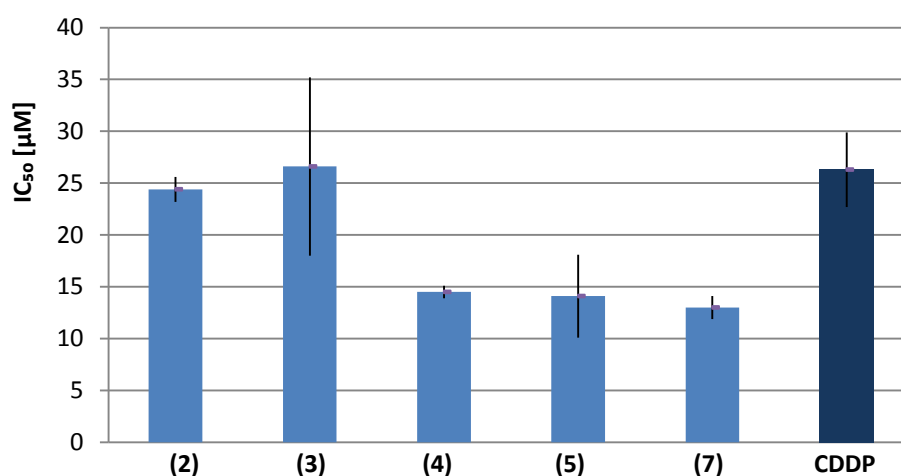
²- štatisticky významne odlišné hodnoty ($p < 0,05$)

nt - netestované

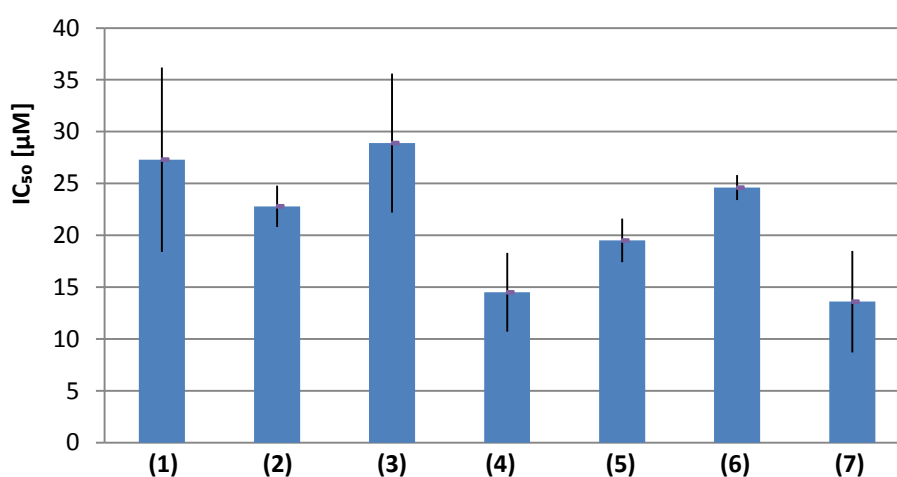
Zistilo sa, že komplexy **(2)** a **(3)** preukázali na nádorových bunkových líniách A2780 cytotoxicitu mierne lepšiu alebo zrovnateľnú s cisplatinou a komplexy **(4)**, **(5)** a **(7)** dokonca cytotoxicitu výrazne lepšiu (vid'. Graf 1). Na rozdiel od cisplatinu, všetky testované komplexy ukázali schopnosť obísť bunkovú rezistenciu línie A2780R s hodnotami $IC_{50} = 13,6–28,9 \mu\text{M}$ (vid'. Graf 2) a s rezistenčnými faktormi 0,9 **(2)**, 1,1 **(3)**, 1,0 **(4)**, 1,5 **(5)** a 1,1 **(7)**

definovanými, ako podiel IC_{50} rezistentnej bunkovej línie k IC_{50} citlivej bunkovej línie. Pokiaľ ide o neželanú cytotoxicitu na normálne bunkové línie ľudských fibroblastov, komplexy (1), (3), (4), (6) a (7) sa ukázali, v testovanom koncentračnom rozsahu, ako neaktívne. Navyše komplexy (3) a (4) nevykazujú cytotoxicitu ani voči ľudským hepatocytom, a to až do koncentrácie 250 μM .

Uvedené výsledky testov *in vitro* cytotoxicity nás oprávňujú konštatovať, že komplexy (3) a (4) prejavili vysokú selektivitu voči nádorovým bunkám a sú preto vhodné pre nadchádzajúce hlbšie biologické štúdie.



Graf 1 *In vitro* cytotoxicita na nádorové bunkové línie A2780



Graf 2 *In vitro* cytotoxicita na nádorové bunkové línie A2780R

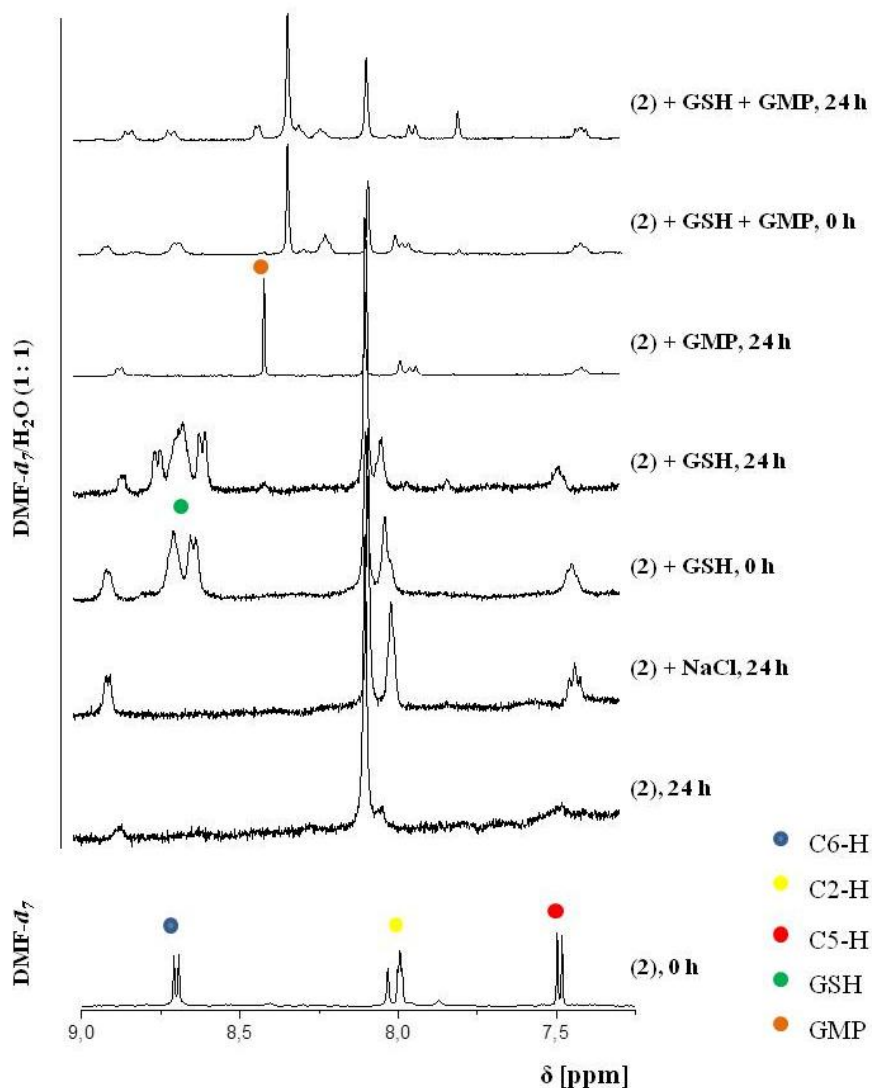
4.4 Štúdium hydrolýzy a interakcií s biomolekulami

V rámci pochopenia mechanizmu účinku nasyntetizovaných karboxylátoplastných komplexov bola snaha previesť štúdium ich hydrolýzy a interakcie s vybranými biomolekulami (GSH a GMP) prostredníctvom ^1H NMR experimentov. Žiaľ, nízka rozpustnosť dekanóato komplexov v zmesi organického rozpúšťadla (DMF alebo methanol) a vody, potrebnej na rozpustenie ako komplexov, tak i samotných biomolekúl, nám ich štúdium neumožnila. To je dôvod, prečo je ďalej diskutovaná iba séria malonáto komplexov, konkrétne komplex **(2)**, ktorý bol vybraný ako modelový pre štúdium hydrolýzy a interakcie s GSH a GMP (viď. Obrázok 33).

V rámci *experimentu A* vykazuje čerstvo pripravený roztok komplexu **(2)** v DMF- d_7 (0 h) po pridaní vody posun signálov. Príkladom je zmena hodnoty chemického posunu protónov u N1–H z pôvodných 13,42 ppm na 13,20 ppm a u C6–H z 8,70 ppm na 8,83 ppm. Po 24 h státia vzorky pri 25 °C boli signály protónov detekované pri rovnakých chemických posunoch. *Experiment B* pozostával z pridania vodného roztoku NaCl k roztoku komplexu **(2)** rozpusteného v DMF- d_7 . Konečná koncentrácia NaCl bola 104 mM, čo odpovedá koncentrácií chloridov v extracelulárnom priestore. Opäť bola prevedená ^1H NMR spektroskopia v čase 0 h a po 24 h státia vzorky pri 25 °C. Na vodíkových spektrách sa neobjavili zmeny ani nové signály ($\delta(\text{N1–H}) = 13,23$ ppm; $\delta(\text{C6–H}) = 8,85$ ppm). Oba diskutované experimenty indikujú, že komplex **(2)** nevymieňa odstupujúcu skupinu, malonátový dianión, ani za molekuly vody a ani za chloridové anióny, ktoré by mohli byť následne hydrolyzované za vzniku analogického aktivovaného diaqua komplexu. Vznik aktívnej častice už v krvnej plazme, by mohol znemožniť jej akumuláciu v bunke a dosiahnuť cieľovú DNA. Taktiež by to mohlo viesť k zvýšeniu nežiaducich účinkov.

Experiment C zastrešoval biomolekulu GSH, ktorá hrá veľmi dôležitú úlohu pri mechanizme účinku komplexov platiny. Po pridaní GSH ku komplexu **(2)** a následnom prevedení ^1H NMR spektroskopie v čase 0 h, boli detekované pôvodné signály, a to ako komplexu **(2)** tak aj GSH. Chemický posun pre C6–H komplexu **(2)** bol nájdený pri $\delta = 8,84$ ppm. U GSH boli detekované dva signály s hodnotami $\delta = 8,64$ a $\delta = 8,54$ ppm. Po 24 h státia vzorky pri 25 °C bolo zaznamenaných niekoľko nových signálov, a to napríklad pri hodnotách $\delta = 8,73$ ppm N–H v glycín/cysteín oblasti GSH alebo $\delta = 8,37$ ppm priraditeľný k C6–H 4Braza komplexu **(2)**. Integrovaný pomer intenzít signálov pôvodného komplexu ($\delta(\text{C6–H}) = 8,84$ ppm) ku komplexu po interakcii s GSH ($\delta(\text{C6–H}) = 8,37$ ppm) je 1:0,6.

To ukazuje na kovalentnú interakciu GSH s komplexom (2) a vytvorenie nového komplexu s predpokladaným zložením $cis\text{-[Pt(4Braza)}_2(\text{Mal}')(\text{GSH})]$, kde Mal' predstavuje monodentátne koordinovaný dianiónový malonát. Voľný malonáto ligand nebol v ^1H NMR spektre pozorovaný.



Obrázok 33 Štúdium hydrolyzy a interakcie komplexu (2) s biomolekulami použitím ^1H NMR spektroskopie

V mechanizme účinku protinádorových liečiv na báze cisplatiny je dôležitý atak liečiva na N7 guanínu jadrovej molekuly DNA. V tejto práci sa pri *experimente D* použilo GMP, avšak nepreukázali sa žiadne interakcie študovaného komplexu (2) s uvedenou

biomolekulou. Dôvodom je pravdepodobne nižšia afinita GMP ku kovovému centru študovaného komplexu v porovnaní s vyššie uvádzaným GSH.

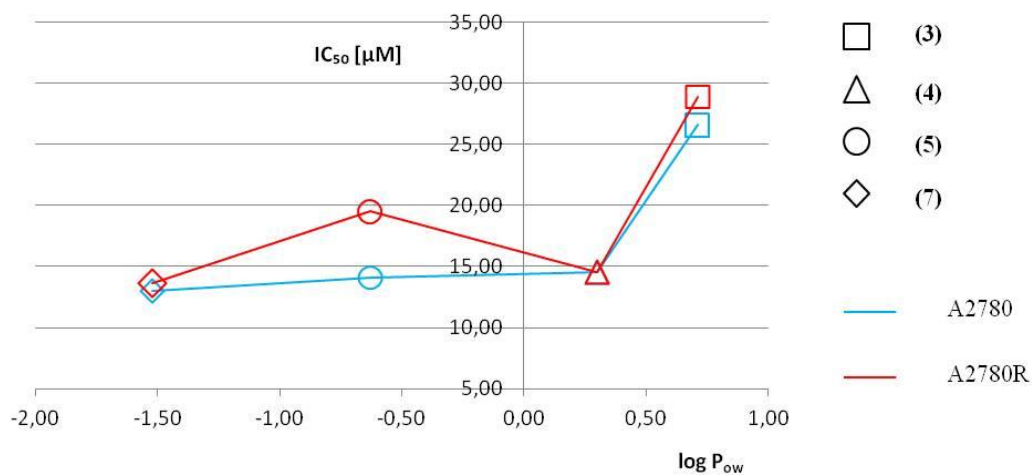
Dôkazom spomínaného predpokladu mal byť *experiment E*, pri ktorom sa ku komplexu (2) rozpustenému v DMF- d_7 pridali dva molárne ekvivalenty GSH a GMP. Ukázalo sa, že komplex (2) pravdepodobne interaguje iba s GSH, pretože boli detekované signály s rovnakými hodnotami chemického posunu, ako v prípade vyššie diskutovaného experimentu so samotným GSH v čase 24 h, doplnené o signály samotného GMP. Jediný rozdiel bol v dynamika interakcie. Zatiaľ čo pri experimente (2)/GSH došlo k naviazaniu po 24 h, s prídavkom GMP sa väzba vytvorila už v čase 0 h (cca 5 minút po príprave vzorky) a pôvodný signál $\delta(\text{C6-H}) = 8,84$ ppm detekovaný po 24 h takmer úplne vymizol.

4.5 Štúdium lipofility komplexov

Lipofilita, dôležitý faktor pre pochopenie farmakokinetiky a bunkovej akumulácie nových komplexných zlúčenín [107], bola stanovená meraním rozdeľovacích koeficientov n-oktanol–voda vyššie popísaným postupom. Postup však javí nedostatky a je nutná jeho optimalizácia, prípadne potvrdenie dosiahnutých výsledkov inou technikou (HPLC). Podporným faktorom tohto tvrdenia je výrazná odchýlka stanovenej hodnoty lipofility CDDP ($\log P_{ow} = -1,52$) od hodnoty udávanej v literatúre ($\log P_{ow} = -2,53$) [108]. Napriek zjavnej nepresnosti merania bola snaha o vyhodnotenie výsledkov a zrovnanie korelácie medzi lipofilitou a cytotoxicitou pripravených komplexov (1) a (3)–(7).

U komplexov (1), (3)–(6) bola zistená signifikantne vyššia hodnota $\log P_{ow}$ ako hodnota stanovená u cisplatiny, a to -0,68 pre (1), -0,71 pre (3), 0,30 pre (4), -0,63 pre (5) a 0,88 pre (6). Z uvedených hodnôt vyplýva, že medzi lipofilné látky môžeme zaradiť komplexy (3), (4) a (6). Očakávané zvýšenie lipofility u série dekanoátoplastnatých komplexov sa nepotvrdilo, keďže komplex (7) má hodnotu $\log P_{ow}$ totožnú s hodnotou nájdenou pre CDDP ($\log P_{ow} = -1,52$). Veľmi zaujímavé je i zhodnotenie z pohľadu korelácie lipofility pripravených látok s výsledkami *in vitro* cytotoxicity. Z dôvodu veľmi uspokojivej biologickej aktivity na ľudské nádorové bunkové línie A2780 a A2780R boli na porovnanie zvolené komplexy (3)–(5) a (7) (viď. Graf 3). Nepotvrdilo sa prepojenie lipofility s vyššou akumuláciou liečiva v nádorových bunkách, keďže najvyššiu cytotoxickú aktivitu na obe ľudské nádorové bunkové línie vykazuje komplex (7), ktorého hodnota rozdeľovacieho

koeficientu n-oktanol - voda radí k látkam hydrofilným. Naopak látka, ktorú hodnota $\log P_{ow}$ radí medzi lipofilné látky, vykazuje najnižšiu biologickú aktivitu pri oboch testovaných bunkových líniiach. Avšak je nutné opäť zdôrazniť nepresnosť použitej metódy stanovenia $\log P_{ow}$ a získané výsledky považovať iba za orientačné.



Graf 3 Závislosť *in vitro* cytotoxicity (3)–(5), (7) na lipofilite ($\log P$)

5 ZÁVER

Cieľom tejto práce bola príprava a štúdium karboxylátoplastných komplexov s potenciálne protinádorovým účinkom, ktoré obsahovali substituované deriváty 7-azaindolu (*N*-donorové ligandy) a vybrané *O*-donorové karboxyláto ligandy koordinované na centrálny atóm. Pripravili sa štyri typy komplexov (malonáto, dekanoáto, ethylmalonáto, 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetáto) obecného zloženia $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Mal})]$ ((**1**)–(**3**)), *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{Dec})_2]$ ((**4**)–(**7**)), $\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{EtMal})]$ ((**8**), (**9**)) a *cis*- $[\text{Pt}(\text{naza})_2(\text{MEE})_2]$ ((**10**), (**11**)), u ktorých bola prevedená charakterizácia vhodnými fyzikálno-chemickými metódami (elementárna analýza, NMR spektroskopia, hmotnostná spektrometria, infračervená spektroskopia). Tieto metódy podali dôkaz o zložení a chemickej čistote nasyntetizovaných platnatých karboxyláto komplexov.

V ďalšom kroku tejto práce sa malonáto a dekanoáto komplexy (**1**)–(**7**) podrobili testom *in vitro* cytotoxicity na ľudských bunkových líniiach karcinómu vaječníkov citlivých a rezistentných na cisplatinu, na normálnych bunkových líniiach ľudských fibroblastov, ako aj na primárnych kulturách ľudských hepatocytov. Všetky testované komplexy dokázali prekonať získanú rezistenciu bunkovej línie karcinómu vaječníkov A2780R na cisplatinové liečivo v testovanom koncentračnom rozsahu. Komplexy (**4**) ($\text{IC}_{50} = 14,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$), (**5**) ($\text{IC}_{50} = 14,1 \pm 4,0 \mu\text{M}$) a (**7**) ($\text{IC}_{50} = 13,0 \mu\text{M}$) prejavili v porovnaní s cisplatinou signifikantne vyššiu cytotoxicitu na bunkovú líniu A2780. Farmakologicky najzaujímavejšími sa javia komplexy (**3**) (A2780: $\text{IC}_{50} = 26,6 \pm 8,9 \mu\text{M}$; A2780R: $28,9 \pm 6,7 \mu\text{M}$) a (**4**) (A2780: $14,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$; A2780R: $14,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$). Najdôležitejším zistením je, že ide o vysokoselektívne látky, ktoré nie sú v testovanom koncentračnom rozsahu biologicky aktívne voči MRC5 ((**3**) $50,0 \mu\text{M}$; (**4**) $25,0 \mu\text{M}$) a Hep ((**3**) a (**4**) $250,0 \mu\text{M}$).

Bola tiež snaha vykonať štúdium hydrolyzy a interakcie s biomolekulami GSH a GMP prostredníctvom ^1H NMR experimentov. U dekanoáto komplexov sa však vyskytol problém, ktorý bol spojený s ich nízkou rozpustnosťou v zmesi organické rozpúšťadlo / voda (1 : 1; v / v). Ako modelová látka zo série malonáto komplexov bol vybraný komplex (**2**). Merania naznačujú, že nedochádza k výmene odstupujúcej skupiny, ani za molekuly vody a ani za chloridové anióny. Ide o pozitívne zistenie, pretože vznik aktivovaného diaqua komplexu už v krvnej plazme, by mohol viesť k vychytaniu komplexu skôr ako dosiahne cieľ. Avšak komplex prejavil afinitu ku GSH a interakcia s molekulou GMP, ktorá v experimente

predstavovala modelový systém pre miesto atakované platnými liečivami na cieľovej molekule DNA, nebola zaznamenaná.

Ak vezmeme do úvahy získané biologické údaje, máme dôvod sa domnievať, že sa podarilo pripraviť dve látky ($[\text{Pt}(3I\text{aza})_2(\text{Mal})]$ a *cis*- $[\text{Pt}(3B\text{raza})_2(\text{Dec})_2]$) zo série malonáto a dekanoátoplatných komplexov, ktoré vysoká selektivita voči nádorovým bunkám stavia do pozície kandidátov vhodných pre nadchádzajúce hlbšie biologické štúdie. Biologické štúdium *in vitro* cytotoxicity voči vybraným ľudským nádorovým bunkovým líniam bude u ďalších pripravených komplexov **(8)**–**(11)** prevedené v nasledujúcich týždňoch.

6 SKRÁTKY

<i>3Braza</i>	3-brom-7-azaindol
<i>3Claza</i>	3-chlor-7-azaindol
<i>3Iaza</i>	3-jod-7-azaindol
<i>4Braza</i>	4-brom-7-azaindol
<i>4Claza</i>	4-chlor-7-azaindol
<i>5Braza</i>	5-brom-7-azaindol
A2780	ľudské bunkové línie karcinómu vaječníkov citlivé na cisplatinu
A2780R	ľudské bunkové línie karcinómu vaječníkov rezistentné na cisplatinu
Ag ₂ EtMal	strieborná soľ kyseliny ethylmalonovej
Ag ₂ Mal	strieborná soľ kyseliny malonovej
AgDec	strieborná soľ kyseliny dekanovej
AgMEE	strieborná soľ kyseliny 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octovej
CR	complete response
DACH	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-(-)-1,2-diaminocyklohexan
Dec	dekanoát
DLT	dose limiting toxicity
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DSBs	double-strand breaks
Et ₂ O	diethylether
EtMal	ethylmalonát
EtOH	ethanol
H ₂ EtMal	kyselina ethylmalonová
H ₂ Mal	kyselina malonová
Hep	hepatocyty
HMEE	kyselina 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]octová
HMG	High mobility group
Mal	malonát
MEE	2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetát
MeOH	methanol
MMR	Mismatch repair
MRC5	bunkové línie ľudských fibroblastov
MT	metalothioneiny
MTD	maximum tolerated dose
NaDec	sodná soľ kyseliny dekanovej
<i>naza</i>	<i>3Braza</i> , <i>4Braza</i> , <i>5Braza</i> , <i>3Claza</i> , <i>4Claza</i> alebo <i>3Iaza</i>
OR	overall response
PR	partial response

7 LITERATÚRA

- [1] Stewart B.W., Wild C.P. *World Cancer Report 2014*; International Agency for Research on Cancer 2014. ISBN: 978-92-832-0432-9
- [2] Leško J., Tržil J., Štarha R. *Anorganická chemie*; Vysoká škola báňská – Technická univerzita, Ostrava, 2000. ISBN: 80-7078-692-2
- [3] Kaim W., Schwederski B., Klein A. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*; John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-0-470-97523-7
- [4] Housecroft C., Sharpe A. G. *Anorganická chemie*; VŠCHT Praha, 2014. ISBN: 978-80-7080-872-6
- [5] Cotton F.A., Wilkinson G. *Anorganická chemie*; Academia Praha, 1973.
- [6] Šima J., Koman M., Segľa P., Tatarko M., Valigura D. *Anorganická chémia*; STU Bratislava, 2011. ISBN: 978-80-227-4068-5
- [7] Lukeš I. *Systematická anorganická chemie*; Karolinum Praha, 2009. ISBN: 978-80-246-1614-8
- [8] Gažo J., Kohout J., Serator M., Šramko T., Zigmund M. *Všeobecná anorganická chémia*; Alfa Bratislava, 1974.
- [9] Barry N.P.E., Sadler P.J. *Exploration of the medical periodic table: towards new targets*; ChemComm 49 (2013) 5106-5126.
- [10] Abu-Surrah A. S., Al-Sa'DonI H. H., Abdalla M. Y. *Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity*; Cancer Therapy 6 (2008) 1-10.
- [11] Bertini J., Gray H. B., Lippard S. J., Valentine J. S.: *Bioinorganic Chemistry*; University Science Books Sausalito California, 1994. ISBN: 0-935702-57-1
- [12] Gielen M., Tiekink E. R. T. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*; John Wiley & Sons, 2005. ISBN: 0-470-86403-6
- [13] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cisplatin-2D.png> (dostupné Nov 08, 2014).
- [14] Marques M.P.M. *Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor*; ISRN Spectroscopy (2013).
- [15] Kelland L. *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*; Nature Reviews Cancer 7 (2007) 573-584.

- [16] Escribano E., Font-Bardia M., Calvet T., Lorenzo J., Gamez P., Moreno V. *DNA binding studies of a series of cis-[Pt(Am)2X2] complexes (Am = inert amine, X = labile carboxylato ligand)*; *Inorganica Chimica Acta* 394 (2013) 65-76.
- [17] Wheate N.J., Walker S., Craig G.E., Oun R. *The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials*; *Dalton Trans.* 39 (2010) 8113-8127.
- [18] Roat-Malone R.M. *Bioinorganic chemistry*; John Wiley & Sons, 2007. ISBN: 978-0-471-76113-6
- [19] Kelland L.R., Farrell N.P. *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy. Humana*; Totowa, 2000. ISBN: 978-1-59259-012-4
- [20] Florea A., Büsselberg D. *Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects*; *Cancers* 3 (2011) 1351-1371.
- [21] Ferriss J.S., Kim Y., Duska L., Birrer M., Levine D.A., Moskaluk C., Theodorescu D., Lee J.K. *Multi-Gene Expression Predictors of Single Drug Responses to Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Carcinoma: Predicting Platinum Resistance*; *PLoS ONE* (2012).
- [22] Muscella A., Vetrugno C., Fanizzi F., Manca C., De Pascali S., Marsigliante S. *A new platinum(II) compound anticancer drug candidate with selective cytotoxicity for breast cancer cells*; *Cell Death and Disease* 4 (2013) 1-10.
- [23] Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; *Helvetica Chimica Acta* Zurich, 1999. ISBN: 9783906390208
- [24] Boulikas T., Vougiouka M. *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review)*; *Oncology Reports* 10 (2003) 1663-1682.
- [25] Palm M.E., Weise C.F., Lundin C., Wingsle G., Nygren Y., Björna E., Naredi P., Wolf-Warts M., Wittung-Stafshede P. *Cisplatin binds human copper chaperone Atox1 and promotes unfolding in vitro*; *PNAS* 108 (2011) 6951-6956.
- [26] Jamieson E.R., Lippard S. J. *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*; *Chem. Rev.* 99 (1999) 2467-2498.
- [27] Bruhn S.L., Toney J.H., and Lippard S.J. *Biological processing of DNA modified by platinum compounds. Progress in Inorganic Chemistry*; *Bioinorganic chemistry* 38 (1990) 477-518.
- [28] Tanida S., Mizoshita T., Ozeki K., Tsukamoto H., Kamiya T., Kataoka H., Sakamuro D., Joh T. *Mechanisms of cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment*; *International Journal of Surgical Oncology* (2012).

- [29] Arnesano F., Natile G. *Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA*; Coordination Chemistry Reviews 253 (2009) 2070-2081.
- [30] Siede W., Kow Y.W., Doetsch P.W. *DNA Damage Recognition*; Taylor & Francis Group, 2005. ISBN: 978-0-8247-5961-2
- [31] Boulikas T., Pantos A., Bellis E., Christofis P. *Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms*; Cancer Therapy 5 (2007) 537-583.
- [32] Basu A., Krishnamurthy S. *Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage*; Journal of Nucleic Acids (2010).
- [33] Gallego M.P. *New fluorescent platinum (II) complexes containing anthracene derivatives as a carrier ligand: synthesis, characterization and in vitro studies*; Doctoral thesis, Leiden University, 2009.
- [34] Wozniak K., Blasiak J. *Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts*; Acta Biochimica Polonica 3 (2002) 583-596.
- [35] Rajeswari M.R., Jain A. *High-mobility-group chromosomal proteins, HMGAI as potential tumour markers*; Current science 82 (2002) 838-844.
- [36] Sharma A., Ramanjaneyulu A., Ray R., Rajeswari M.R. *Involvement of High Mobility Group B Proteins in Cisplatin-Induced Cytotoxicity in Squamous Cell Carcinoma of Skin*; DNA and Cell Biology 7 (2009) 311-318.
- [37] Alessio E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*; John Wiley & Sons, 2011. ISBN: 978-3-527-32631-0
- [38] Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J. M. *Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity*; Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 7 (2007) 3-18.
- [39] Reeves R., Adair J.E. *Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair*; DNA Repair 4 (2005) 926-938.
- [40] Himes S.R., Reeves R., Attema J., Nissen M., Li Y., Shannon M.F. *The Role of High-Mobility Group I(Y) Proteins in Expression of IL-2 and T Cell Proliferation*; The Journal of Immunology 164 (2000) 3157-3168.
- [41] Massaad-Massade L., Tacine R., Dulauroy S., Reeves R, Barouki R. *The functional interaction between HMGAI and the estrogen receptor requires either the N- or the C-terminal domain of the receptor*; FEBS Letters 559 (2004) 89-95.

- [42] Bonetti A., Leone R., Muggia F.M., Howell S.B. *Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Clinical Applications*; Humana Press, 2009. ISBN: 978-1-6032-7458-6.
- [43] Travers A. *Recognition of distorted DNA structures by HMG domains*; Current Opinion in Structural Biology 10 (2000) 102-109.
- [44] Gómez-Ruiz S., Maksimović-Ivanić D., Mijatović S., N. Kaluderović G.N. *On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metalloenes in Anticancer Chemotherapy*; Bioinorganic Chemistry and Applications 2012.
- [45] Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*; Am J Med. 107 (1999) 489-506.
- [46] Gonzalez V.M., Fuertes M.A., Alonso C., and Perez J.M., *Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?*; Mol Pharmacol. 59 (2000) 657-663.
- [47] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*; Espero Publishing Praha, 2005. ISBN: 80-902906-2-0
- [48] Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., and James Darnell J. *Molecular Cell Biology*; W. H. Freeman and Company, 2003. ISBN: 978-0-7167-4366-8
- [49] Meyers M., Hwang A., Wagner M.W., Boothman D.A., *Role of DNA mismatch repair in apoptotic response to therapeutic agents*; Environ Mol Mutagen. 44 (2004) 249-264.
- [50] Jones N.A., Turner J., McIlwrath A.J., Brown R., and Dive, C., *Cisplatin- and Paclitaxel-Induced Apoptosis of Ovarian Carcinoma Cells and the Relationship between Bax and Bak Up-Regulation and the Functional Status of p53*; Mol Pharmacol. 53 (1998) 819-826.
- [51] Henkels K.M., Turchi J.J., *Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell line*; Cancer Research 59 (1999) 3077-3083.
- [52] Fard S.S., Thyselius M., All-Ericsson C., Hallböök F. *The terminal basal mitosis of chicken retinal Lim1 horizontal cells is not sensitive to cisplatin-induced cell cycle arrest*; Cell Cycle 13 (2014) 3698-3706.
- [53] Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Pérez J.M. *Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic*; Current Medicinal Chemistry 22 (2015) 257-266.

- [54] Germain C.S., Niknejad N., Ma L., Garbuio K., Hai T., Dimitroulakos J. *Cisplatin Induces Cytotoxicity through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Activator Transcription Factor*; *Neoplasia* 12 (2010) 527-538.
- [55] Campbell N.A., Reece J.B. *Biologie*; Computer Press Brno, 2006. ISBN: 80-251-1178-4
- [56] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular biology of the cell*; 5th edition. Taylor & Francis, 2007. ISBN: 978-0-8153-4106-2
- [57] Murray R. K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. *Harperova biochemie*; H & H Bratislava, 1998. ISBN: 80-85787-38-5
- [58] Jung Y., Lippard S. J. *Direct cellular response to platinum-induced DNA damage*; *Chemical Reviews* 107 (2007) 1387-1407.
- [59] Rabik C.A., Dolan M.E. *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*; *Cancer Treatment Reviews* 33 (2007) 9– 23.
- [60] Spreckelmeyer S., Orvig C., Casini A., *Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallo-drugs: An Overview beyond Cisplatin*; *Molecules* 19 (2014) 15584-15610.
- [61] Jing-chun H., Da-lian D., Dong-zhen Y., Hai-yan J., Shan-kai Y., Salvi R. *Modulation of copper transporters in protection against cisplatin-induced cochlear hair cell damage*; *Journal of Otology* 6 (2011) 51-59.
- [62] Stewart D.J. *Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin*; *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 63 (2007) 12–31.
- [63] Newton, C.; *Clinical resistance to platinum chemotherapy in ovarian cancer*: Doctoral thesis; University College London, 2009.
- [64] Blair B.G., Larson C.A., Safaei R., Howell S.H. *Copper Transporter 2 Regulates the Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin*; *Clin Cancer Res* 15 (2009) 4312-4321.
- [65] Galluzzi L., Vitale I., Michels J., Brenner C., Szabadkai G., Harel-Bellan A., Castedo M., Kroemer G. *Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future*; *Cell Death and Disease* 5 (2014).
- [66] Shen D., Pouliot L.M., Hall M.D., Gottesman M.M. *Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes*; *Pharmacol* 64 (2012) 706-721.
- [67] Klein A.V., Hambley T.W. *Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors*; *Chem. Rev.* 109 (2009) 4911–4920.
- [68] Siddik S.H. *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*; *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.

- [69] Tapia G., Diaz-Padilla I. *Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer*; InTech (2013).
- [70] Brozovic A., Ambriović-Ristov A., Osmak M. *The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin*; Critical Reviews in Toxicology (2010).
- [71] Kartalou M., Essigmann J.M. *Mechanisms of resistance to cisplatin*; Mutation Research 478 (2001) 23-43.
- [72] Rosypal S. *Úvod do molekulární biologie III.*; Masarykova univerzita Brno, 2002. ISBN: 80-902562-2-8
- [73] Hofmanová J. *Genotoxicita a karcinogeneze*; Masarykova univerzita Brno, 2013. ISBN: 9788024621098
- [74] Enoiu M., Jiricny J., Schärer O.D. *Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis*; Nucleic Acids Research (2012) 1-12.
- [75] Butler J.S. Sadler P. J. *Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes*; Current Opinion in Chemical Biology 17 (2013) 175-188.
- [76] Abu-Surrah A.S., Kettunen M. *Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin*; Current Medicinal Chemistry 13 (2006) 1337-1357.
- [77] Yung, Y. *Cellular responses against DNA damaged by platinum anticancer drugs*: Doctoral thesis; Massachusetts Institute of Technology, 2005.
- [78] Ali I., Wani W.A., Saleem K., Haque A. *Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy*; Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 13 (2013) 296-306.
- [79] Rixe O., Ortuzar W., Alvarez M., Parker R., Reed E., Paull K., Fojo T. *Oxaliplatin, Tetraplatin, Cisplatin, and Carboplatin: Spectrum of Activity in Drug-Resistant Cell Lines and in the Cell Lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen Panel*; Biochemical Pharmacology 52 (1996) 1855-1865.
- [80] Di Pasqua A.J., Goodisman J., Dabrowiak J.C. *Understanding how the platinum anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell*; Inorganica Chimica Acta 389 (2012) 29-35.
- [81] Crichton R.R. *Biological inorganic chemistry. An introduction*; Elsevier B.V., 2008. ISBN: 978-0-444-52740-0
- [82] Alian O. M., Azmi A.S., Mohammad R.M. *Network insights on oxaliplatin anti-cancer mechanisms*; Clinical and Translational Medicine (2012).

- [83] Alcindor T., Beauger N. *Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy*; *Current Oncology* 1 (2011) 18-25.
- [84] Daniel G. Haller, M.D. *Safety of Oxaliplatin in the Treatment of Colorectal Cancer*; Review Article (2000).
- [85] Shimada M., Itamochi H., Kigawa J. *Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy*; *Cancer Management and Research* 5 (2013) 67–76.
- [86] Choi C.H., Cha Y.J., An C.S., Kim K.J., Kim K.C., Moon S.P., Lee Z.H., Min Y.D. *Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: less involvement of metallothionein*; *Cancer Cell International* 4 (2004).
- [87] McKeage M.J. *Lobaplatin: a new antitumour platinum drug*; *Expert Opin Investig Drugs* 10 (2001) 119-28.
- [88] Kudelka A.P., Siddik Z.H., Tresukosol D., Edwards C.L., Freedman R.S., Madden T.L., Rastogi R., Hord M., Kim E.E., Tornos C., Mante R., Kavanagh J.J. *A phase II and pharmacokinetic study of enloplatin in patients with platinum refractory advanced ovarian carcinoma*; *Anticancer Drugs* 8 (1997) 649-656.
- [89] Aamdal S., Brunsch U., Kerger J., Verweij J., ten Bokkel Huinink W., Wanders J., Rastogi R., Franklin H.R., Kaye S.B. *Zeniplatin in advanced malignant melanoma and renal cancer: phase II studies with unexpected nephrotoxicity*; *Cancer Chemother Pharmacol* 40 (1997) 439-443.
- [90] Dodion P.F., de Valeriola D., Crespeigne N., Kantrowitz J.D., Piccart M., Wery F., Kerger J., Egorin M.J., Forrest A., Bachur N.R. *Phase I clinical and pharmacokinetic study of zeniplatin, a new platinum complex*; *Ann Oncol* 2 (1991) 589-596.
- [91] Drees M., Dengler W.M., Hendriks H.R., Kelland L.R., Fiebig H.H. *Cycloplatin: a novel platinum compound exhibiting a different spectrum of anti-tumour activity to cisplatin*; *European Journal of Cancer* 31 (1995) 356-361.
- [92] Lebwohl D., Canetta R. *Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update*; *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1522-1534.
- [93] Lu C., Perez-Soler R., Piperdi B., Walsh G.L., Swisher S.G., Smythe W.R., Shin H.J., Ro J.Y., Feng L., Truong M., Yalamanchili A., Lopez-Berestein G., Hong W.K., Khokhar A.R., Shin D.M. *Phase II study of a liposome-entrapped cisplatin analog (L-NDDP) administered intrapleurally and pathologic response rates in patients with malignant pleural mesothelioma*; *Journal of Clinical Oncology* 20 (2005) 3495-3501.

- [94] Ruiz J., Rodríguez V., de Haro C., Espinosa A., Pérezc J., Janiak C. *New 7-azaindole palladium and platinum complexes: crystal structures and theoretical calculations. In vitro anticancer activity of the platinum compounds*; Dalton Trans. 39 (2010) 3290-3301.
- [95] Popowycz F., Routier S., Joseph B., Mérour J. *Synthesis and reactivity of 7-azaindole (1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine)*; Tetrahedron 63 (2007) 1031–1064.
- [96] Mérour J.Y., Joseph B. *Synthesis and Reactivity of 7-Azaindoles (1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridine)*; Current Organic Chemistry 5 (2001) 471-506.
- [97] Mérour J.Y., Buron F., Plé K., Pascal Bonnet P., Routier S. *The Azaindole Framework in the Design of Kinase Inhibitors*; Molecules 19 (2014) 19935-19979.
- [98] Štarha P., Trávníček Z., Popa A., Popa I., Muchová T., Brabec V. *How to modify 7-azaindole to form cytotoxic Pt(II) complexes: Highly in vitro anticancer effective cisplatin derivatives involving halogeno-substituted 7-azaindole*; Journal of Inorganic Biochemistry 115 (2012) 57-63.
- [99] New E.J., Roche C., Madawala R., Zhang J.Z., Hambley T.W. *Fluorescent analogues of quinoline reveal amine ligand loss from cis and trans platinum(II) complexes in cancer cells*; Journal of Inorganic Biochemistry 103 (2009) 1120-1125.
- [100] Štarha, P., Marek, J., Trávníček, Z. *Cisplatin and oxaliplatin derivatives involving 7-azaindole: Structural characterisations*; Polyhedron 33 (2012) 404-409
- [101] Muchová, T., Prachařová, J., Štarha, P., Olivová, R., Vrána, O., Benešová, B., Kašpárková, J., Trávníček, Z., Brabec, V. *Insight into the toxic effects of cis-dichloridoplatinum(II) complexes containing 7-azaindole halogeno derivatives in tumor cells*; Journal of Biological Inorganic Chemistry 18 (2013) 579-589 .
- [102] Štarha, P., Hošek, J., Vančo, J., Dvořák, Z., Suchý, P., Popa, I., Pražanová, G., Trávníček, Z. *Pharmacological and molecular effects of platinum(II) complexes involving 7-azaindole derivatives*; PLoS ONE 9 (2014) e90341.
- [103] Štarha, P., Trávníček, Z., Popa, I., Dvořák, Z. *Synthesis, characterization and in vitro antitumor activity of platinum(II) oxalato complexes involving 7-azaindole derivatives as coligands*; Molecules 19 (2014) 10832-10844.
- [104] Steffan M., Jakob A., Claus P., Lang H. *Silica supported silver nanoparticles from a silver(I) carboxylate: Highly active catalyst for regioselective hydrogenation*; Catalysis Communications 10 (2009) 437-441.

- [105] Pichard-Garcia L., Gerbal-Chaloin S., Ferrini J.B., Fabre J.M., Maurel P. *Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression*; Johnson E.F., Waterman M.R. *Cytochrome P450: Methods in Enzymology*, vol. 357, Elsevier Science, Amsterdam, 2002.
- [106] Morzyk-Ociepa B., Dysz K., Turowska-Tyrk I., Michalska D. *X-ray crystal structure, vibrational spectra and DFT calculations of 3-chloro-7-azaindole: A case of dual N–H...N hydrogen bonds in dimers*; *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136 (2015) 405-415.
- [107] Varbanov H., Valiahdi S.M., Legin A.A., Jakupec M.A., Roller A., Galanski M., Keppler B.K. *Synthesis and characterization of novel bis(carboxylato)dichloridobis(ethylamine) platinum(IV) complexes with higher cytotoxicity than cisplatin*; *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 5456-5464.
- [108] Kratz F., Senter P., Steinhagen H. *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*; Wiley-VCH Verlag & Co, 2012. ISBN: 978-3-527-32823-9