

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**BIOLOGICKÁ AKTIVITA KOMPLEXNÍCH SLOUČENIN
MĚDI S N-DONOROVÝMI LIGANDY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Roman Papoušek

Studijní obor:

Ekochemie

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Alena Klanicová

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Tímto bych chtěl velice poděkovat své školitelce Mgr. Aleně Klanicové za její ochotu, pomoc a cenné rady, které byly pro vznik této práce velmi důležité. Dále bych chtěl také poděkovat vedoucímu Katedry anorganické chemie prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. za poskytnutí pracovního místa, nezbytných chemikálií pro syntézu koordinačních sloučenin a přístrojového vybavení pro jejich charakterizaci.

OBSAH

	Strana
1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Metabolismus mědi	7
2.2. Proteiny obsahující měď'	8
2.3. Biologická aktivita.....	12
2.3.1. Protinádorová aktivita	12
2.3.2. Antioxidační a protizánětlivá aktivita	52
2.3.3. Antidiabetická aktivita.....	62
2.3.4. Antimikrobiální aktivita	70
2.3.5. Protiparazitní aktivita	81
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	84
3.1. Použité chemikálie a přístroje.....	84
3.2. Příprava komplexů	84
3.3. Charakterizace komplexů	86
4. ZÁVĚR.....	89
5. SUMMARY.....	91
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	92
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	95

1. Úvod

Měď je složkou živých organismů známou od roku 1928, kdy bylo prokázáno, že je stopovým prvkem nezbytným pro život.[1] Nachází se ve všech orgánech a tkáních lidského těla v proměnlivých koncentracích (v řádu ppm). Největší množství mědi se v lidském těle nachází v játrech, mozku, srdci, žaludku, v různých částech střeva a z tělních tekutin především v krvi, žluči, méně pak v pankreatických šťávách, potu a zanedbatelné množství také v moči.[2] Jelikož si lidské tělo neumí samo měď syntetizovat, musí ji přijímat ze stravy. Tělo dospělého člověka obsahuje asi 1,4 až 2,1 mg mědi na kilogram tělesné váhy. Odtud lze odvodit, že tělo zdravého člověka o hmotnosti 60 kg obsahuje přibližně 1 g tohoto kovu.[3]

Je prokázáno, že měď je klíčovou součástí enzymů, které vykonávají několik různorodých funkcí. Od přenosu kyslíku a elektronů, přes katalýzu oxidačně-redukčních reakcí, až po ochranu buněk před poškozením volnými radikály. Mezi nejvýznamnější enzymy, které obsahují měď patří cytochrom c oxidáza, Cu/Zn superoxiddismutáza, tyrosináza, lysyl oxidáza, dopamin-monooxygenáza, peptidylglycin α -amidating monooxygenáza a dopamin B hydroxyláza.[1]

Měď je biostatická, zamezuje růstu bakterií na svém povrchu a je účinná proti legionářské nemoci (antimikrobiální účinek). Bývá také součástí zemědělských postřiků působících proti vzniku a šíření škodlivých plísní (antifungicidní efekt). Měď pomáhá v prevenci zánětů při arthritidě a podobných onemocněních (protizánětlivý efekt). Má mimo jiné také protivředový účinek, používá se při léčbě křečí a epilepsie [3] a působí protiparazitálně.[4] Výzkumy naznačují, že měď hraje důležitou roli v prevenci a ve zmírnění určitých neurodegenerativních chorob spojených s polyglutaminovým onemocněním (Fridrichova ataxie, Huntingtonova choroba), dále také s Parkinsonovou, Wilsonovou, Menkeovou a Alzheimerovou nemocí.[3] Z dalších biologických účinků, které jsou velmi významné, je třeba uvést antioxidační, antidiabetický [5] a protinádorový efekt [1] některých komplexních sloučenin mědi.

Pozornost se v dnešní době uchyluje především na komplexní sloučeniny mědi, které vykazují protinádorovou a antioxidační aktivitu, s čímž blízce souvisí také protizánětlivý a antidiabetický efekt. Jedná se o komplexní sloučeniny s vysokým potenciálem na úspěch

v boji s civilizačními chorobami a s možností jejich praktického využití v medicíně. Použití léčiv, jejichž základem by byly komplexní sloučeniny mědi, v terapeutické praxi, je limitováno prozatím nedostatečnými znalostmi o principu účinků těchto komplexů. Omezujícím a velice důležitým faktorem pro jejich využití v podobě léčiv je také neznalost, do jaké míry a jakým způsobem je narušen metabolismus mědi organismu, který byl podroben léčbě farmaky založenými na těchto komplexních sloučeninách.

I když je prozatím tato oblast chemie málo prozkoumána, má vysoký potenciál úspěšnosti do budoucna. Nejen z tohoto důvodu bych se chtěl pokusit v teoretické části této bakalářské práce na základě literární rešerše provést přehled vybraných komplexních sloučenin mědi s výše uvedenými biologickými účinky (s podrobnějším zaměřením na protinádorovou aktivitu). Tento literární přehled by mohl posloužit jako odrazový můstek pro práci zabývající se syntézou analogických biologicky aktivních koordinačních sloučenin mědi. Vzhledem k rozsahu dané problematiky jsem se omezil na koordinační sloučeniny obsahující centrální Cu(II) kation a N-, případně S-donorové ligandy. U každého prezentovaného komplexu bude uveden strukturní vzorec (vytvořený programem ChemSketch) respektive molekulová struktura (vytvořená pomocí krystalografické databáze a programu Diamond) komplexu, popřípadě ligandu. Dále bude popsán postup přípravy komplexu a také informace o biologické účinnosti konkrétního komplexu. Na základě získaných informací se pokusím o korelaci mezi strukturou zde uvedených koordinačních sloučenin a mírou jejich biologických účinků. V rámci experimentální části se pokusím o přípravu a charakterizaci potenciálně biologicky aktivních komplexních sloučenin mědi s heterogenní koordinační sférou obsahující deriváty adeninu a další dusíkatý heterocyklus.

2. Teoretická část

2.1. Metabolismus mědi

Měď je esenciálním stopovým prvkem. Dospělý člověk přijímá v potravě denně 2 až 5 mg mědi, z čehož se asi 30 % resorbuje. Příjem i výdej mědi je regulován. Regulace je důležitá, protože vyšší obsah mědi může být pro lidský organismus toxický.[6] Největší množství mědi se nachází ve svalech (40 %), v játrech (15 %), v mozku (10 %) a zbylé množství v tělních tekutinách.[7]

Mezi potraviny bohaté na měď řadíme zeleninu, ústřice, ryby a vnitřnosti. Nezanedbatelné množství se nachází také v ořeších, sušeném ovoci a čokoládě (kakao). Další část denního příjmu mědi může být pokryta konzumací vody protékající měděným vodovodním potrubím. Ovšem množství mědi v běžné smíšené stravě je pro lidský organismus dostačující.[8]

Měďnatý kation se mimořádně pevně váže na většinu chelátových center. Proto se téměř všechen obsah mědi v organismu váže na proteiny. Měďnatý ion je také součástí aktivních míst některých enzymů. Podobně jako železo, také ion mědi je místem reakce s O_2 . Jeho schopnost podlehnout reverzibilní redukci mu dovoluje zúčastnit se mnohých oxidačně-redukčních reakcí.[6] V běžných sloučeninách je měď známa ve dvou oxidačních stavech: Cu^I a Cu^{II} . V některých měďnatých komplexech tripeptidů může být oxidována na Cu^{III} (ta také může být biologicky účinnou).[9]

50 % mědi z potravy je absorbováno v žaludku a v horní části tenkého střeva. Nevyužitý zbytek kovu je vyloučen stolicí. Následně je měď transportována pomocí proteinu albuminu do jater, kde je přijímána jaterními buňkami a část exkretována do žluče (regulační mechanismus). Játra opouští vázána na protein ceruloplazmin, který je syntetizován právě v játrech.[10] Regulace hladiny mědi v těle je zprostředkována pomocí metalothioneinů, což je malá skupina proteinů nacházejících se v cytoplazmě buněk, konkrétně v buňkách jater, ledvin a střev. Tyto proteiny mají vysoký obsah cysteinu, proto na sebe mohou snadno vázat měď, zinek, kadmium a rtuť (navázání těžkých kovů je umožněno přítomností SH skupiny v molekule cysteinu). Při akutním nadbytku mědi v těle (způsobeným například zvýšeným příjmem měďnatých solí nebo kontaminované vody) nebo dalších těžkých kovů dochází ke

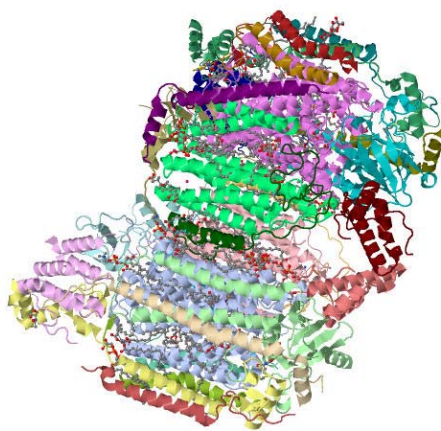
zvyšování množství metalothioneinů ve tkáních. Proto je jejich produkce řízena pomocí některých hormonů. Metalothioneiny fungují jako zásobníky netoxické formy výše uvedených kovů a jsou zahrnovány do jejich celkového metabolismu. Nadbytek mědi v organismu může být problematický, protože při zvýšené hladině tohoto kovu v těle dochází k oxidaci proteinů a lipidů vázaných na nukleové kyseliny a tím také ke zvýšené produkci volných radikálů. Proto je regulace těžkých kovů pro organismus velmi důležitá, protože s poklesem množství těžkého kovu v těle dochází také k poklesu tvorby volných radikálů.[10]

Měď je důležitou součástí enzymů (kovový kofaktor) účastnících se dýchacího řetězce, tvorby kolagenu a elastinu, krvetvorby, tvorby melaninu, odstraňování superoxidů, tvorby neurotransmiterů a neuropeptidů. Z nejvýznamějších proteinů obsahujících měď je třeba uvést cytochrom c oxidázu, lysyl oxidázu, superoxid dismutázu, albumin, ceruloplazmin, tyrosinázu a dopamin- β -hydrolázu.[7] Většina měďnatých proteinů reaguje s kyslíkem reverzibilně podobně jako hemocyanin. Také některé aminoroxidázy obsahují Cu^{II} . Enzymy obsahující více iontů mědi patří mezi hydroxylázy (např. dopamin- β -hydroxyláza, tyrosináza (polyfenoloxidáza)).[6]

2.2. Proteiny obsahující měď

Cytochrom c oxidáza (Obrázek 1)

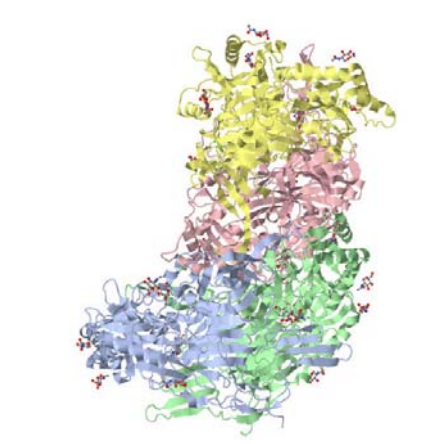
Jedná se o enzym dýchacího řetězce, který se nachází v mitochondriích buněk a slouží jako přenašeč elektronů z *cytochromu c* na kyslík. Tento hemoprotein, který je široce distribuovaný do mnoha tkání obsahuje 2 centrální atomy mědi a dále jednotky *hem a* a *hem a₃*. K redukci O_2 na vodu je zapotřebí čtyř elektronů, které poskytuje právě *cytochrom c*. První fází je redukce O_2 na O_2^{2-} (dvouelektronová výměna). Jeden atom kyslíku se naváže na atom mědi a druhý na jednotku *hem a₃*. Přísunem dalších dvou elektronů dojde k disociaci vazby O-O a následné redukci na 2 OH^- . Oxidáza může být velice snadno intoxikována oxidem uhelnatým, kyanidy nebo sulfanem.[10]



Obrázek 1. Cytochrom c oxidáza.

Lysyl oxidáza (Obrázek 2)

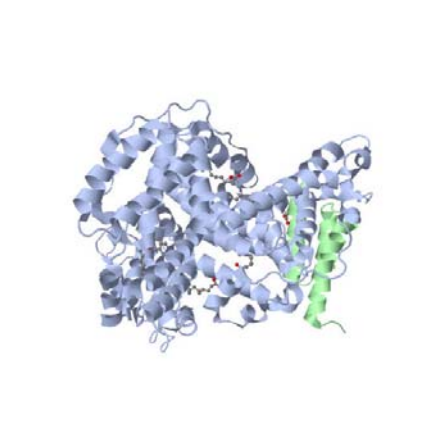
Lysyl oxidáza je proteinem nezbytným pro cross-linking (síťování) kolagenu - proteinu, který tvoří více než 25 % celkové hmotnosti proteinů v těle dospělého člověka. Kolagen je přítomen v pojivových tkáních, jakými jsou vaziva a šlachy.[10]



Obrázek 2. Lysyl oxidáza.

Albumin (Obrázek 3)

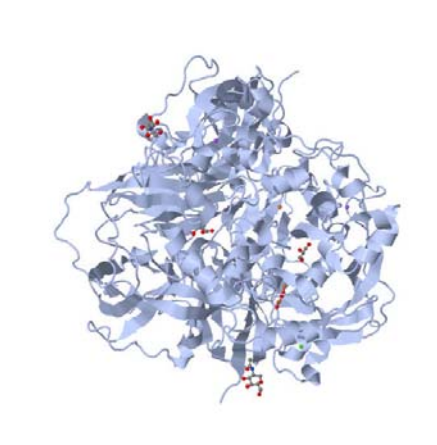
Albumin je hlavním proteinem nacházejícím se v lidské krevní plazmě (tvoří asi 60 % z veškerých krevních proteinů). 40 % albuminu je zastoupeno v krevní plazmě, dalších 60 % v mezibuněčném prostoru. Lidská játra jej denně vyprodukují asi 12 gramů. Albumin dospělého člověka se skládá z 1 polypeptidového řetězce, který je tvořen 585 aminokyselinami obsahujícími 17 disulfidických vazeb. Jeho nejdůležitější funkcí je schopnost na sebe vázat různé ligandy, což hraje důležitou roli při transportu mědi v lidském těle.[10]



Obrázek 3. Albumin.

Ceruloplazmin (Obrázek 4)

Ceruloplazmin je modrý protein, v jehož každé molekule je navázáno 6 atomů mědi.[10] Je hlavním měďnatým proteinem v krvi a váže až 4 % celkového obsahu mědi v organismu. Je schopný zabezpečit oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , což je velmi důležité, neboť jen Fe^{3+} může být zabudován do transferinu, proteinu přenášejícího železo. Proto se ceruloplazmin někdy nazývá jako ferooxidáza.[6]



Obrázek 4. Ceruloplazmin.

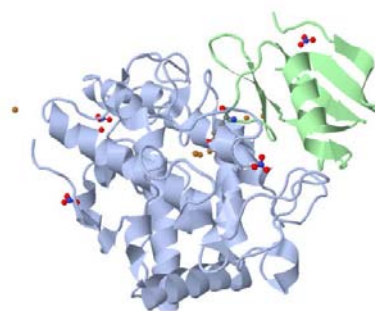
Ceruloplazmin váže atomy mědi narozdíl od albuminu velmi pevně. Albumin z tohoto důvodu ochotněji poskytuje měď tkáním, a proto také hraje důležitější roli v transportu Cu než ceruloplazmin. Nedostatek ceruloplazminu v krevní plazmě bývá způsoben nemocí jater.[10]

Dopamin- β -hydroxyláza

Tento enzym se účastní tvorby epinefrinu (adrenalinu) a norepinefrinu (noradrenalinu) z tyrosinu. Oba tyto hormony patří do skupiny katecholaminů a tvoří se v dřeni nadledvin. Epinefrin působí podobně jako sympatický nervový systém (vyvolává zrychlení srdeční činnosti, štěpení glykogenu, zvýšení krevního tlaku, atd.) Norepinefrin má výrazný vazokonstrikční účinek.[10]

Tyrosináza (Obrázek 5)

Tyrosináza je přítomna v melanocytech, které jsou iniciátory syntézy pigmentu melaninu. Toto barvivo je přítomné v tkáních jako je oční sítnice, vlasy, kůže aj. Způsobuje jejich charakteristické zbarvení a chrání je před škodlivými účinky UV-záření.[7]

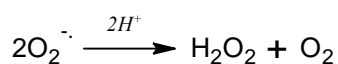


Obrázek 5. Tyrosináza.

Superoxid dismutáza (Obrázek 6)

Celkem jsou známy tři formy superoxid dismutázy. První z forem, která obsahuje měď a zinek (bývá označována jako SOD1 popřípadě Cu/Zn-SOD), se nachází v buňkách majících jádro. Součástí druhé formy SOD je ion manganu a ve třetí formě figuruje ion železa. Cu/Zn-SOD vytváří v cytoplazmě eukaryot dimery ($M_r = 31\,000$), přičemž jedna subjednotka obsahuje ion mědi, druhá ion zinku. Měď, která se váže přes tři imidazolové dusíkové atomy, podléhá oxidaci a redukci reakcí se superoxidovým radikálem.[6]

Cu/Zn-SOD je enzymem, který velice účinně katalyzuje dismutaci superoxidu na peroxid vodíku a kyslík podle následující rovnice (vzniklý peroxid vodíku je poté enzymem katalázou rozložen na vodu a kyslík):



Z krystalové struktury Cu/Zn-SOD je patrné, že imidazol zde vystupuje jako můstkový ligand mezi Cu^{2+} a Zn^{2+} ionty. Koordinační sféra centrálních atomů je doplněna o terminální histidinové ligandy.[11]



Obrázek 6. *Strukturní vzorec aktivního místa Cu/Zn-SOD (vlevo); Cu/Zn-SOD (vpravo).*

Funkcí superoxid dismutázy je tedy odstraňování superoxidového aniontu, vznikajícího při biologické redukci kyslíku. Bylo zjištěno, že průměrná délka života různých druhů savců je přímo úměrná molárnímu poměru SOD/superoxidový anion. Čím je tento poměr v buňkách vyšší, tím jsou buňky lépe před superoxidovým radikálem chráněny a savec se dožívá vyššího věku. Samotný superoxidový anion nemusí osobně poškozovat reprodukční aparát buněk, vznikají z něj však mnohem reaktivnější látky, jako jsou hydroxylový radikál, singletový kyslík, hydrogenperoxid apod. Bylo také dokázáno, že superoxid vzniká mimo jiné v buňkách zhoubných nádorů, a že všechny nádorové buňky mají sníženou specifickou aktivitu Mn-SOD a mnohé z nich také Cu/Zn-SOD. Tím se porušuje rovnováha mezi tvořícími se radikály a jejich přirozenými zachytávači. Relativně zvýšené množství volných radikálů zapříčiňuje zastavení diferenciací kmenové buňky, která se potom začíná nekontrolovatelně dělit a mění se tak na buňku nádorovou. Z toho vyplývá, že zvýšené množství superoxidového aniontu v normálních buňkách způsobuje inhibici jejich dělení a procesy stárnutí organismu, zatímco zvýšená hladina superoxidového aniontu v nádorových buňkách vede k jejich nekontrolovanému dělení, tedy nesmrtnosti.

V normálních buňkách se totiž během dělení spolu se superoxidovým aniontem zvyšuje také hladina SOD, která jej přeměňuje na peroxid vodíku. A právě až peroxid vodíku inhibuje reprodukční aparát. Čím více je buňka diferencována, tím více peroxidu produkuje a tím má nižší reprodukční kapacitu. V nádorové buňce je hladina SOD snižena, proto v ní zůstává více volného superoxidového aniontu, který tak může stimulovat její dělení a urychlovat nádorový růst.[6]

(Obrázky proteinů z této podkapitoly pocházejí z Proteinové Databanky, www.pdb.org)

2.3. Biologická aktivita

2.3.1. Protinádorová aktivita

Rakovina - onemocnění, které existuje ve více než 100 různých formách, je dnes nejčastější příčinou smrti. K její léčbě často využívaná cisplatina a další farmaka na bázi platiny patří z tohoto hlediska k nejvýznamnějšímu využití kovů v medicíně. Zásadní problém spojený s těmito antikancerotiky obsahujícími platinu spočívá v jejich silné toxicitě. Z tohoto a dalších důvodů je nezbytně nutné se zabývat vývojem nových silných a selektivních cytostatik.[12]

V poslední době dosahují velice slibného protirakovinového potenciálu komplexní sloučeniny obsahující měď. Bylo dokonce prokázáno, že *N,N'*- donorové ligandy 1,10-fenanthrolinu a 1,10-fenanthrolin-5,6-dionu jsou spolu s Cu^{2+} v karboxylátovém komplexu mnohem účinnější (*in vitro*) proti některým nádorovým buňkám, než cisplatina. Bylo zjištěno, že tyto aktivní komplexy inhibují syntézu DNA v závislosti na jejich koncentraci, a to mechanismem, který nezahrnuje interkalaci (vmezeření látky mezi obě vlákna DNA). Je tedy možné, že mohou účinkovat odlišným způsobem než cisplatina. Velice důležité je, že fenanthrolinové a fenanthrolindionové komplexy nejsou mutagenní (narozdíl od cisplatiny) a nejsou tak snadno vyháněny z buněk. Jeden z možných mechanismů účinků komplexů mědi může být spojen s napodobováním chování Cu/Zn-SOD. Bylo prokázáno, že tyto Cu(II) komplexy zmíněného typu vykazují protinádorovou aktivitu a byly navrženy do nové třídy potenciálních protinádorových látek.[12]

Na několika následujících stranách bude postupně představeno 53 vybraných jednojaderných měďnatých komplexů s N-donorovými (resp. S-donorovými) ligandy, u nichž byla potvrzena protinádorová aktivita. Jejich účinnost byla testována *in vitro*, popřípadě *in vivo* proti různým formám nádorových buněčných linií. Hodnoty vyjadřující biologickou účinnost komplexů jsou uvedeny v tabulkách. Pro možnost porovnání jsou v případě dostupnosti uvedeny také hodnoty účinnosti pro určitý standard (např. cisplatin).

KOMPLEX 1 (Schéma 1):

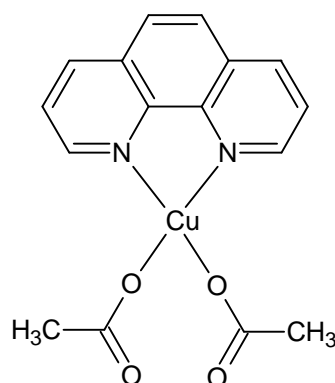


Schéma 1. Strukturální vzorec komplexu 1.

Příprava komplexu 1:

K 50 ml ethanolického roztoku 1,10-fenanthrolinu (5,6 mmol) bylo přidáno 1,25 mmol [Cu₂(CH₃COO)₄(H₂O)₂]. Vzniklý modrý roztok byl ponechán 1 hodinu pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Objem roztoku byl pomocí rotační vakuové odparky zredukován až na 5 ml. Dále bylo přidáno 20 ml acetonu a poté byl opět v rotační odparce objem směsi zredukován na 10 ml. Odfiltrovaný modrý prášek byl promyt vodou a ethanolem a vysušen na vzduchu.

KOMPLEX 2 (Schéma 2):

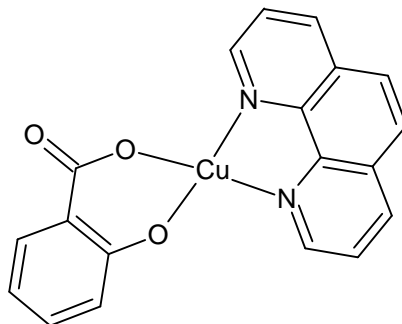


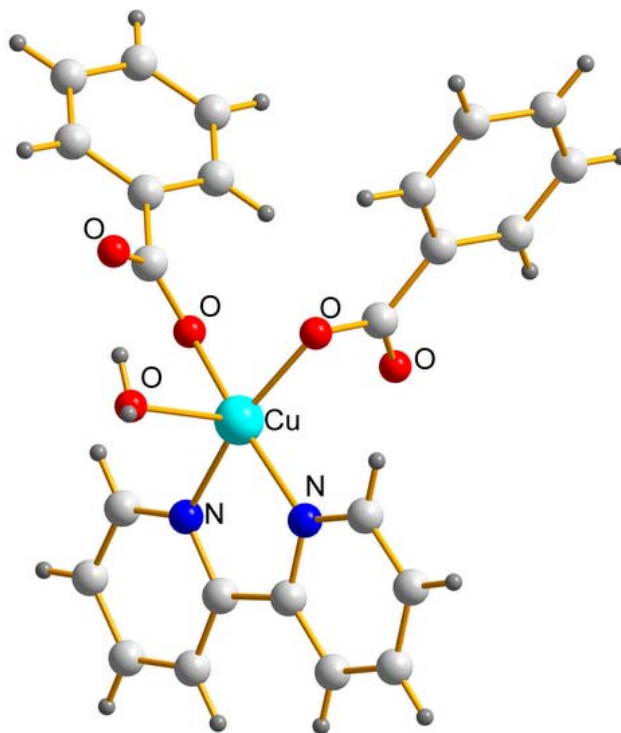
Schéma 2. Strukturální vzorec komplexu 2.

Příprava komplexu 2:

1,92 mmol $[\text{Cu}(\text{salH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a 2,37 mmol 1,10-fenanthrolinu bylo smícháno v 50 ml ethanolu a ponecháno 2 hodiny pod zpětným chladičem. Vzniklá zelená suspenze byla ochlazená na pokojovou teplotu a poté zfiltrována. Získaný zelený prášek byl promyt vodou a ethanolem a vysušen na vzduchu.

KOMPLEX 3 (Obrázek 7):

$[\text{Cu}(\text{BZA})_2(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]$



Obrázek 7. Molekulová struktura komplexu 3.

Příprava komplexu 3:

K zahřátému ethanolickému roztoku (50 ml), který byl připraven z 1,25 mmol dvojjaderného komplexu $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ a 2,5 mmol kyseliny benzoové, bylo přidáno 2,5 mmol 2,2'-bipyridinu. Vzniklá tmavěmodrá směs byla 30 minut míchána a poté nechána zchladnout. Po 48 hodinách se vytvořily krystalky vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu.

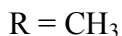
Tři výše uvedené komplexy byly úspěšně testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **Hep-G2** (hepatocelulární karcinom), **A-498** (adenokarcinom ledvin), **A-549** (rakovina

plíc). V *Tabulce 1* jsou pro tyto komplexy a pro srovnání také pro cisplatinu uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že komplexy **1** a **2** byly již při nízké koncentraci vysoce cytotoxické proti všem třem typům nádorových buněk. V porovnání s cisplatinou jsou téměř proti všem buňkám až desetinásobně účinnější. Z tohoto důvodu lze tyto sloučeniny považovat za potenciální chemoterapeutika.[13]

Tabulka 1. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 1-3.

Sloučenina	IC_{50} (μM)		
	Hep-G2	A-498	A-549
1 [Cu(CH ₃ COO) ₂ (phen)]	1,8	1,0	1,19
2 [Cu(sal)(phen)]	2,5	1,6	1,42
3 [Cu(BZA) ₂ (bpy)(H ₂ O)]	26	16	82,99
cisplatina	15	14	11

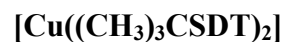
KOMPLEX 4 :



KOMPLEX 5:



KOMPLEX 6:



Obecný strukturální vzorec komplexů **4-6** je zobrazen ve *Schématu 4*.

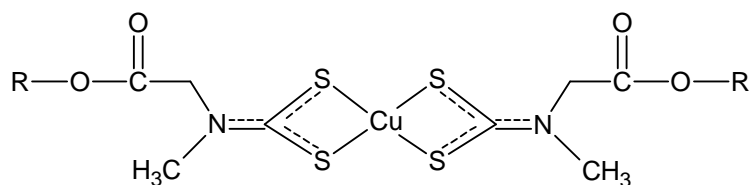


Schéma 4. Obecný strukturální vzorec komplexů 4-6 ([Cu(RSdT)₂]).

Příprava komplexů 4 – 6:

Dithiokarbamátové ligandy byly získány reakcí RSHCl, CS₂ a NaOH v ekvimolárním poměru při 0 °C ve vodě. Po 1 hodině klesla hodnota pH z 10-11 na 6-7. Takto získaný roztok byl přidán ke 2 ml CuCl₂ (bezvodý) v molárním poměru 1:4 (kov:ligand) za stálého míchání a chlazení ledem (0 °C). Vysrážením vznikla hnědá pevná látka, která byla od roztoku oddělena filtrací, promyta vodou a vysušena v exsikatoru s P₄O₁₀.

KOMPLEX 7 (Schéma 5):

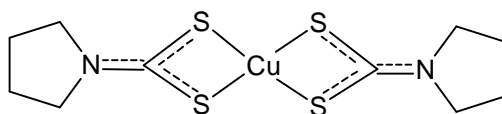


Schéma 5. Strukturální vzorec komplexu 7.

Příprava komplexu 7:

Bezvodý CuCl₂ byl přidán do vodného roztoku NH₄(PyNCS₂) v molárním poměru 1:2 (kov:ligand) za intenzivního míchání. Vysrážená hnědá pevná látka byla přefiltrována, promyta vodou a vysušena v exsikátoru s P₄O₁₀.

KOMPLEX 8 (Schéma 6):

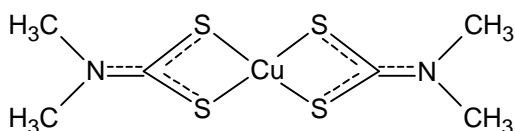


Schéma 6. Strukturální vzorec komplexu 8.

Příprava komplexu 8 [Cu(DMDT)₂]:

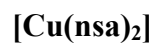
Bezvodý CuCl₂ byl přidán do vodného roztoku Na((CH₃)₂NCS₂) v molárním poměru 1:2 (kov:ligand) za intenzivního míchání. Vysrážená hnědá pevná látka byla přefiltrována, promyta vodou a vysušena v exsikátoru s P₄O₁₀.

Komplexy č. **4-8** byly úspěšně testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **A-431** (rakovina vaječnicků) a **2008** (rakovina děložního čípku). V **Tabulce 2** jsou pro tyto komplexy a cisplatinu, jako srovnávací látku, uvedeny hodnoty IC₅₀. Na základě provedených měření a získaných hodnot IC₅₀ vyplývá, že komplexy **4**, **5** a **6** vykazují účinnost srovnatelnou s cisplatinou. Navíc, komplex **5** je dokonce několikanásobně účinnější.[14]

Tabulka 2. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 4-8.

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	
	A-431	2008
4 [Cu(CH ₃ SDT) ₂]	0,29	0,63
5 [Cu(CH ₃ CH ₂ SDT) ₂]	0,01	0,26
6 [Cu((CH ₃) ₃ CSDT) ₂]	0,59	1,03
7 [Cu(PyDT) ₂]	2,80	0,99
8 [Cu(DMDT) ₂]	0,72	0,24
cisplatina	0,19	0,78

KOMPLEX 9 (Obrázek 8):



Strukturní vzorec ligandu nsa je zobrazen ve *Schématu 7*.

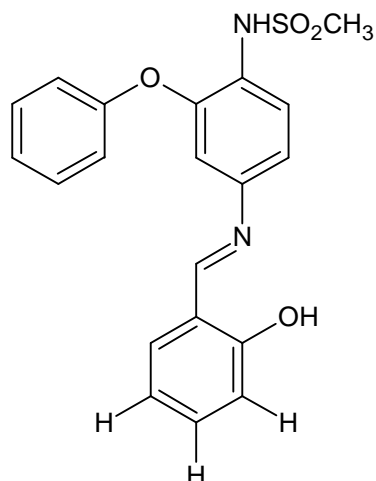
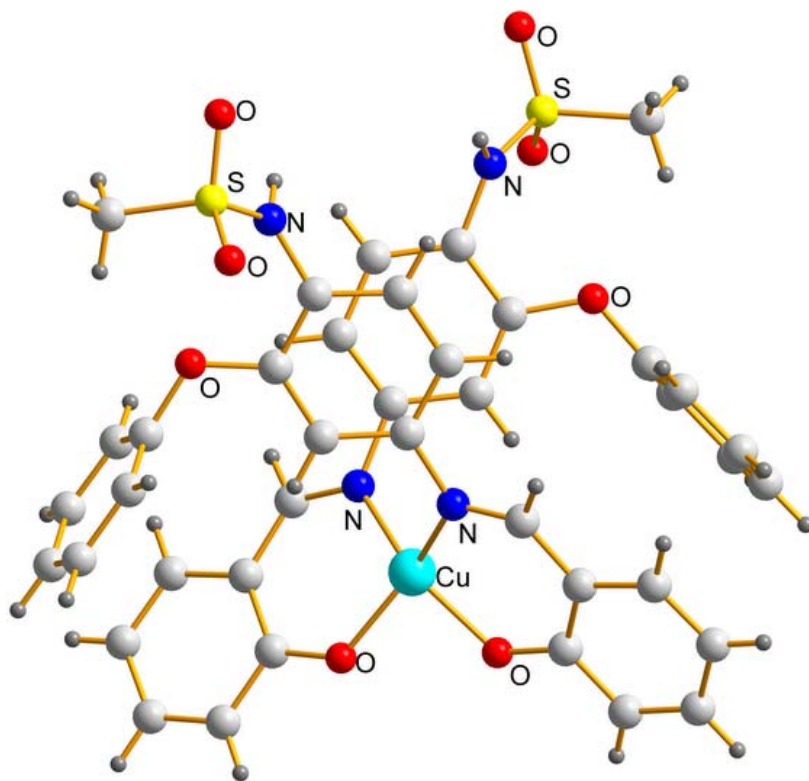


Schéma 7. Strukturní vzorec ligandu nsa.



Obrázek 8. Molekulová struktura komplexu 9.

KOMPLEX 10:



Strukturální vzorec ligandu nhmb je zobrazen ve *Schématu 8*.

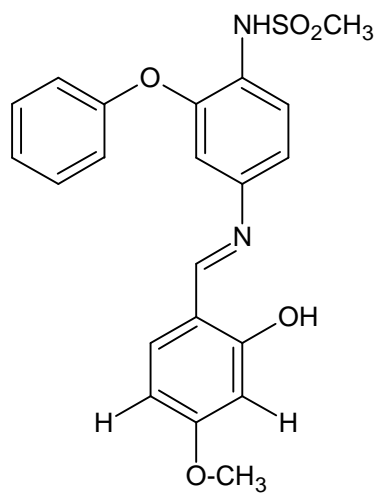
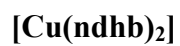


Schéma 8. Strukturální vzorec ligandu nhmb.

KOMPLEX 11:



Strukturní vzorec ligandu ndhb je zobrazen ve *Schématu 9*.

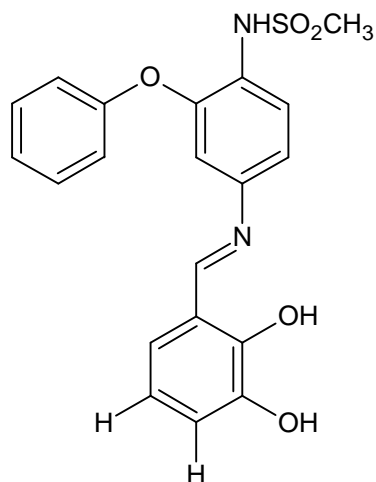


Schéma 9. Strukturní vzorec ligandu ndhb.

KOMPLEX 12:



Strukturní vzorec ligandu nhbb je uvedena ve *Schématu 10*.

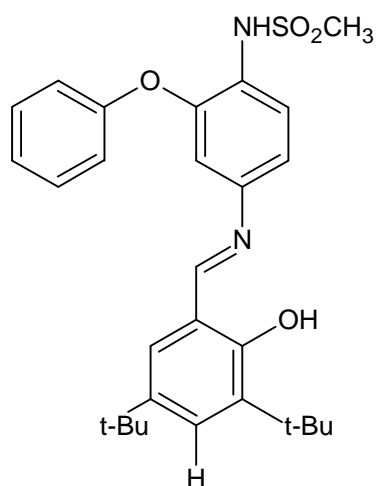


Schéma 10. Strukturní vzorec ligandu nhbb.

Syntéza komplexů 9–12:

Syntéza komplexů byla provedena podle obecného postupu pro konjugáty mědi, který zahrnuje interakci methanolicých roztoků monohydrátu octanu měďnatého a příslušných ligandů v molárním poměru 1:2 (kov:ligand). Reakční směs byla míchána 4 hodiny při neutrálním pH. Vysrážené komplexy **9-12** byly odděleny od roztoku filtrací, promyty ledovým methanolem a vysušeny ve vakuu.

Všechny čtyři ligandy byly spolu s komplexy **9-12** testovány *in vitro* na lidské linii nádorových buněk slinivky břišní, konkrétně na liniích **BXPC-3** a **MiaPaCa-2**. (Rakovina slinivky břišní je jednou z nejhorších forem rakoviny, u které je možnost vyléčení téměř nulová a nejsou ani dost dobře známy faktory vyvolávající vznik tohoto nádorového bujení.) V **Tabulce 3** jsou pro tyto komplexy a také ligandy uvedeny hodnoty IC₅₀. Ze získaných hodnot IC₅₀ vyplývá, že komplex **12** vykazuje z testovaných komplexů nejvyšší účinnost. Ovšem ještě nepatrně vyšší účinnost než komplex **12** vykazuje samotný ligand **nhbb**. [15]

Tabulka 3. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 9-12.

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	
	BxPC-3	MiaPaca-2
nsa	36	43
nhmb	62	100
ndhb	13,5	42
nhbb	3,3	5,2
9 [Cu(nsa) ₂]	8,4	8,7
10 [Cu(nhmb) ₂]	26	14
11 [Cu(ndhb) ₂]	11	12
12 [Cu(nhbb) ₂]	4	7

KOMPLEX 13 (Schéma 11):



Strukturní vzorec ligandu sac je zobrazen ve **Schématu 14**.

KOMPLEX 14 (Schéma 12):



KOMPLEX 15 (Schéma 13):

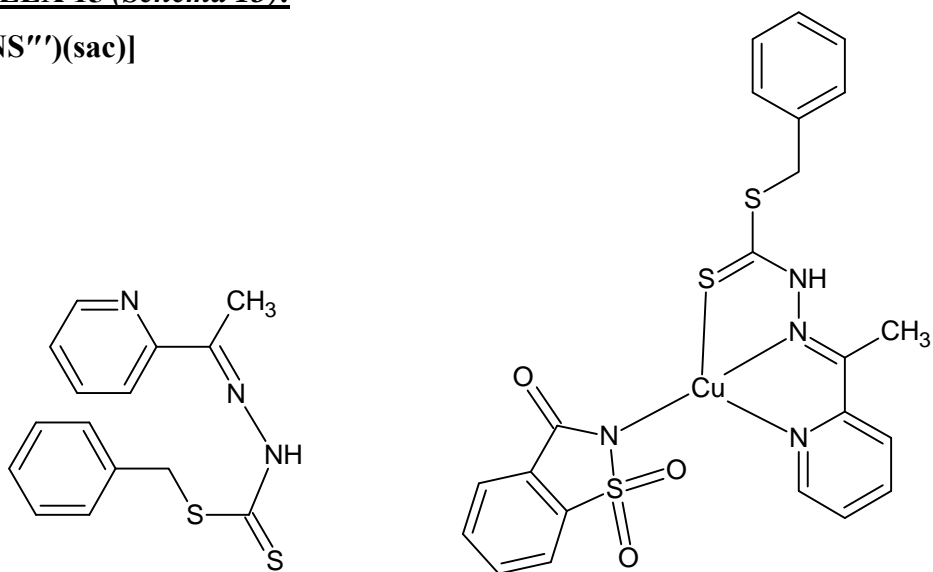


Schéma 11. Strukturní vzorce ligandu NNS' (vlevo) a komplexu 13 (vpravo).

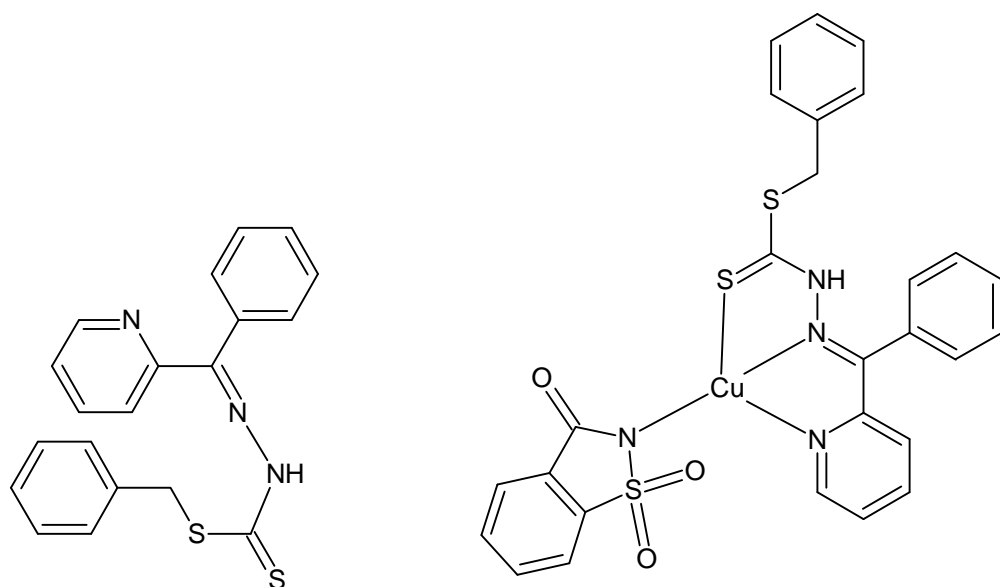


Schéma 12. Strukturní vzorce ligandu NNS'' (vlevo) a komplexu 14 (vpravo).

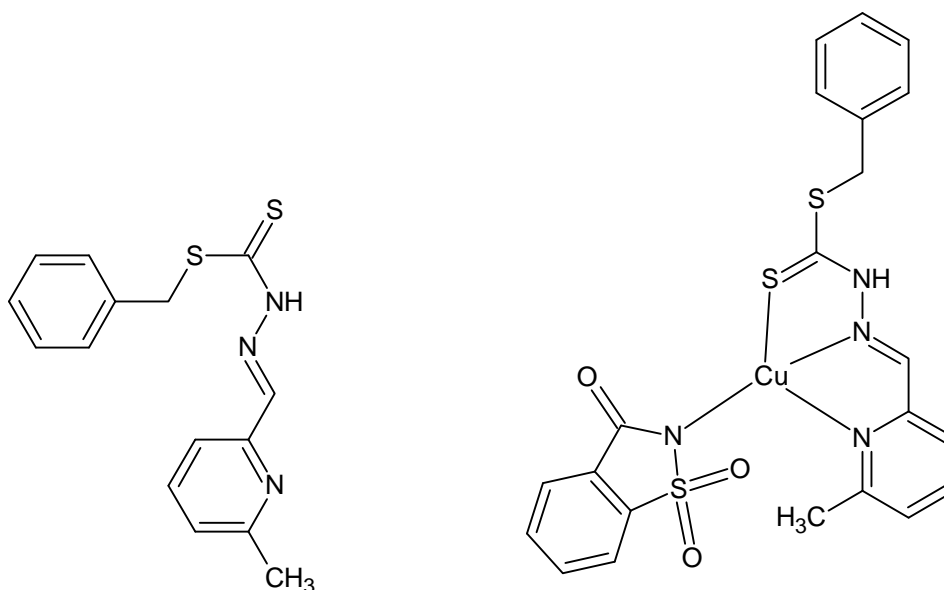


Schéma 13. Strukturní vzorce ligandu NNS''' (vlevo) a komplexu 15 (vpravo).

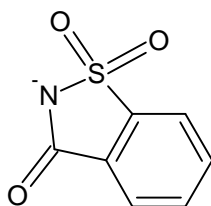


Schéma 14. Strukturní vzorec ligandu sac.

Příprava komplexů 13-15:

[Cu(sac)₂(H₂O)₄]₂·2H₂O (0,001 mol) byl rozpuštěn v horké vodě (25 ml) a smíchán s odpovídajícím ethanolickým roztokem (40 ml) příslušné Schiffovy báze (HNNS', HNNS'', HNNS''') (0,001 mol). Výsledná směs byla zahřívána na vodní lázni po dobu 30 minut. Směs byla nechána zchladnout a poté byl vykrystalizovaný komplex oddělen filtrací, promyt ethanolem a sušen 24 hodin v exsikátoru naplněným silikagelem.

Komplexy **13-15** byly testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **HL-60** (myeloidní leukemické buňky), **MCF-7** (karcinom prsu), **Caov-3** (karcinom vaječníků - papilární adenokarcinom). V **Tabulce 4** jsou pro tyto komplexy a pro srovnání také pro standardy Doxorubicin, Tamoxifen a cisplatinu uvedeny hodnoty CD₅₀. Z těchto hodnot

vyplývá, že všechny 3 komplexy jsou proti linii buněk MCF-7 neaktivní. Přesto v některých jiných hodnotách dosahují lepších výsledků než uvedené standardy.[16]

Tabulka 4. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 13-15.

Sloučenina	CD ₅₀ (μg·ml ⁻¹)		
	HL-60	MCF-7	Caov-3
13 [Cu(NNS')(sac)]	n	n	0,40
14 [Cu(NNS'')(sac)]	0,25	n	40,0
15 [Cu(NNS''')(sac)]	0,50	n	13,5
Doxorubicin	0,80	nt	nt
Tamoxifen	nt	1,80	nt
cisplatina	nt	nt	1,00

n – neaktivní

nt – netestováno

Doxorubicin - (8*S*,10*S*)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracen-5,12-dion

Tamoxifen - (*Z*)-2-[4-(1,2-difenylbut-1-enyl)fenoxy]-*N,N*-dimethyl-ethanamin

KOMPLEX 16 (Schéma 15):

[Cu(NS¹)₂]

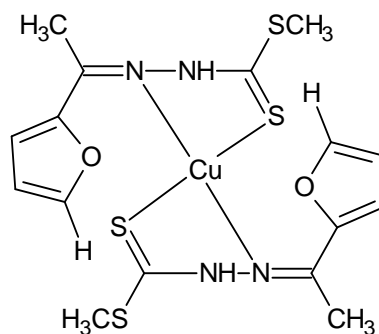
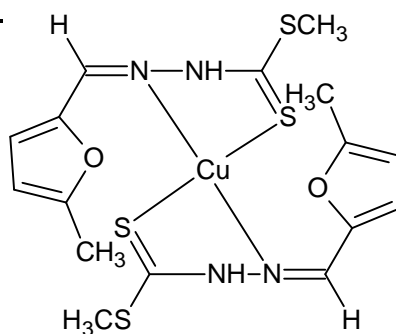


Schéma 15. Strukturní vzorec komplexu 16.

KOMPLEX 17 (Schéma 16):*Schéma 16. Strukturální vzorec komplexu 17.***Příprava komplexů 16 a 17:**

K 0,1 mol $Cu(NO_3)_2 \cdot 2,5 H_2O$ rozpuštěnému v absolutním ethanolu (40 ml) byl přidán ligand (0,2 mol), který byl rovněž rozpuštěn ve 40 ml absolutního ethanolu. Směs byla během míchání zahřívána. Roztok byl poté zfiltrován, získaná sraženina promyta ledovým ethanolem a vysušena nad silikagelem.

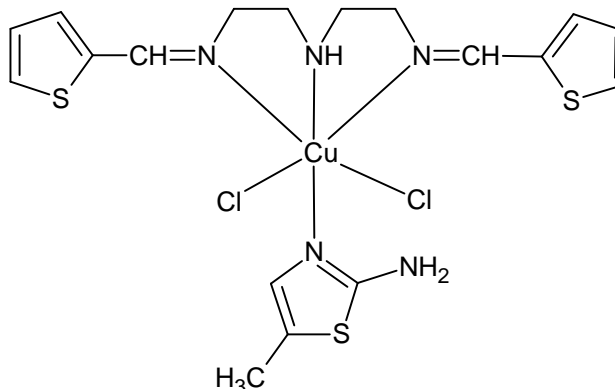
Komplexy **16** a **17** byly testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **CEM-SS** (T-lymfoblastické leukemické buňky), **HT-29** (buňky rakoviny žaludku) a **HELA** (buňky rakoviny děložního čípku). V *Tabulce 5* jsou pro tyto komplexy, jejich ligandy a také pro standardy jako Doxorubicin a Tamoxifen uvedeny hodnoty CD_{50} . Z těchto hodnot vyplývá, že komplex **16** je vysoce účinný proti linii buněk CEM-SS a HELA, zatímco komplex **17** je proti dvěma liniím neaktivní a u třetí linie není hodnota známa.[17]

Tabulka 5. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 16-17.

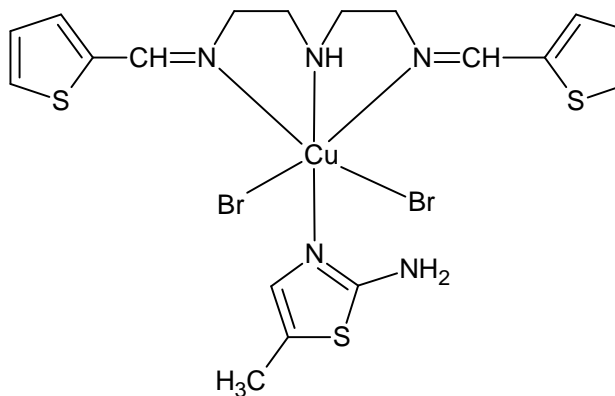
Sloučenina	$CD_{50} (\mu g \cdot ml^{-1})$		
	CEM-SS	HT-29	HELA
NS ¹	n	n	nk
NS ²	n	n	nk
16 $[Cu(NS^1)_2]$	1,6	nk	1,5
17 $[Cu(NS^2)_2]$	n	n	nk
Doxorubicin	0,10	6,0	nk
Tamoxifen	36,0	36,0	nk

n – neaktivní

nk – není k dispozici

KOMPLEX 18 (Schéma 17):**[Cu(dienSS)Cl₂(2a-5mt)]***Schéma 17. Strukturní vzorec komplexu 18.***Příprava komplexu 18:**

2-thiofen-karboxaldehyd (10 mmol) byl smíchán s 5 mmol diethylentriaminu v ledové lázni. Výsledná Schiffova báze byla zředěna 20 ml ethanolu. Postupně byl po kapkách k základnímu roztoku Schiffovy báze přidán ethanolický roztok (10 ml) obsahující 5 mmol CuCl₂·2H₂O a ethanolický roztok (10 ml) s 5 mmol 2a-5mt. Po 10 minutách míchání byla vzniklá modrozelená pevná látka od roztoku odfiltrována, promyta diethyletherem a sušena na vzduchu.

KOMPLEX 19 (Schéma 18):**[Cu(dienSS)Br₂(2a-5mt)]***Schéma 18. Strukturní vzorec komplexu 19.***Příprava komplexu 19:**

Diethylentriamin (10 mmol) byl smíchán s 20 mmol 2-thiofen-karboxaldehydu. Směs byla naředěna 20 ml methanolu. Poté byl k této směsi za současného míchání přidán roztok methanolu (10 ml) s CuBr₂ (10 mmol). Barva roztoku se změnila na zelenou a po 30 minutách

se vytvořila pevná zelená látka. Po 40 minutách míchání byl přidán methanolický roztok (10 ml), ve kterém bylo rozpuštěno 10 mmol ligandu 2a-5mt. Barva roztoku a pevné látky se změnila na modrozelenou. Pevná látka byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena na vzduchu.

KOMPLEX 20 (Schéma 19):

[Cu(dienOO)Br₂(2a-5mt)]

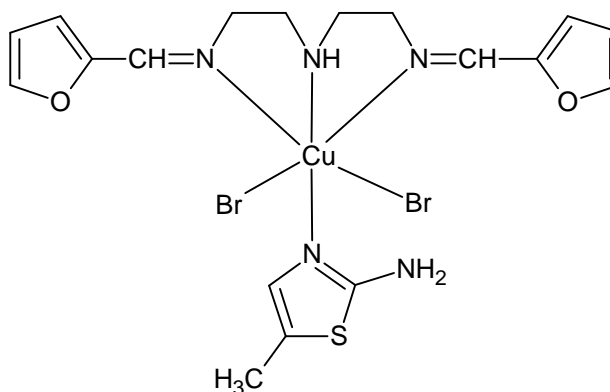


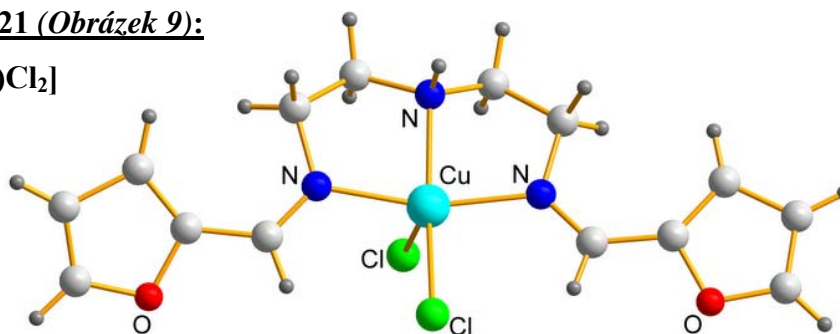
Schéma 19. Strukturní vzorec komplexu 20.

Příprava komplexu 20:

Diethylentriamin (10 mmol) byl smíchán s 20 mmol 2-furaldehydu v ledové lázni. Výsledný roztok byl naředěn 20 ml methanolu. Poté byl k tomuto roztoku za současného míchání po kapkách po dobu 30 minut přidáván roztok methanolu (10 ml), ve kterém byl rozpuštěn CuBr₂ (10 mmol). Barva roztoku se změnila z hnědé na zelenou a vytvořila se zelená pevná látka. Po dalších 10 minutách míchání byl přidán roztok methanolu, ve kterém bylo rozpuštěno 10 mmol 2a-5mt. Po dalších 30 minutách míchání se vytvořila nová pevná látka, která byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena na vzduchu.

KOMPLEX 21 (Obrázek 9):

[Cu(dienOO)Cl₂]



Obrázek 9. Molekulová struktura komplexu 21.

Příprava komplexu 21:

Diethylentriamin (10 mmol) byl smíchán s 20 mmol 2-furaldehydu. Výsledný roztok byl naředěn 20 ml methanolu. Poté byl za současného míchání po kapkách přidán roztok methanolu (10 ml) s $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol). Barva roztoku se změnila na zelenou. Pevná látka byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena na vzduchu.

KOMPLEX 22 (Schéma 20):

[Cu(dienOO)Cl₂(2a-5mt)]

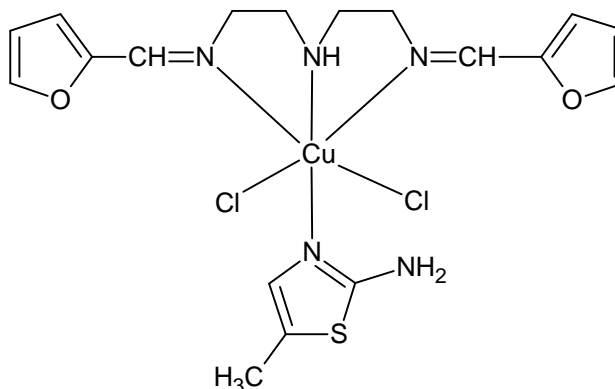


Schéma 20. Strukturní vzorec komplexu 22.

Příprava komplexu 22:

Diethylentriamin (10 mmol) byl smíchán s 20 mmol 2-furaldehydu v ledové lázni. Výsledný roztok byl naředěn 20 ml methanolu. Poté byl za současného míchání přidán roztok methanolu (10 ml) s $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol). Po 30 minutách byl přidán ještě roztok methanolu (10 ml), ve kterém bylo rozpuštěno 10 mmol 2a-5mt. Vznikla modrozelená pevná látka, která byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena za pokojové teploty.

KOMPLEX 23 (Schéma 21):

[Cu(dienOO)(NO₃)₂(2a-5mt)]

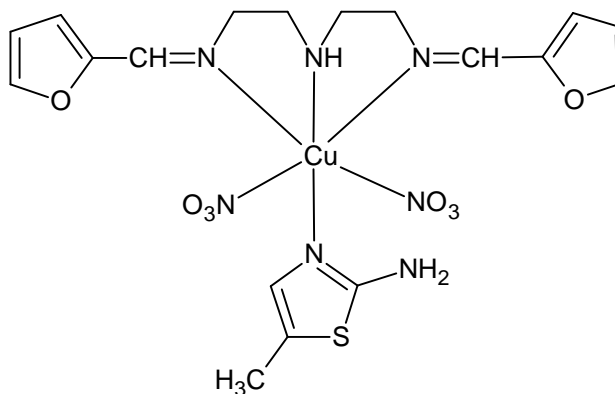


Schéma 21. Strukturní vzorec komplexu 23.

Příprava komplexu 23:

Diethylentriamin (10 mmol) byl smíchán s 20 mmol 2-furaldehydu. Výsledný roztok byl naředěn 20 ml methanolu. Poté byl za současného míchání přidán roztok methanolu (10 ml) s $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10 mmol). Po 10 minutách míchání byl přidán roztok methanolu (10 ml) s 10 mmol 2a-5mt. Vzniklá modrozelená pevná látka byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena na vzduchu.

Komplexy **18-23** byly testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **MRC-5** (lidský plicní fibroblast), **HELA** (buňky rakoviny děložního čípku), **MCF-7** (karcinom prsu), **T47D** (karcinom prsu), **HT-29** (rakovina tlustého střeva), **OAW42** (rakovina vaječníku). V *Tabulce 6* jsou pro tyto komplexy a také ligand (2a-5mt) uvedeny hodnoty IC_{50} . Z těchto hodnot vyplývá, že nejvyšší účinnost vykazuje komplex **20** proti linní buněk MCF-7. Samotný ligand (2a-5mt) je neaktivní vůči všem buněčným liniím.[18]

Tabulka 6. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 18-23.

Sloučenina	IC_{50} (μM)					
	MRC-5	HELA	MCF-7	T47D	HT-29	OAW42
(2a-5mt)	n	n	n	n	n	n
18 [Cu(dienSS)Cl ₂ (2a-5mt)]	45	29	41	nk	35	nk
19 [Cu(dienSS)Br ₂ (2a-5mt)]	44	55	39	nk	25	nk
20 [Cu(dienOO)Br ₂ (2a-5mt)]	30	35	18	75	45	nk
21 [Cu(dienOO)Cl ₂]	nk	nk	nk	nk	nk	nk
22 [Cu(dienOO)Cl ₂ (2a-5mt)]	nk	nk	nk	nk	nk	nk
23 [Cu(dienOO)(NO ₃) ₂ (2a-5mt)]	n	125	nk	nk	125	100

n – neaktivní

nk – není k dispozici

KOMPLEX 24 (Schéma 22):



KOMPLEX 25 (Schéma 23):



KOMPLEX 26 (Schéma 24):



KOMPLEX 27 (Schéma 25):



KOMPLEX 28 (Schéma 26):



KOMPLEX 29 (Schéma 27):

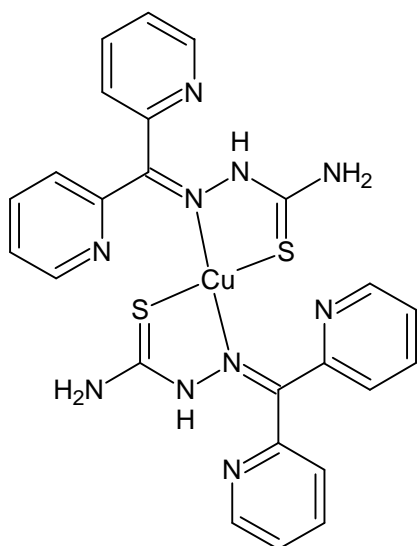


Schéma 22. Strukturní vzorec komplexu 24.

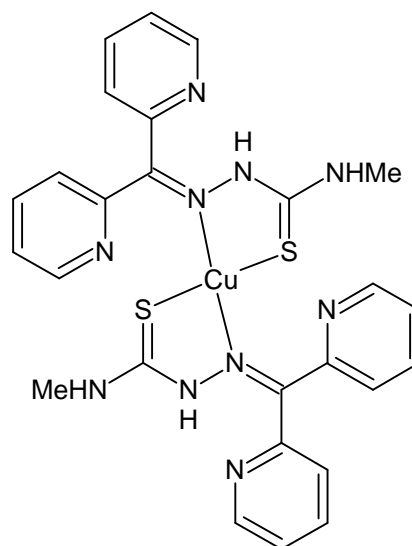


Schéma 23. Strukturní vzorec komplexu 25.

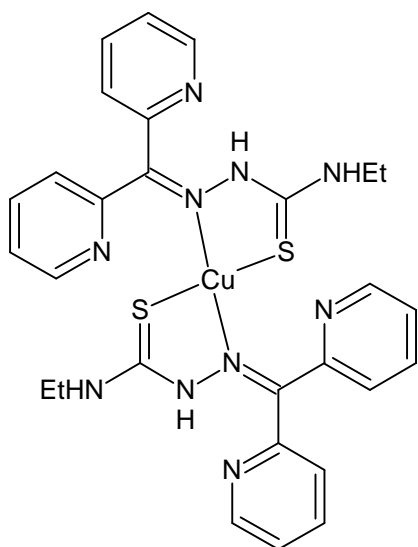


Schéma 24. Strukturní vzorec komplexu 26.

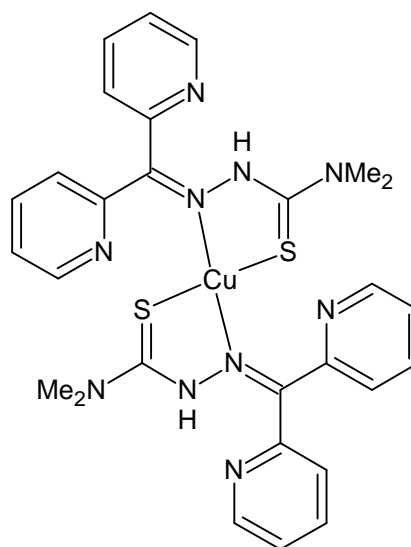


Schéma 25. Strukturní vzorec komplexu 27.

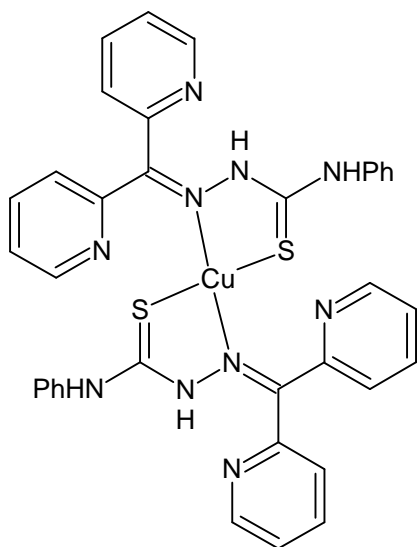


Schéma 26. Strukturní vzorec komplexu 28.

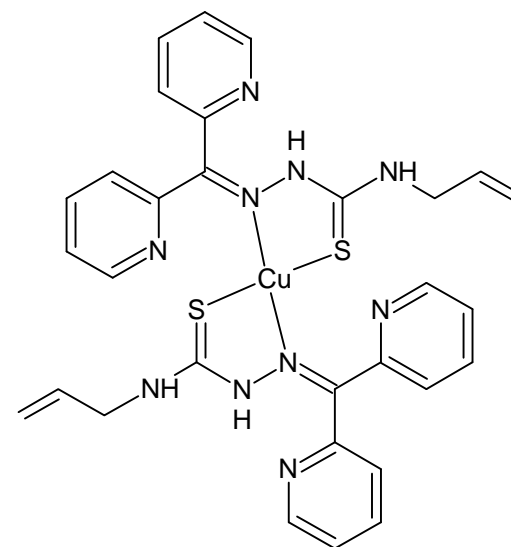


Schéma 27. Strukturní vzorec komplexu 29.

Příprava komplexů 24 - 29:

Všech 6 komplexů bylo připraveno následujícím obecným postupem. Odpovídající množství thiosemikarbazonu (1 mmol) bylo rozpuštěno v ethanolu (15 ml). K roztoku byl přidán Et₃N (5 mmol). Ke směsi bylo také přidáno 5 mmol Cu(ClO₄)₂·6H₂O. Směs byla

zahřívána 30 minut, poté zchlazena a zfiltrována za vakua. Produkt byl promyt ethanolem a diethyletherem.

Komplexy **24-29** byly testovány *in vitro* na nádorové buněčné linii **HL-60** (myeloidní leukemické buňky). V *Tabulce 7* jsou pro tyto komplexy a také pro volné ligandy uvedeny hodnoty IC_{50} . Z těchto hodnot vyplývá, že nejvyšší protirakovinovou účinnost vykazují komplexy **27** a **28** ($IC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$). Ovšem stejně velkou účinnost vykazují i samostatné ligandy. Nejen z tohoto důvodu se tyto ligandy a komplexy hodí pro další podrobnější studium.[19]

Tabulka 7. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 24-29.

	$IC_{50} (\mu\text{M}) \pm \text{S.D.}$
Sloučenina	HL-60
HDpT	$2,2 \pm 0,1$
HDp4mT	$1,41 \pm 0,06$
HDp4eT	$0,05 \pm 0,01$
HDp44mT	$0,01 \pm 0,001$
HDp4pT	$0,01 \pm 0,002$
HDp4aT	$0,05 \pm 0,02$
24 [Cu(HDpT)₂]	$2,5 \pm 0,3$
25 [Cu(HDp4mT)₂]	$0,15 \pm 0,01$
26 [Cu(HDp4eT)₂]	$0,03 \pm 0,01$
27 [Cu(HDp44mT)₂]	$0,01 \pm 0,001$
28 [Cu(HDp4pT)₂]	$0,01 \pm 0,001$
29 [Cu(HDp4aT)₂]	$0,03 \pm 0,01$

KOMPLEX 30 (Schéma 29):



Strukturní vzorec ligandu maltol je zobrazen ve *Schématu 28*.

KOMPLEX 31 (Schéma 30):



KOMPLEX 32 (Schéma 31):



KOMPLEX 33 (Schéma 32):



KOMPLEX 34 (Schéma 33):

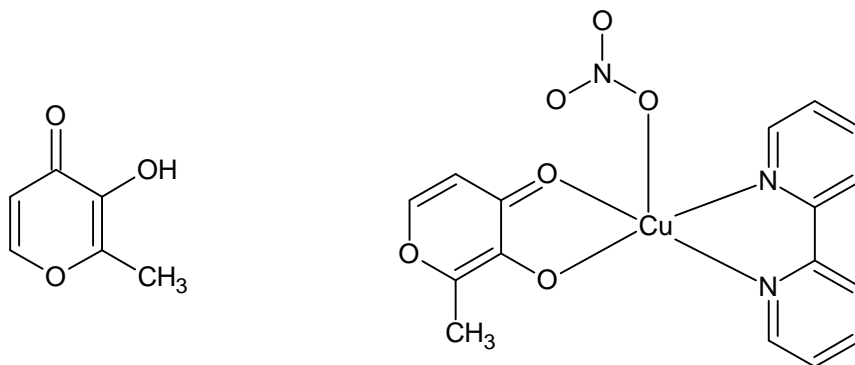


Schéma 28. Strukturní vzorec ligandu maltol. Schéma 29. Strukturní vzorec komplexu 30.

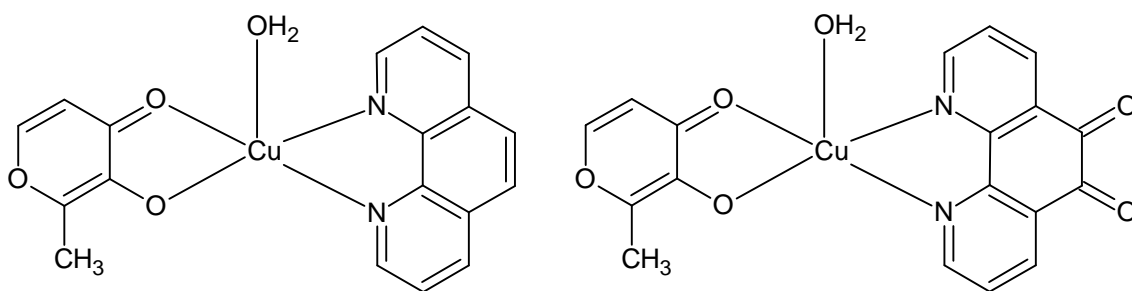


Schéma 30. Strukturní vzorec komplexu 31. Schéma 31. Strukturní vzorec komplexu 32.

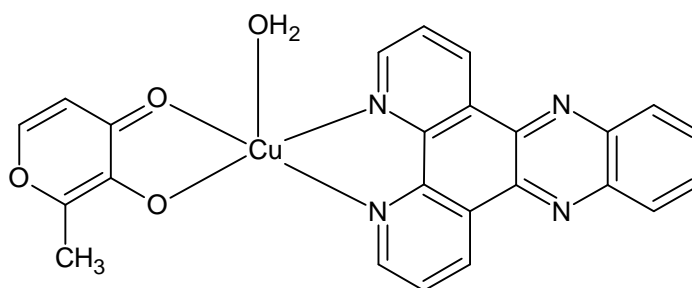


Schéma 32. Strukturní vzorec komplexu 33.

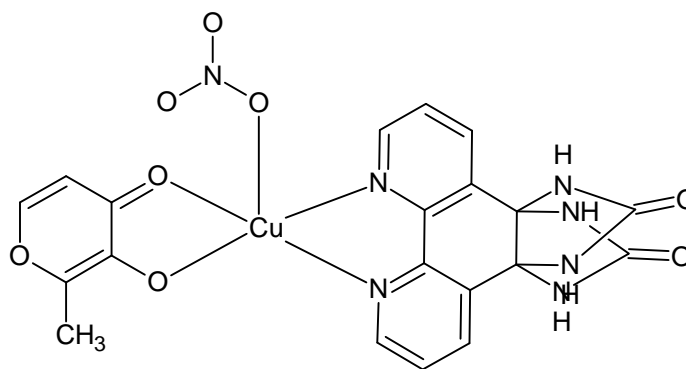


Schéma 33. *Strukturní vzorec komplexu 34.*

Příprava komplexu 30:

Vodný roztok $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) byl přidán k roztoku 2,2'-bipyridinu (1 mmol) a maltolu (1 mmol) ve 30 ml methanolu. Směs byla ponechána 3 hodiny pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla.

Příprava komplexu 31:

Komplex byl připraven podle podobného postupu jako komplex 30. Byl použit 1,10-fenanthrolin místo 2,2'-bipyridinu.

Příprava komplexu 32:

Komplex byl připraven podle podobného postupu jako komplex 30. Byl použit 1,10-fenanthrolin-5,6-dion místo 2,2'-bipyridinu.

Příprava komplexu 33:

Komplex byl připraven podle podobného postupu jako komplex 30. Byl použit dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazin místo 2,2'-bipyridinu.

Příprava komplexu 34:

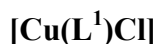
Komplex byl připraven podle podobného postupu jako komplex 30. Byl použit 4b,5,7,7a-tetrahydro-4b,7a-epiminomethanoimino-6H-imidazo[4,5-f]-[1,10]-fenanthrolin-6,13-dion místo 2,2'-bipyridinu.

Komplexy **30-34** byly testovány *in vitro* na nádorové buněčné linii **HELA** (buňky rakoviny děložního čípku). V *Tabulce 8* jsou pro tyto komplexy uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že nejvyšší účinnost proti životaschopnosti buněk rakoviny děložního čípku vykazuje komplex **33**. [20]

Tabulka 8. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 30-34.

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)
	HELA
30 [Cu(bpy)(maltol)(NO ₃)]	248
31 [Cu(phen)(maltol)(H ₂ O)](NO ₃)·H ₂ O	157
32 [Cu(phendion)(maltol)(H ₂ O)](NO ₃)·H ₂ O	204
33 [Cu(dppz)(maltol)(H ₂ O)](NO ₃)·2H ₂ O	153
34 [Cu(bpg)(maltol)(NO ₃)]·0,3H ₂ O	268

KOMPLEX 35 (Schéma 34):



KOMPLEX 36 (Schéma 35):



KOMPLEX 37 (Schéma 36):

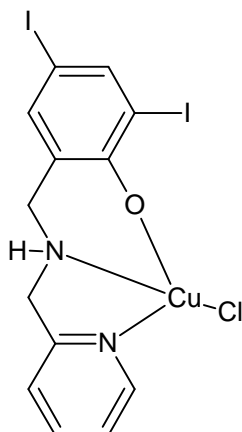
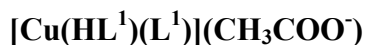


Schéma 34. Strukturní vzorec komplexu 35.

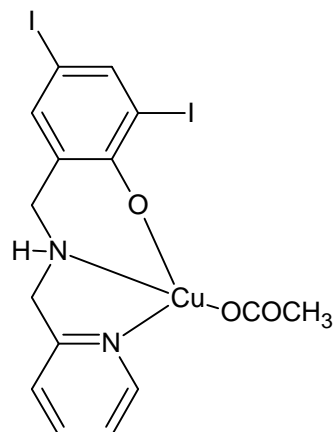


Schéma 35. Strukturní vzorec komplexu 36.

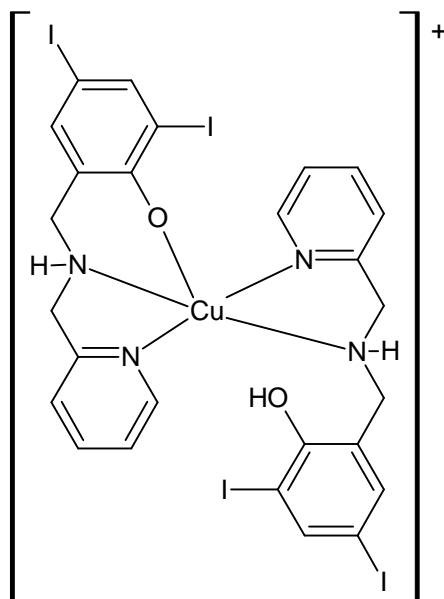


Schéma 36. Strukturní vzorec komplexu 37.

Příprava komplexu 35:

1,1 mmol HL¹ byl rozpuštěn v 15 ml DMSO. Po 5 minutách byl za současného míchání při pokojové teplotě a po kapkách po dobu 45 minut přidáván roztok CuCl₂·2H₂O (1,2 mmol) v 15 ml DMSO. K zelenému roztoku bylo přidáno 15 ml ledového ethanolu. Po 48 hodinách se vytvořily tmavě zelené krystaly.

Příprava komplexu 36:

1,1 mmol HL¹ byl rozpuštěn v 15 ml DMSO. K roztoku bylo přidáno ekvimolární množství triethylaminu. Během míchání při pokojové teplotě po dobu 5 minut byl připraven roztok z 1,2 mmol Cu(CH₃COO)₂·2H₂O a 15 ml DMSO. Tento roztok byl poté přidáván po kapkách do roztoku s triethylaminem. Poté byla směs nechána zreagovat po dobu 45 minut. Vzniklý zeleně zbarvený komplex byl zfiltrován, promyt ledovým methanolem a diethyletherem.

Příprava komplexu 37:

15 ml methanolického roztoku HL¹ (2,1 mmol) bylo po kapkách přidáváno k 15 ml methanolického roztoku Cu(CH₃COO)₂·2H₂O (1,2 mmol) při 45 °C. Po 45 minutách byla získána zelená sraženina, která byla z roztoku odfiltrována, promyta ledovým methanolem a diethyletherem. Poté byla pevná látka překrystalizována v dichlormethanu.

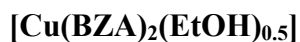
Komplexy **35-37** a ligand byly testovány *in vitro* na nádorové buněčné linii **Jurkat T** (leukemické buňky). V **Tabulce 9** jsou pro tyto komplexy uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že nejvyšší účinnost proti leukemickým buňkám vykazuje komplex **35**. [21]

Tabulka 9. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy **35-37**.

	IC_{50} (μM) \pm S.D.
Sloučenina	Jurkat T
HL ¹	n
35 [Cu(L ¹)Cl]	3,82 \pm 0,01
36 [Cu(L ¹)(CH ₃ COO ⁻)]	4,46 \pm 0,01
37 [Cu(HL ¹)(L ¹)](CH ₃ COO ⁻)	3,98 \pm 0,01

n – neaktivní

KOMPLEX 38:



Komplex je prekurzorem pro přípravu komplexů **39-41**. Strukturální vzorec ligandu BZAH je zobrazen ve **Schématu 37**.

KOMPLEX 39 (Obrázek 10):



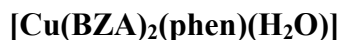
Strukturální vzorec ligandu TBZH je zobrazen ve **Schématu 37**.

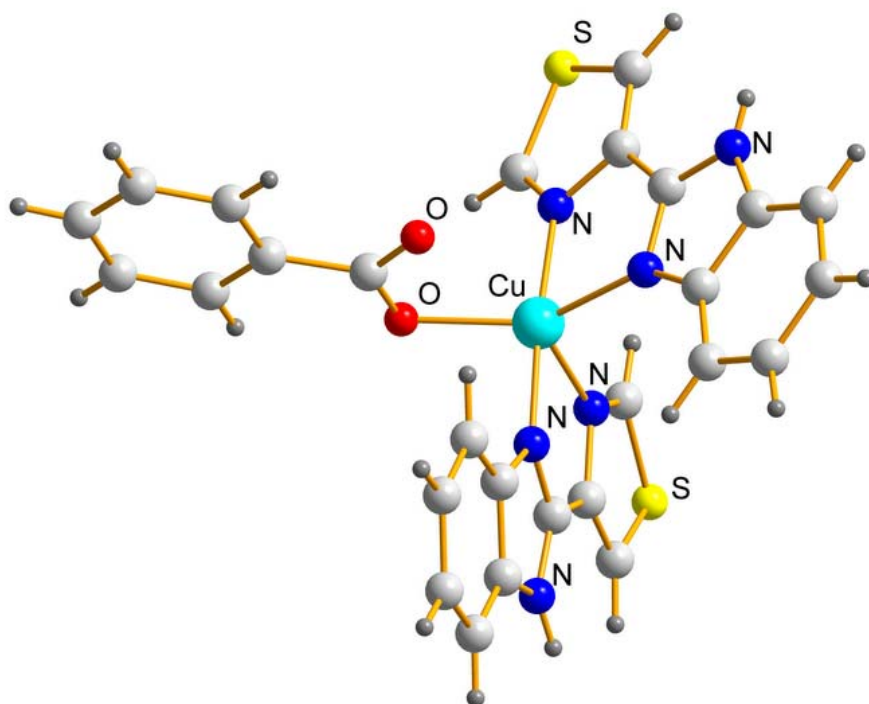
KOMPLEX 40 (Obrázek 11):



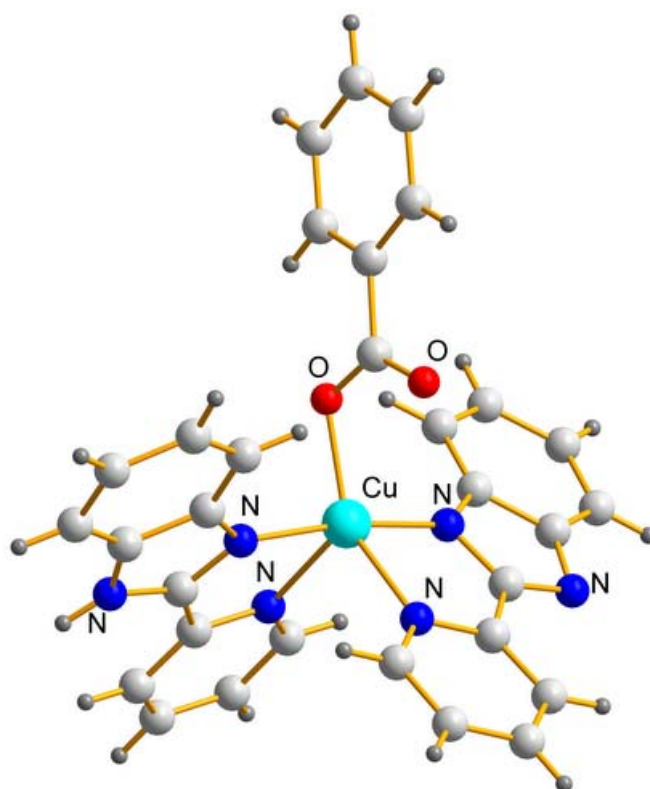
Strukturální vzorec ligandu PyBZIMH je zobrazen ve **Schématu 37**.

KOMPLEX 41 (Obrázek 12):

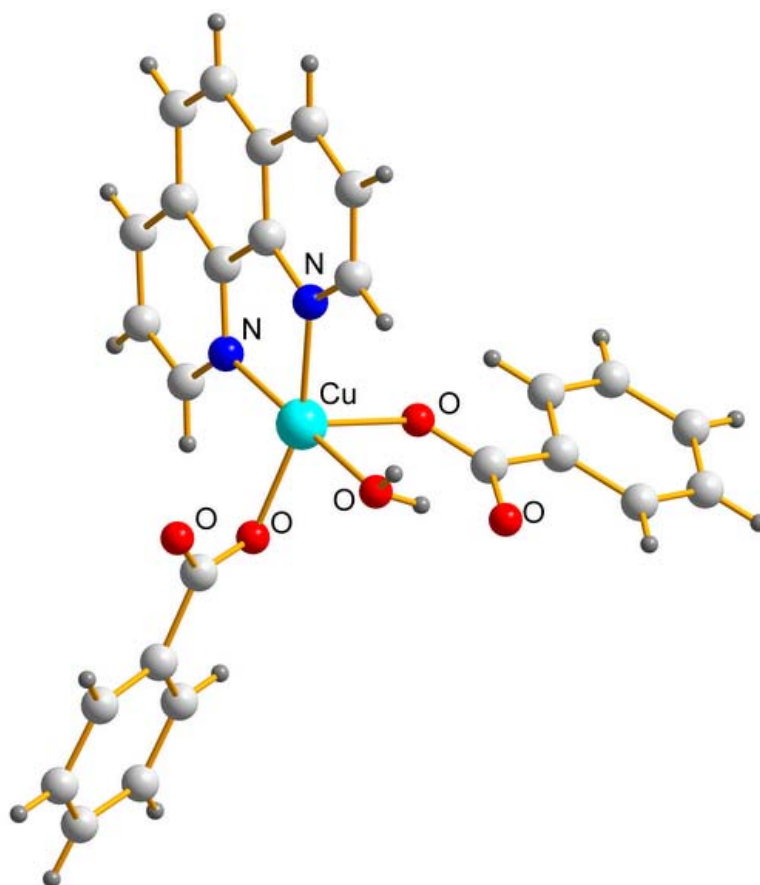




Obrázek 10. Molekulová struktura komplexu 39.



Obrázek 11. Molekulová struktura komplexu 40.



Obrázek 12. Molekulová struktura komplexu 41.

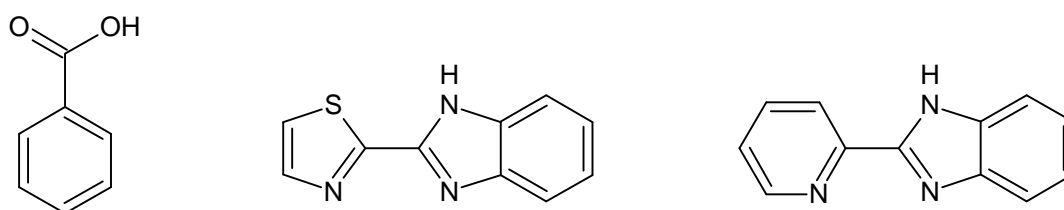


Schéma 37. Strukturní vzorce ligandů BZAH (vlevo), TBZH (uprostřed) a 2-PyBZIMH (vpravo).

Příprava komplexu 38:

K čerstvě připravenému roztoku $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (10,25 mmol) v ethanolu (50 ml) byl přidán roztok kyseliny benzoové (20,5 mmol) smíchané s ethanolom (25 ml). Suspenze byla ponechána 3 hodiny pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Vzniklý modrozelený prášek byl po usazení odfiltrován, promyt malým množstvím ethanolu a vysušen na vzduchu

Příprava komplexu 39:

K horkému roztoku komplexu **38** (0,8 mmol) v ethanolu popř. vodě (100 ml) byl přidán thiabendazol (TBZH) (3,3 mmol). Vzniklý zelený roztok byl ponechán pod zpětným chladičem 3 hodiny při teplotě varu rozpouštědla. Výsledný zelený prášek byl po usazení odfiltrován, promyt malým množstvím ethanolu a vysušen na vzduchu.

Příprava komplexu 40:

K roztoku komplexu **38** (1,6 mmol) v ethanolu (75 ml) byl přidán 2-(2-pyridyl)-benzimidazol (2-PyBZIMH) (6,6 mmol). Vzniklý zelený roztok byl ponechán 3 hodiny pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Získaný zelený prášek byl po usazení odfiltrován, promyt malým množstvím ethanolu a vysušen na vzduchu.

Příprava komplexu 41:

K roztoku $[\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (1,25 mmol) v ethanolu (75 ml) byl přidán 1,10-fenantrolin (2,5 mmol) a kyselina benzoová (BZAH) (2,5 mmol). Vzniklý roztok byl zahříván a míchán 2 hodiny a nechán přes noc odstát. Získaný modrozelený prášek byl po usazení odfiltrován, promyt malým množstvím ethanolu a vysušen na vzduchu.

Komplexy **38-41** byly testovány *in vitro* na nádorových buněčných liniích **Hep-G2** (hepatocelulární karcinom) a **A-498** (karcinom ledvin). V **Tabulce 10** jsou pro tyto komplexy uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že největší aktivitu proti rakovinným buňkám vykazuje komplex **41**, jehož účinnost je srovnatelná s účinností cisplatiny.[12]

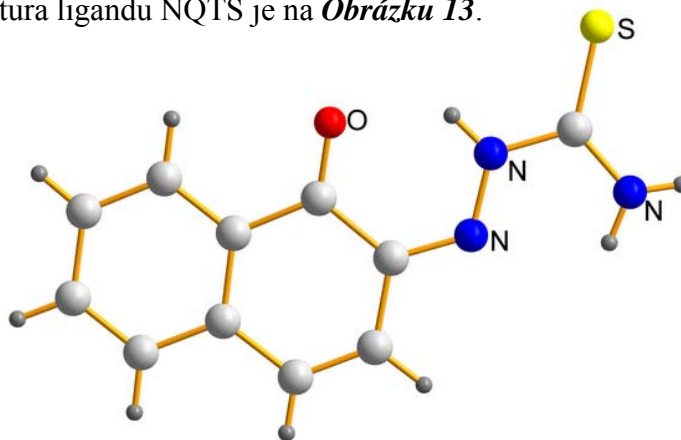
Tabulka 10. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy **38-41**.

Sloučenina	IC_{50} (μM) \pm S.D.	
	Hep-G2	A-498
38 $[\text{Cu}(\text{BZA})_2(\text{EtOH})_{0,5}]$	>200	130 \pm 16,7
39 $[\text{Cu}(\text{TBZH})_2(\text{BZA})](\text{BZA}) \cdot 0,5 \text{ TBZH} \cdot \text{H}_2\text{O}$	32 \pm 0,3	23,32 \pm 1,8
40 $[\text{Cu}(2\text{-PyBZIMH})(2\text{-PyBZIM})(\text{BZA})] \cdot 1,66 \text{ EtOH}$	21,2 \pm 7,7	13,2 \pm 4,4
41 $[\text{Cu}(\text{BZA})_2(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]$	9,5 \pm 2,1	21,3 \pm 6,7
cisplatina	15 \pm 2,7	14 \pm 1

KOMPLEX 42 (Schéma 38):



Molekulová struktura ligandu NQTS je na **Obrázku 13**.



Obrázek 13. Molekulová struktura ligandu NQTS.

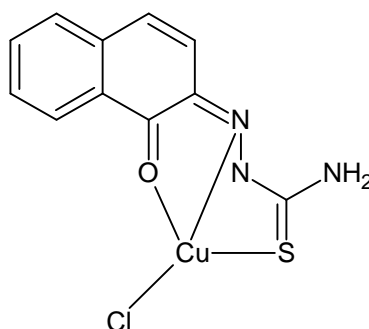


Schéma 38. Strukturální vzorec komplexu 42.

Příprava komplexu 42:

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,0 mmol) byl rozpuštěn ve 3 ml horké destilované vody a smíchán s NQTS (1,0 mmol) v 50 ml horkého ethanolu. Reakční směs byla ponechána na vodní lázni pod zpětným chladičem 3 – 5 hodin. Vzniklý komplex byl odfiltrován, promyt horkým ethanolem a vysušen ve vakuu.

Komplex 42 a ligand NQTS byly testovány *in vitro* na nádorovou buněčnou linii MCF-7 (rakovina prsu). V **Tabulce 11** jsou pro tento komplex a ligand uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že komplex i ligand vykazují silný protinádorový účinek. Volný ligand je nepatrně účinnější, než komplex.[22]

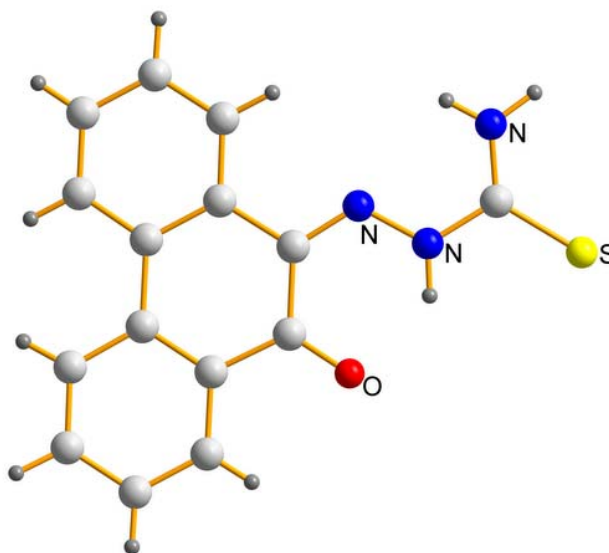
Tabulka 11. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex 42.

	IC ₅₀ (μM)
Sloučenina	MCF-7
NQTS	3,5
42 [Cu(NQTS)Cl]	4,02

KOMPLEX 43 (Schéma 39):



Molekulová struktura ligandu PQTSC je na *Obrázku 14*.



Obrázek 14. Molekulová struktura ligandu PQTSC.

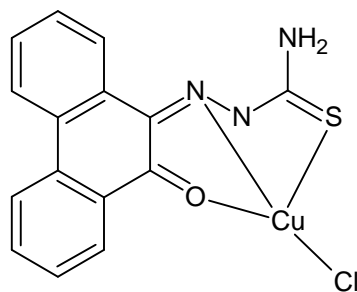


Schéma 39. Strukturní vzorec komplexu 43.

Příprava komplexu 43:

Směs $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) a PQTSC (1 mmol) v ethanolu byla ponechána pod zpětným chladičem na vodní lázni po dobu 2 hodin při teplotě varu rozpouštědla. Ochlazením byl vysrážen kovový komplex, který byl promyt ledovým ethanolom a vysušen ve vakuu.

Komplex **43** a ligand PQTSC byly testovány *in vitro* na nádorovou buněčnou linii **T47D** (rakovina prsu). V **Tabulce 12** jsou pro tento komplex a ligand uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že komplex i ligand vykazují silný protirakovinotvorný účinek. Komplex je výrazně účinnější, než samotný ligand.[23]

Tabulka 12. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex **43**.

	IC_{50} (μM)
Sloučenina	T47D
PQTSC	1,81
43 $[\text{Cu}(\text{PQTSC})\text{Cl}]$	0,31

KOMPLEX 44 (Schéma 40):

$[\text{Cu}(\text{hzkta})]$

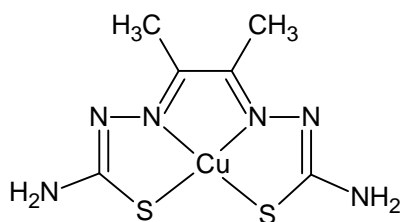


Schéma 40. Strukturní vzorec komplexu **44**.

Příprava komplexu 44:

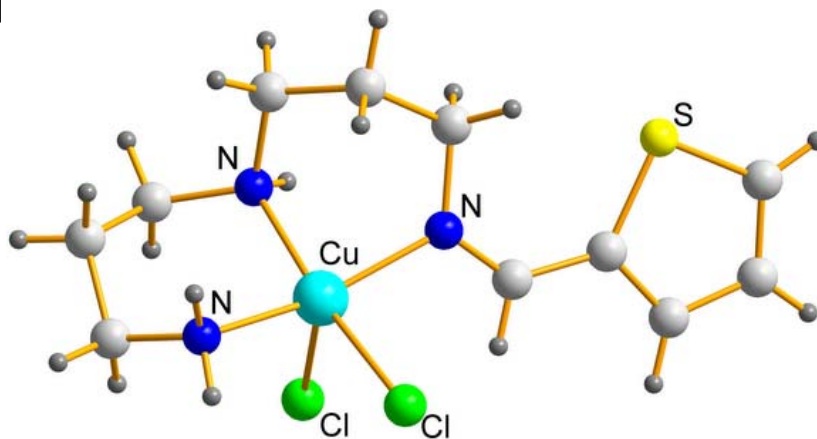
Ethanolický roztok 2,3-butandionu (5 mmol) byl po kapkách přidáván do roztoku thiosemikarbazidu (10 mmol). Roztok byl míchán 8 hodin asi při 70 °C. Vzniklé světležluté sraženiny byly zfiltrány a překrystalizovány v roztoku methanol/ethanol (1:1 v/v). Poté byla směs ligandu (5 mmol) a bezvodého octanu měďnatého (5 mmol) v ethanolu (80 ml) míchána 6 hodin asi při 65 °C až do získání požadovaného komplexu.

Komplex **44** a ligand byly testovány *in vitro* na nádorové buněčné linie **HL-60** (myeloidní leukemické buňky), **Spca-1** (plicní adenokarcinom), **Tb** (rakovina dutiny ústní), **MGC** (rakovina žaludku), **K562** (myeloidní leukémie). V **Tabulce 13** jsou pro tento komplex a ligand uvedeny hodnoty IC_{50} . Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} vyplývá, že komplex vykazuje silný protirakovinotvorný účinek proti všem testovaným formám buněčných linií. Komplex je výrazně účinnější než samotný ligand.[24]

Tabulka 13. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex **44**.

Sloučenina	IC_{50} (μM)				
	HL-60	Spca-1	Tb	MGC	K562
hzkta	37,25	>100	72,86	>100	>100
44 [Cu(hzkta)]	1,01	5,167	7,18	9,06	9,917

KOMPLEX 45 (Obrázek 15):



Obrázek 15. Molekulová struktura komplexu **45**.

KOMPLEX 46 (Schéma 41):

[Cu(dptaS)Br₂]

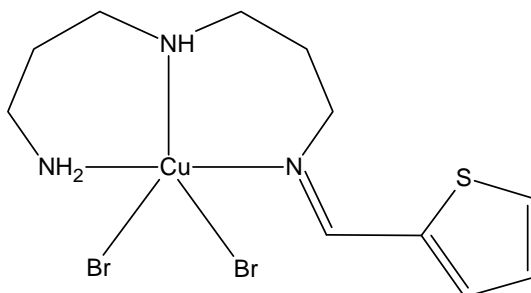


Schéma 41. Strukturní vzorec komplexu 46.

Příprava komplexu 45:

Ethanolické roztoky thiofen-2-karboxaldehydu (20 mmol) a dpta (10 mmol) byly smíchány v ledové lázni. Vzniklá směs byla naředěna 20 ml ethanolu. Po 30 minutách byl po kapkách přidán ethanolický roztok CuCl₂·2H₂O (10 mmol). Ke vzniklé modré suspenzi byl poté přidán ethanolický roztok 2-amino-5-methylthiazolu (10 mmol), přičemž došlo ke změně barvy roztoku z modré na modrozelenou. Vytvořená sraženina byla odfiltrována, promyta diethyletherem a vysušena ve vakuu.

Příprava komplexu 46:

Komplex byl připraven z ekvimolárního množství (10 mmol) dptaSS a CuBr₂. Postup syntézy je shodný s postupem přípravy předešlého komplexu.

Komplexy **45-46** byly testovány *in vitro* na buněčné linii **MRC-5** (zdravé buňky lidského plicního fibroblastu), **MCF-7** (lidské buňky rakoviny prsu), **T47D** (lidské buňky rakoviny prsu), **HELA** (rakovina děložního čípku), **HT29** (rakovina tlustého střeva). Na základě provedených měření a získaných hodnot IC₅₀ (**Tabulka 14**) vyplývá, že nejvyšší účinnost vykazuje komplex **46**, a to proti liniím HELA a HT29. Ovšem podobnou koncentrací jsou inhibovány také zdravé buňky.[25]

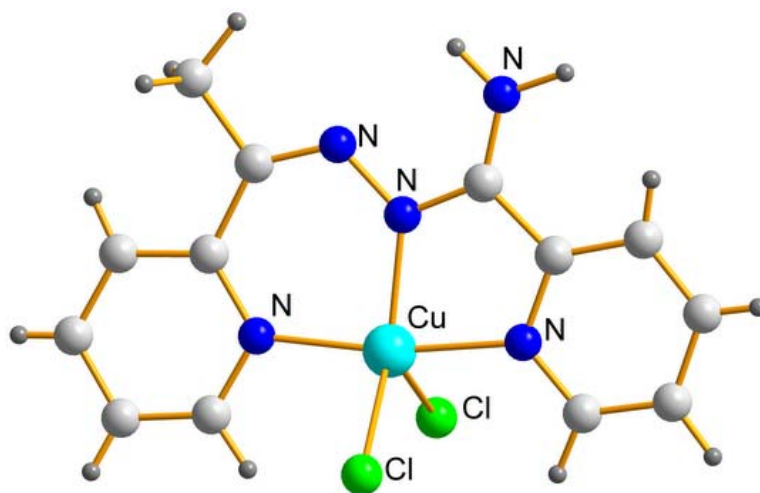
Tabulka 14. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy 45 a 46.

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)				
	MRC-5	MCF-7	T47D	HELA	HT29
45 [Cu(dptaS)Cl ₂]	nt	57	145	nt	103
46 [Cu(dptaS)Br ₂]	54	65	nt	31	46

nt – netestováno

KOMPLEX 47 (Obrázek 16):

[Cu(appc)Cl₂]



Obrázek 16. Molekulová struktura komplexu 47.

KOMPLEX 48:

[Cu(atpc)Cl₂]

Strukturní vzorec ligandu atpc je zobrazen ve *Schématu 42*.

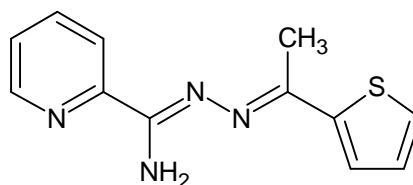


Schéma 42. Strukturní vzorec ligandu atpc.

Příprava komplexu 47:

Komplex byl připraven smícháním ekvimolárního množství ligandu appc (2 mmol) a $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol) ve 30 ml methanolu. Reakční směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem a poté byla ještě ponechána stát několik dní při pokojové teplotě. Produktem reakce byly sytě zelené krystaly.

Příprava komplexu 48:

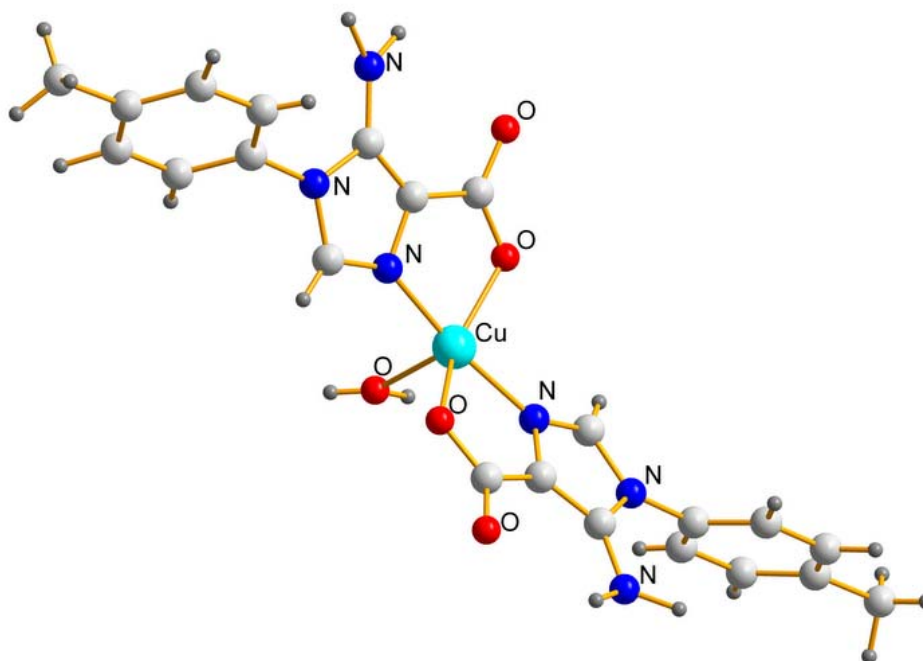
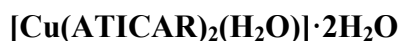
Komplex byl připraven smícháním ekvimolárního množství ligandu atpc (2 mmol) a $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol) ve 30 ml methanolu. Reakční směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem a poté byla ještě ponechána stát několik dní při pokojové teplotě. Výsledným produktem byl zelený prášek.

Komplexy **47-48** byly testovány *in vitro* na myší buněčnou linii **B16F10** (myší melanom). Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} (**Tabulka 15**) vyplývá, že komplex **47** vykazuje proti buňkám myšího melanomu vyšší účinnost než komplex **48**. [26]

Tabulka 15. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy **47** a **48**.

	IC_{50} (μM)
Sloučenina	B16F10
47 [Cu(appc)Cl₂]	6,8
48 [Cu(atpc)Cl₂]	>10

KOMPLEX 49 (Obrázek 17):



Obrázek 17. Molekulová struktura komplexu 49.

Příprava komplexu 49:

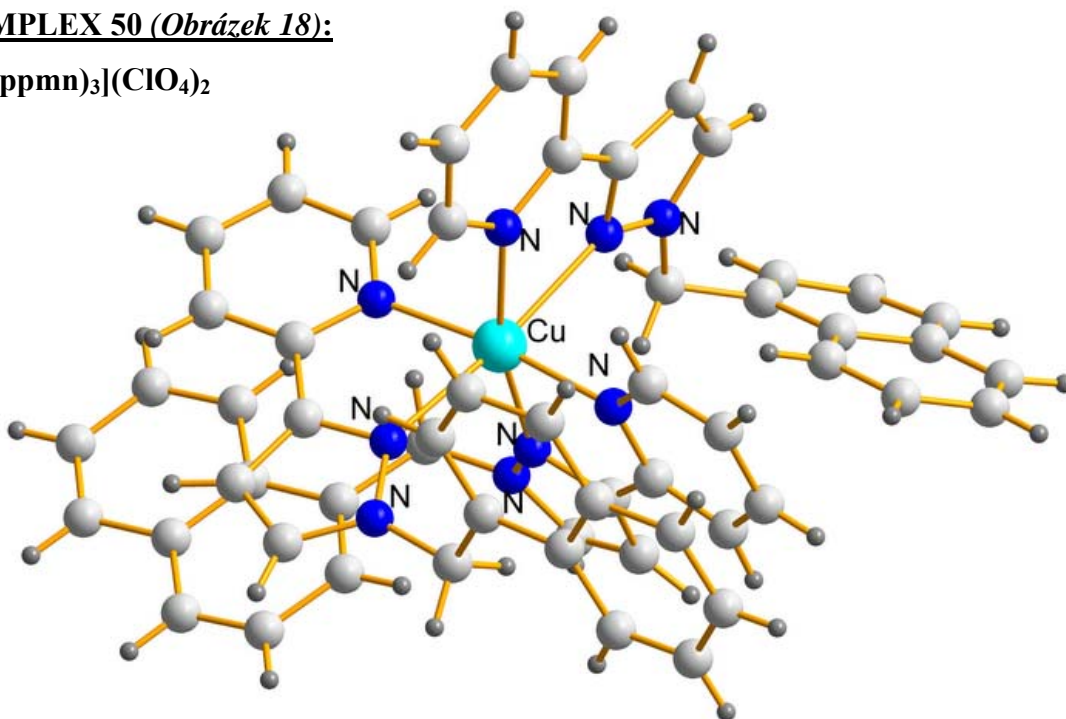
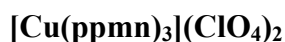
Methanolický roztok připravený z Cu(NO₃)₂·3H₂O a ligandu ATICAR (molární poměr 1:2, kov:ligand), jehož pH bylo přidavkem dvoumolárního octanu sodného upraveno na hodnotu 7, byl ponechán 2 hodiny pod zpětným chladičem. Přes noc byl roztok uložen do chladničky. Krystalky zeleně zbarveného komplexu byly získány rekrystalizací v roztoku methanol/voda v poměru 9:1 (v/v).

Komplex **49** byl testován *in vitro* na buněčnou linii **B16F10** (myší melanom). Na základě provedených měření a získaných hodnot IC₅₀ (**Tabulka 16**) vyplývá, že komplex vykazuje proti buňkám myšího melanomu vyšší účinnost než samotný ligand. Jako možný princip protinádorového mechanismu je uváděna jednoduchá redukce intracelulární mědi a její následná interakce s buněčnými thioley.[27]

Tabulka 16. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex 49.

	IC ₅₀ (μM)
Sloučenina	B16F10
ATICAR	50
49 [Cu(ATICAR) ₂ (H ₂ O)]·2H ₂ O	15

KOMPLEX 50 (Obrázek 18):



Obrázek 18. Molekulová struktura komplexu 50.

Příprava komplexu 50:

Komplex byl připraven reakcí 0,1 mmol ligandu s 0,1 mmol Cu(ClO₄)₂·6H₂O v methanolu (10 ml). Po několika minutách byla vzniklá zelená pevná látka odfiltrována. Matečný roztok byl několik dní ponechán pomalu se odpařovat za vzniku zelených krystalů.

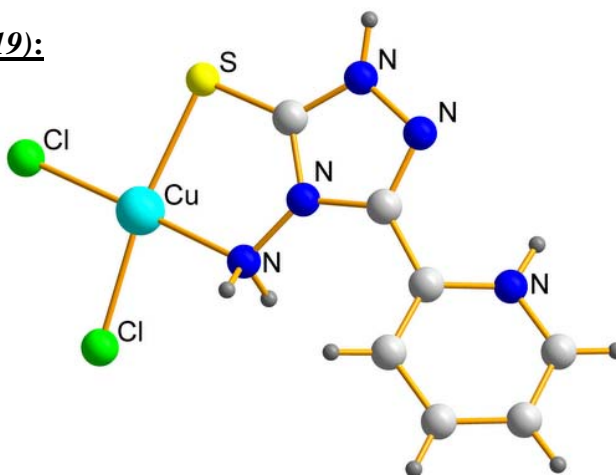
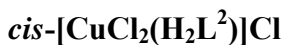
Komplex 50 byl testován *in vitro* na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích HL-60 (lidské leukemické buňky), BGC-823 (lidské buňky rakoviny žaludku), MDA-MB-435 (lidské buňky rakoviny prsu). Na základě naměřené schopnosti inhibice buněk (Tabulka 17), vyplývá, že tento komplex vykazuje proti všem třem nádorovým buněčným liniím vysokou

cytotoxicitu (koncentrace komplexu = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Z tohoto hlediska je vhodným kandidátem pro navržení nových silných léků proti rakovině. Samotný ligand je prakticky neúčinný.[28]

Tabulka 17. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex 50.

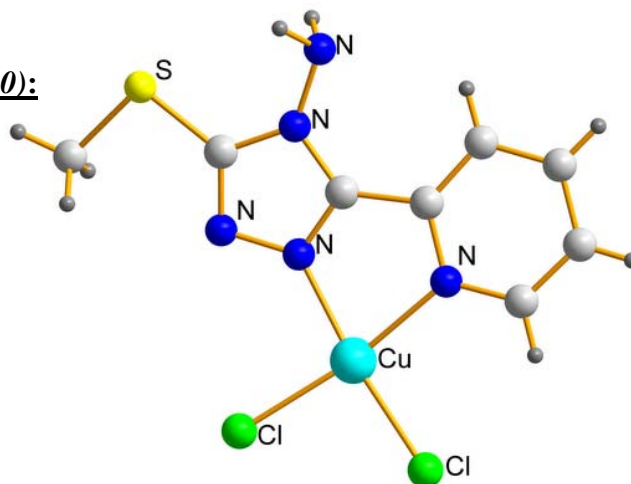
Sloučenina	Schopnost inhibovat buňky (%)		
	HL-60	BGC-823	MDA-MB-435
ppmn	- 5,42	6,62	2,99
50 $[\text{Cu}(\text{ppmn})_3](\text{ClO}_4)_2$	96,2	97,24	94,88

KOMPLEX 51 (Obrázek 19):



Obrázek 19. Molekulová struktura komplexu 51.

KOMPLEX 52 (Obrázek 20):



Obrázek 20. Molekulová struktura komplexu 52.

Příprava komplexu 51:

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,76 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml roztoku připraveném z koncentrované HCl a vody (1:1 v/v). Poté byl k tomuto roztoku přidán ligand HL^2 (1,76 mmol), také rozpuštěný v 5 ml stejné směsi HCl a vody. Směs byla ponechána 2 hodiny pod zpětným chladičem při pokojové teplotě. Z roztoku se vysrážel zelený produkt, který byl následně odfiltrován a vysušen při 110 °C.

Příprava komplexu 52:

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,833 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml roztoku připraveném z koncentrované HCl a vody (1:1 v/v). Poté byl k tomuto roztoku přidán ligand amtpt (1,76 mmol), také rozpuštěný v 5 ml stejné směsi HCl a vody. Čirý zelený roztok byl ponechán 2 hodiny pod zpětným chladičem při pokojové teplotě. Po týdnu byl z tohoto roztoku odfiltrován krystalický produkt.

Komplexy **51-52** byly testovány *in vitro* na buněčné linie **HT1080** (buňky fibrosarkomu) a **HF** (buňky lidského fibroblastu). Na základě provedených měření a získaných hodnot IC_{50} (**Tabulka 18**) vyplývá, že komplex **51** vykazuje proti oběma buněčným liniím několikanásobně vyšší účinnost (srovnatelná s cisplatinou) než komplex **52**. U obou komplexů je z hlediska jejich vysoké protinádorové aktivity vhodné bližší studium principu jejich účinku.[29]

Tabulka 18. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplexy **51** a **52**.

Sloučenina	IC_{50} (μM)	
	HT1080	HF
51 <i>cis</i> - $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{L}^2)]\text{Cl}$	12,61	54,15
52 <i>cis</i> - $[\text{CuCl}_2(\text{amtpt})]$	60,66	114,19

KOMPLEX 53 (Schéma 43):

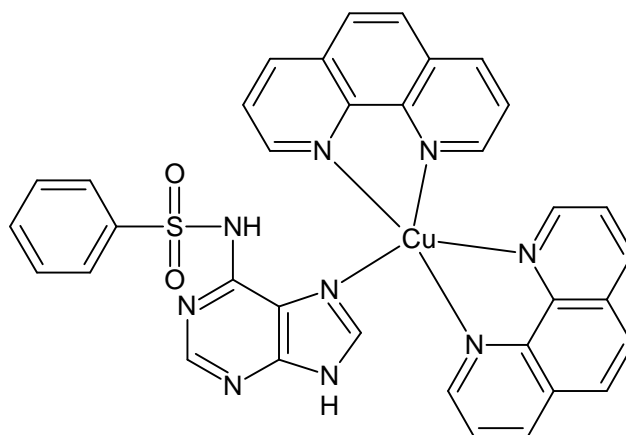


Schéma 43. Strukturální vzorec komplexu 53.

Příprava komplexu 53:

Směs připravená z 0,25 mmol CuSO₄·5H₂O, 0,25 mmol o-fenanthrolinu (phen) a 10 ml methanolu byla po kapkách přidávána ke 30 ml methanolickeho roztoku, který obsahoval 0,25 mmol ligandu H₂N9-ABS a 1 ml jednomolárního vodného roztoku NaOH. Vytvořená zelená sraženina byla odfiltrována a matečný roztok byl ponechán stát 2 měsíce při pokojové teplotě. Po této době došlo k vytvoření zelených krystalů, vhodných pro rentgenovou strukturální analýzu.

Komplex **53** byl testován *in vitro* na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích **Caco-2** (střevní adenokarcinom) a **Jurkat T** (lidská leukémie). Na základě provedených měření a získaných hodnot IC₅₀ (**Tabulka 19**) vyplývá, že komplex vykazuje proti oběma buněčným liniím (zejména pak proti leukemickým buňkám) vysokou účinnost.[30]

Tabulka 19. Výsledky testování protinádorové aktivity pro komplex 53.

	IC ₅₀ (μM) (24 hodin)	
Sloučenina	Caco-2	Jurkat T
53 [Cu(N9-ABS)(phen) ₂] ₂ ·3,6H ₂ O	6,47	3,51

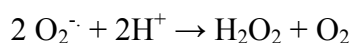
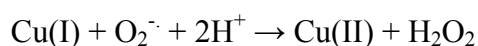
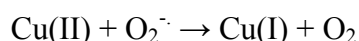
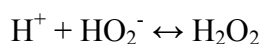
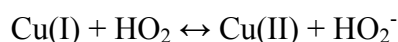
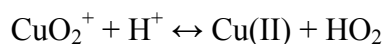
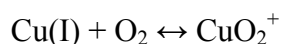
2.3.2. Antioxidační a protizánětlivá aktivita

Při některých metabolických dějích dochází v lidském těle k tvorbě vysoce reaktivních látek, jakými jsou superoxid $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál HO^{\cdot} a peroxid vodíku H_2O_2 . Souhrnně je označujeme jako reaktivní kyslíkaté radikály (ROS). Tyto radikály jsou v organismech odpovědné za vznik patologických procesů jako je poškození tkáně, zánět, stárnutí, rakovina, kardiovaskulární, plicní a neurodegenerativní onemocnění. Akumulací těchto aktivních radikálů jsou poškozována vlákna DNA a lipidové membrány a také inaktivovány některé enzymy.

Obranný systém organismu je založen na enzymatických a neenzymatických antioxidantech, které mohou minimalizovat již zmíněný škodlivý účinek volných kyslíkatých radikálů. Mezi důležité antioxidační enzymy patří např. superoxid dismutáza (SOD), kataláza a peroxidáza. Úkolem Cu/Zn-SOD je ochrana buňky před oxidativním poškozením a záněty prostřednictvím katalytické dismutace superoxidových radikálů za vzniku molekul kyslíku a peroxidu vodíku. Snížená hladina Cu/Zn-SOD uvnitř buněk vede k jejich poškození. Léčba takto narušených buněk pomocí SOD dodávané z vnějška není možná a to z důvodu neprůchodnosti SOD přes buněčnou membránu.

Na principu antioxidačního odstraňování reaktivních kyslíkatých radikálů odpovědných mimo jiné za zánětlivé procesy v organismech je založen terapeutický účinek některých měďnatých komplexů. Objev léčivých účinků nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAID), jejíž základem byla měď, vedl k vývoji velkého množství těchto měďnatých komplexů (Cu-NSAID) majících zvýšenou protizánětlivou aktivitou a sníženou gastrointestinální toxicitu (ve srovnání s nekomplexním léčivem). Tato nízkotoxická léčiva obsahující měď se prozatím na trhu s léčivy nenachází, ale je o ně obrovský zájem, protože nyní používané protizánětlivé léky, včetně NSAID, se projevují nežádoucími účinky na ledviny, gastrointestinální trakt a kardiovaskulární soustavu. Ovšem ještě není objasněno, zdali Cu-NSAID neovlivňují metabolismus mědi a také je nejasný rozdíl mezi účinkem monomerních a dimerních měďnatých komplexů.[31]

Klíčová role mědi při minimalizaci zánětu je přisuzována jejím redoxním vlastnostem (podobně jako u SOD) a tedy schopností odstraňovat vysoce reaktivní volné radikály způsobující zánět:



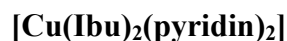
Škodlivé účinky H_2O_2 jsou minimalizovány jeho přeměnou na vodu enzymem katalázou nebo glutathion-peroxidázou. Peroxid vodíku není radikálem, ale je schopen na rozdíl od O_2^- procházet buněčnou membránou a produkovat OH^\bullet radikály (silné oxidanty) uvnitř buňky.

Jako příklad Cu-NSAID komplexů s protizánětlivou aktivitou lze uvést:



L_2 = benzimidazol, 2-methylbenzimidazol, imidazol, 1-methylimidazol, 1,2-dimethylimidazol, pyridin, diethylamin, nikotinamid,...

Asp = 2-acetylsalicylová kyselina (Aspirin)

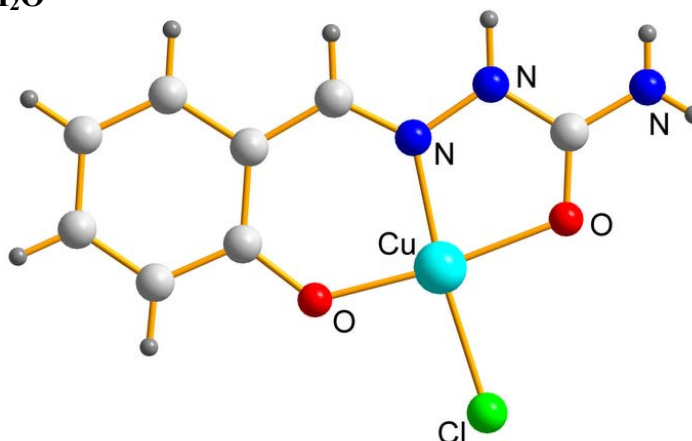


Ibu = (+)- α -methyl-4-(isopropylmethyl)benzoová kyselina (Ibuprofen)



Následujících 10 vybraných komplexů patří mezi látky s antioxidačními popřípadě protizánětlivými účinky. Všechny komplexy byly podrobeny různým metodám testování, ať již za podmínek *in vivo* nebo také *in vitro*. Princip použitých metod bude zjednodušeně vysvětlen.

KOMPLEX 54 (Obrázek 21):



Obrázek 21. Molekulová struktura komplexu 54.

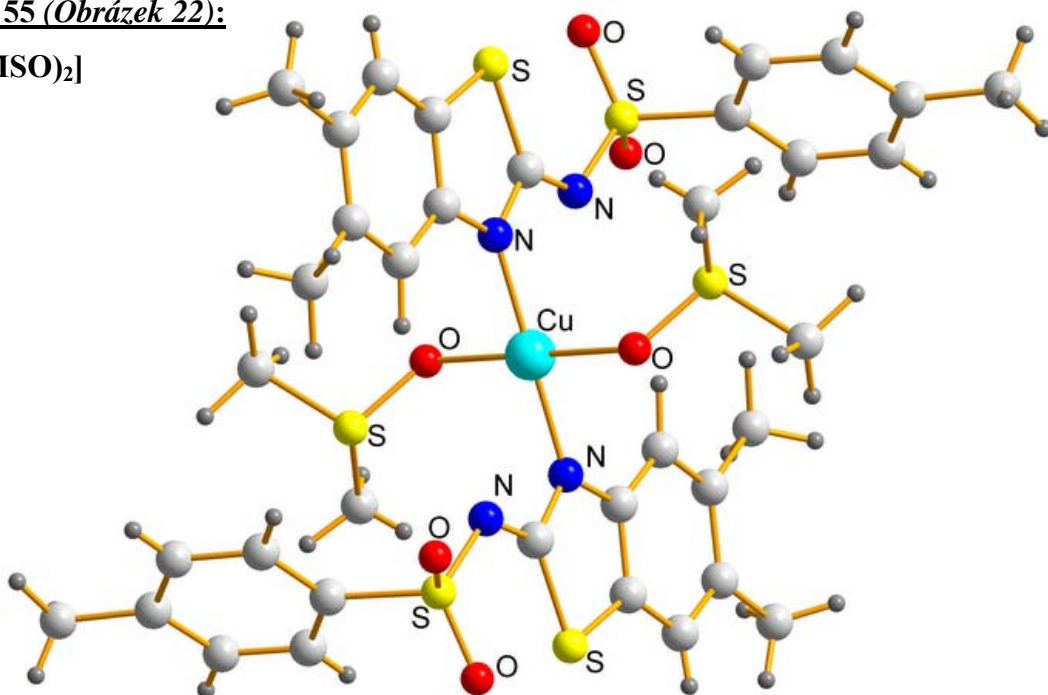
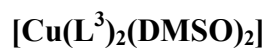
Příprava komplexu 54:

Vodný roztok CuCl₂·3H₂O (0,001 mol) byl smíchán s ethanolickým roztokem SALSC (0,001 mol) a za stálého míchání byl ponechán pod zpětným chladičem na vodní lázni 2 hodiny. Vzniklý tmavě zelený produkt byl poté rozpuštěn v roztoku ethanol/voda (60:40 v/v) a nechán pomalým odpařováním vykristalizovat.

SOD aktivita komplexu **54** byla stanovena spektrofotometricky za pomoci barviva NBT (tetrazoliová modř), které sloužilo jako zdroj superoxidových radikálů. Jednotka SOD aktivity byla definována jako koncentrace testované látky potřebné pro 50-procentní inhibici těchto superoxidových radikálů. Hodnota **IC₅₀** pro tento komplex činila **0,3 mM**.

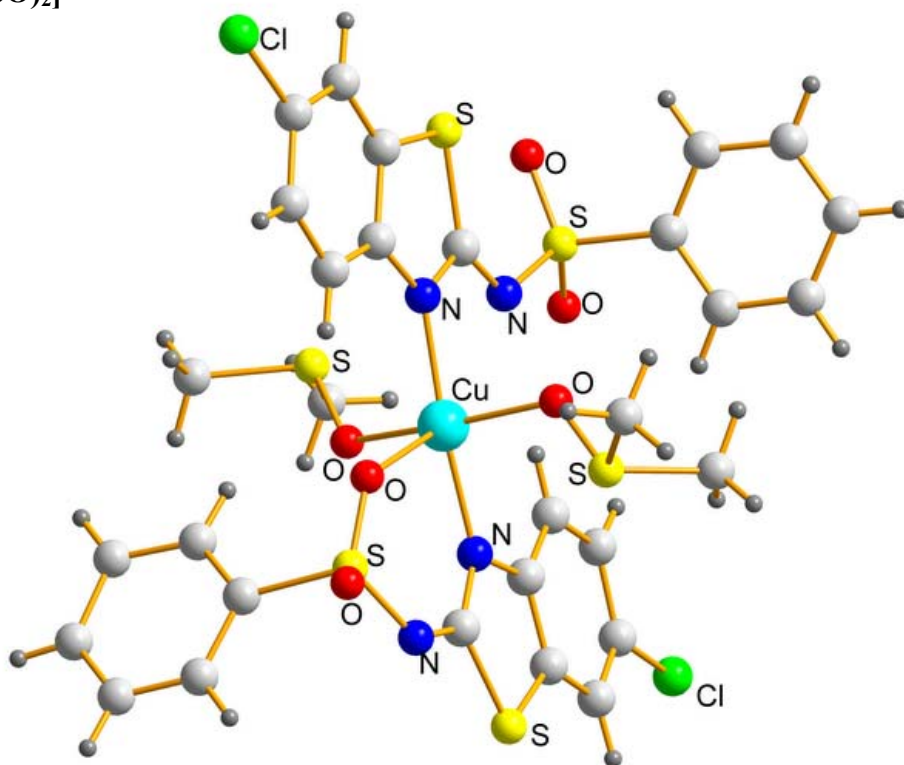
Při testování bylo zjištěno, že přidavek pyridinu k tomuto měďnatému komplexu způsobí vzrůst SOD aktivity z 26 % na 44 %. Přidáním N-methyl imidazolu dojde dokonce ke vzrůstu aktivity až na 67 %.[33]

KOMPLEX 55 (Obrázek 22):



Obrázek 22. Molekulová struktura komplexu 55.

KOMPLEX 56 (Obrázek 23):



Obrázek 23. Molekulová struktura komplexu 56.

Příprava komplexů 55 a 56:

Čerstvě připravený $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (1 mmol) byl přidán k roztoku, který byl připraven z ligandu HL^3 (respektive HL^4) (1 mmol) a 60 ml směsi methanol/DMSO (1:5 v/v). Výsledná směs byla míchána asi 1 hodinu při 40 °C. Po ochlazení byla směs zfiltrována z důvodu odstranění nezreagovaného $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Pomalým odpařováním filtrátu při pokojové teplotě po několik dní došlo k vytvoření krystalů.

Komplexy **55** a **56** byly testovány *in vitro* na SOD aktivitu. Metoda testování byla založena na použití systému xanthin/xanthinoxidáza jako zdroje superoxidových radikálů. Hodnoty IC_{50} obou komplexů jsou přibližně stejné, ovšem vyšší, než je hodnota IC_{50} pro nativní Cu/Zn-SOD (bližší srovnání je uvedeno v **Tabulce 20**).[31]

Tabulka 20. Výsledky antioxidační aktivity pro komplexy **55** a **56**.

Sloučenina	IC_{50} (μM)
55 $[\text{Cu}(\text{L}^3)_2(\text{DMSO})_2]$	0,193
56 $[\text{Cu}(\text{L}^4)_2(\text{DMSO})_2]$	0,188
Cu/Zn-SOD	0,006

KOMPLEX 57 (Schéma 44):

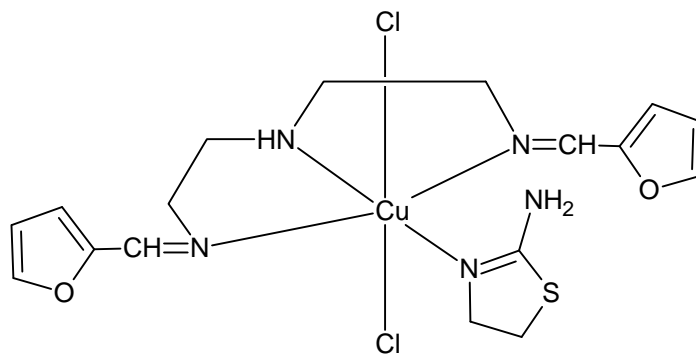
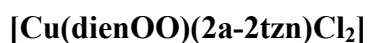


Schéma 44. Strukturní vzorec komplexu **57**.

KOMPLEX 58 (Schéma 45):

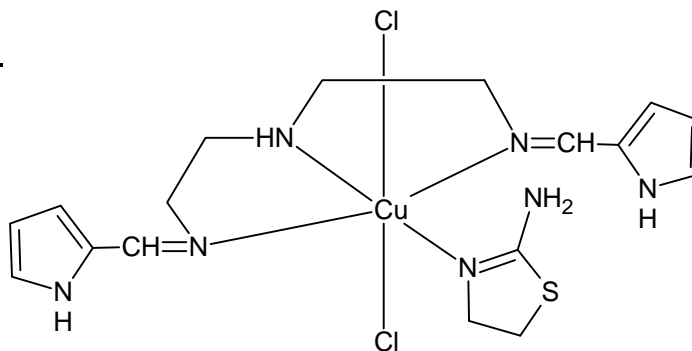


Schéma 45. Strukturní vzorec komplexu 58.

Příprava komplexů 57 a 58:

10 mmol 2-furaldehydu (respektive pyrrol-2-karboxaldehydu) bylo smícháno v ledové lázni s 5 mmol diethylentriaminu. Vzniklý roztok Schiffovy báze byl zředěn 20 ml methanolu. Poté bylo po dobu 30 minut přidáváno 10 ml methanolického roztoku CuCl₂·2H₂O (5 mmol). Nakonec bylo pomalu přidáno 10 ml methanolického roztoku 2a-2tzn (5 mmol). Pevný produkt byl odfiltrován, několikrát promyt diethyletherem a sušen při pokojové teplotě.

Protizánětlivá aktivita obou komplexů byla testována na skupině potkanů, kterým byla do pravé tlapky současně vpíchnuta dávka testovaného komplexu (0,01 mmol na kilogram tělesné hmotnosti) a karageninu (zánětlivý činitel). Levá tlapka sloužila jako srovnávací. Na základě rozdílu hmotnosti obou tlapek byla pro každý komplex určena hodnota inhibice otoků v procentech (CPE). Přesné hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 21**. Jako referenční lék pro porovnání účinnosti testovaných komplexů byl použit indometacin (nesteroidní protizánětlivá látka, využívaná při léčbě širokého spektra zánětlivých onemocnění). Komplex **57** vykazoval vynikající protizánětlivý účinek ve spojení s mírnou toxicitou. Z těchto důvodů je vhodným kandidátem pro další výzkum.[34]

Tabulka 21. Výsledky protizánětlivé aktivity pro komplexy 57 a 58.

Sloučenina	CPE (%)
57 [Cu(dienOO)(2a-2tzn)Cl ₂]	55,8
58 [Cu(dienNN)(2a-2tzn)Cl ₂]	38,5
Indometacin	47,0

KOMPLEX 59:



Strukturní vzorec ligandu Me_5dien je zobrazen ve *Schématu 46*.

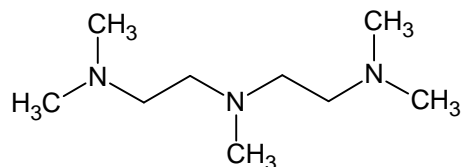
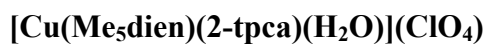


Schéma 46. Strukturní vzorec ligandu Me_5dien .

KOMPLEX 60:



Strukturní vzorec ligandu 2-tpca je zobrazen ve *Schématu 47*.

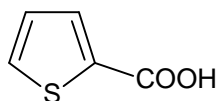
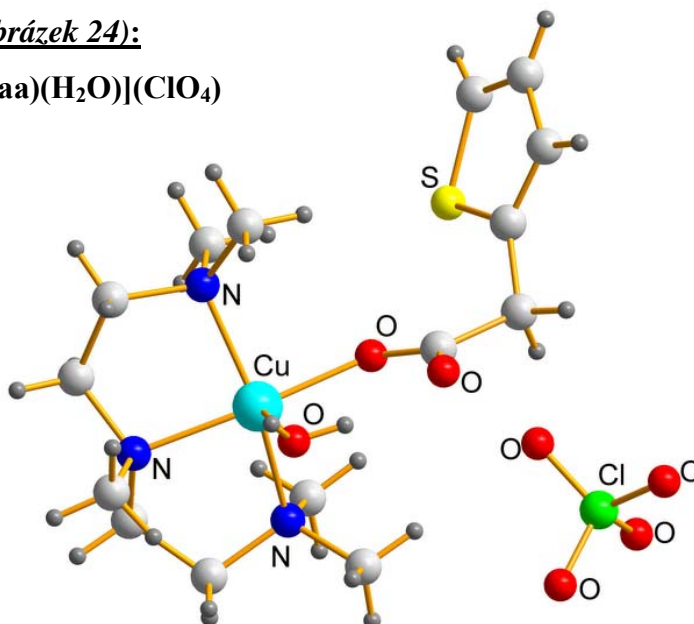
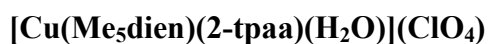


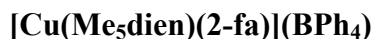
Schéma 47. Strukturní vzorec ligandu 2-tpca.

KOMPLEX 61 (Obrázek 24):



Obrázek 24. Molekulová struktura komplexu 61.

KOMPLEX 62:



Strukturní vzorec ligandu 2-fa je zobrazen ve *Schématu 48*.

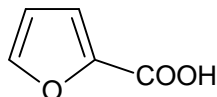


Schéma 48. Strukturní vzorec ligandu 2-fa.

KOMPLEX 63:



Strukturní vzorec ligandu pa je zobrazen ve *Schématu 49*.

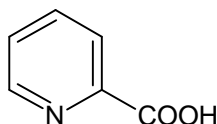


Schéma 49. Strukturní vzorec ligandu pa.

Příprava komplexu 59:

Komplex byl připraven reakcí Me_5dienu (5 mmol) s $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol) v methanolu.

Příprava komplexu 60:

Vodný roztok NaOH (2 mmol) byl za intenzivního míchání přidán k roztoku, který byl připraven rozpuštěním thiofen-2-karboxylové kyseliny (5 mmol) v 10 ml methanolu. Tento roztok sodné soli thiofen-2-karboxylové kyseliny byl pomalým přidáváním smíchán s tmavěmodrým roztokem komplexu **59** (5 mmol rozpuštěných v roztoku H_2O /methanol v poměru 1:10 v/v). Poté bylo přidáno 10 ml diethyletheru a roztok byl ponechán při nízké teplotě (5 °C). Po týdnu byly vzniklé modré krystalky odfiltrovány, promyty diethyletherem a vysušeny při pokojové teplotě.

Příprava komplexu 61:

Vodný roztok NaOH (2 mmol) byl za intenzivního míchání přidán k roztoku, který byl připraven rozpuštěním thiofen-2-octové kyseliny (5 mmol) v 10 ml methanolu. Ke vzniklému

roztoku byl po kapkách přidáván tmavěmodrý roztok komplexu **59** (5 mmol rozpuštěných v roztoku H₂O/methanol v poměru 1:10 v/v). Připravený roztok byl ponechán při teplotě 5 °C. Po 24 hodinách stání byly vzniklé modré krystalky odfiltrovány, promyty diethyletherem a vysušeny při pokojové teplotě.

Příprava komplexu 62:

Vodný roztok NaOH (2 mmol) byl za intenzivního míchání přidán k roztoku, který byl připraven rozpuštěním furan-2-karboxylové kyseliny (5 mmol) v 10 ml methanolu. Ke vzniklému roztoku byl pomale přidáván roztok komplexu **59** (5 mmol rozpuštěných v roztoku H₂O/methanol v poměru 1:10 v/v). K připravenému roztoku bylo po malých dávkách přidáno 5 mmol tetrafenylborátu sodného (za intenzivního míchání po dobu 1 hodiny). Vyloučené modré krystalky byly odfiltrovány, promyty diethyletherem a vysušeny při pokojové teplotě.

Příprava komplexu 63:

Vodný roztok NaOH (2 mmol) byl za intenzivního míchání přidán k roztoku, který byl připraven rozpuštěním pyridin-2-karboxylové kyseliny (5 mmol) v 10 ml methanolu. Ke vzniklému roztoku byl přidán roztok komplexu **59** (5 mmol rozpuštěných v roztoku H₂O/methanol v poměru 1:10 v/v). Připravený roztok byl ponechán při teplotě 5 °C. Po 24 hodinách stání byly vzniklé modré krystalky odfiltrovány, promyty diethyletherem a vysušeny při pokojové teplotě.

Komplexy **59-63** byly podrobeny *in vitro* studii schopnosti redukovat aktivitu stabilního radikálu 1,1-difenyl-pikrylhydrazylu (DPPH). Tento test se používá pro stanovení antioxidační aktivity v kratším čase, než je tomu u jiných metod. V **Tabulce 22** jsou uvedeny hodnoty pro interakci testované látky s DPPH (RA % - jedná se o konstantní hodnoty naměřené po 60 minutách). Pro srovnání jsou zde uvedeny také hodnoty pro standardy NDGA (4,4'-(2,3-dimethylbutan-1,4-diyl)dibenzen-1,2-diol) a BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylfenol). Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval komplex **59**, jehož aktivita je ovšem ve srovnání s aktivitou standardů nízká.[35]

Tabulka 22. *Výsledky antioxidační aktivity pro komplexy 59-63.*

Sloučenina	RA (%)
59 [Cu(Me ₅ dien)(ClO ₄) ₂]	23
60 [Cu(Me ₅ dien)(2-tpca)(H ₂ O)](ClO ₄)	7,8
61 [Cu(Me ₅ dien)(2-tpaa)(H ₂ O)](ClO ₄)	10
62 [Cu(Me ₅ dien)(2-fa)](BPh ₄)	18
63 [Cu(Me ₅ dien)(pa)](ClO ₄)	n
NDGA	82,6
BHT	60

n – neaktivní

2.3.3. Antidiabetická aktivita

Diabetes mellitus je onemocnění, pro které je charakteristická chronická hyperglykémie způsobená nedostatkem hormonu inzulínu, jehož úkolem je regulovat hladinu glukózy v krvi. Nedostatek tohoto hormonu vede k mnoha abnormalitám v metabolismu sacharidů, proteinů i lipidů. Příčiny vzniku diabetu jsou různé. Roli hrají jak genetické dispozice, tak také environmentální faktory. Nedostatečná produkce inzulínu může být způsobena sníženým počtem nebo narušenou funkcí pankreatických β -buněk, které tento hormon produkují. Podle klasifikace WHO se toto onemocnění dělí na diabetes I. a II. typu. Diabetes I. typu vzniká následkem selektivní destrukce β -buněk vlastním imunitním systémem a obvykle vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. Nezbytností tedy je dodávat inzulín do těla zvenčí, nejčastěji injekčně. Většina nemocných trpí diabetem II. typu, který je způsobený relativním nedostatkem inzulínu. To znamená, že pankreas nemocných produkuje nadbytek inzulínu, ale tělo je proti němu rezistentní. Tento typ nemoci postihuje v 80 % případů lidi s obezitou. Obvykle se léčí perorálním podáváním antidiabetik, která zvyšují citlivost těla k inzulínu.[36]

Podle odhadu nejnovějších studií tvoří oba typy diabetu 5,4 % z celkového počtu onemocnění. V roce 2025 se celosvětový počet pacientů s tímto onemocněním má zvýšit dokonce až na 300 milionů. Značné komplikace přináší onemocnění diabetikům I. typu. Tito pacienti jsou závislí na každodenních inzulínových injekcích, které představují jak fyzickou, tak také duševní zátěž. Nemluvě o zdravotních komplikacích, které diabetes doprovází. Nemoc značně poškozuje srdce, oči, ledviny, cévy, nervy, dásně, zuby, nohy a podobně. Z tohoto důvodu se výzkumné týmy zabývají vývojem léčiv, které by nahradily bolestivé inzulínové injekce. Od roku 1980 se mnoho výzkumů pokouší o vytvoření alternativních antidiabetických látek, jejichž součástí jsou ionty mědi, popřípadě ionty jiných přechodných kovů. Tyto sloučeniny vykazují *in vitro* inzulínomimetickou aktivitu a *in vivo* antidiabetickou aktivitu. Například v této práci prezentovaný komplex mědi a pikolinátu (pyridin-2-karboxylátu) napodobuje *in vitro* působení inzulínu a *in vivo* vykazuje vysoce nadějný hypoglykemický účinek.[37]

Pro bližší představení problematiky antidiabetické aktivity některých měďnatých sloučenin je vybráno následujících 7 komplexů, včetně bližšího popisu metodiky jejich testování. Mezi vybrané komplexy je výjimečně zařazeno také několik dvojjaderných měďnatých komplexů, které by právě díky své účinnosti mohly nalézt uplatnění v prevenci a léčbě diabetu. Většina prezentovaných komplexů se vyznačuje velmi dobrou schopností chránit β -buňky slinivky břišní před vysoce reaktivními volnými radikály. Tyto radikály jsou odpovědné za destrukci pankreatických β -buněk. To má za následek narušení tvorby inzulínu a tedy také zvýšení hladiny glukózy v krvi. Na základě testů provedených *in vivo* na skupině myši lze usoudit, že se jedná o sloučeniny s vysokou šancí pro praktické využití. Proto si tyto komplexy zaslouží podrobnější vědecké studium.

KOMPLEX 64 (Schéma 50):

[Cu(pa)₂]

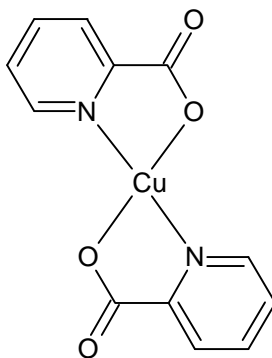


Schéma 50. Strukturní vzorec komplexu 64.

Příprava komplexu 64:

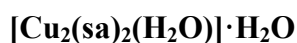
Vodný roztok síranu měďnatého (2 mmol) byl přidán k vodnému roztoku kyseliny pikolinové (4 mmol) obsahující Ba(OH)₂·8H₂O (2 mmol). Směs byla míchána 3 hodiny při pokojové teplotě. Vysrážený síran barnatý byl odfiltrován, rozpouštědlo odpařeno a získaná sraženina promyta malým množstvím teplé vody.

Inzulinomimetická aktivita komplexu **64** byla stanovena jednoduchým způsobem založeným na schopnosti látky inhibovat volné mastné kyseliny. Účinek komplexu byl porovnáván vzhledem ke standardu, kterým v tomto případě byl komplex [VO(pa)₂] (bis(pikolinato)-oxovanadičitý komplex). **Hodnota IC₅₀** pro standard činí **0,42 mM**, zatímco

měďnatý komplex s hodnotou **0,33 mM** je ještě účinnější. Tento komplex vykazující poměrně vysokou inzulinomimetickou aktivitu byl podroben cytotoxickému testování, ve kterém bylo zjištěno, že je proti zdravým buňkám velmi málo toxický (**hodnota LD₅₀** se pohybovala v rozmezí **0 až 0,4 mM**). *In vivo* hypoglykemický účinek byl testován na myších s diabetem typu I. Komplexy **[VO(pa)₂]** i **[Cu(pa)₂]** měly již při prvním podání obdobný hypoglykemický účinek. Ovšem hypoglykemický účinek měďnatého komplexu byl výrazně rychlejší a přetrvával po delší dobu (24 hodin).

Z těchto všech hledisek (cytotoxicity, inzulinomimetické a hypoglykemické aktivity) lze komplex **64** považovat za vysoce účinnou a potencionálně vhodnou látku k vytvoření nových antidiabetických léčiv.[37]

KOMPLEX 65 (Obrázek 25):



Strukturní vzorec ligandu sa je zobrazen ve *Schématu 51*.

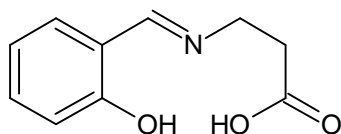
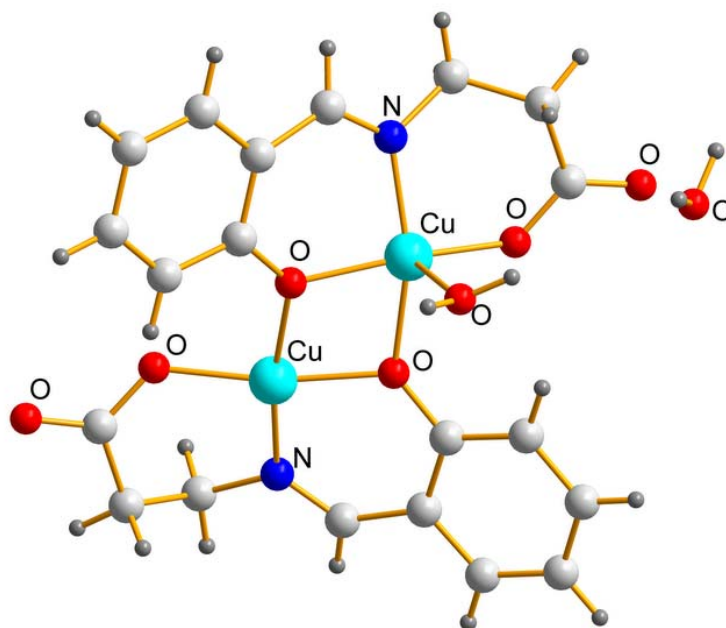
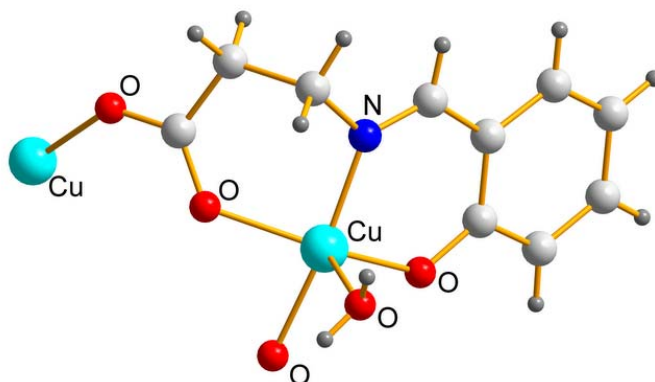


Schéma 51. Strukturní vzorec ligandu sa.



Obrázek 25. Molekulová struktura komplexu 65.

KOMPLEX 66 (Obrázek 26):



Obrázek 26. Molekulová struktura komplexu 66.

Příprava komplexu 65:

Ve 100 ml horké vody bylo za současného míchání rozpuštěno 0,08 mol β -alaninu a 0,08 mol $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Poté byl opět za současného míchání přidán roztok salicylaldehydu, připravený rozpuštěním 0,08 mol salicylaldehydu v 80 ml ethanolu. Vzniklý tmavě zelený roztok byl po dobu 1 hodiny míchán při teplotě 60 °C. Poté byl roztok ochlazen na pokojovou teplotu. Po jednom dni se vytvořily tmavě zelené krystaly, které byly následně odfiltrovány, promyty malým množstvím ethanolu a vysušeny na vzduchu.

Příprava komplexu 66:

V 50 ml horké vody bylo za současného míchání rozpuštěno 0,04 mol β -alaninu a 0,04 mol $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Poté byl opět za současného míchání přidán roztok salicylaldehydu připravený rozpuštěním 0,04 mol salicylaldehydu ve 20 ml ethanolu. Vzniklý tmavězelený roztok byl po dobu 1 hodiny míchán při teplotě 80 °C. Poté byl roztok ochlazen na pokojovou teplotu. Po jednom dni se vytvořily tmavězelené krystaly, které byly následně odfiltrovány.

Antidiabetický účinek komplexů **65** a **66** byl stanoven screeningovou metodou, při které byla za použití alloxanu vyvolána v těle myši hyperglykémie napodobující pozdní fázi *diabetes mellitus* typu I. Alloxan je toxickým analogem glukózy, který selektivně ničí pankreatické β -buňky produkující inzulín. Tímto způsobem u hlodavců vyvolaný diabetes (nazývaný též „alloxanový diabetes“) je vysoce podobný lidskému diabetu I. typu.

Hladina glukózy v krvi byla stanovována u léčené skupiny myši a u kontrolní skupiny (neléčené myši) během prvních pěti dnů po aplikaci cytotoxické dávky alloxanu. Skupině léčených myši byla po dávce alloxanu aplikována také dávka antidiabetické látky, která inaktivuje volné radikály způsobené alloxanem a udržuje stálou hladinu glukózy v krvi. Léčené myši byly rozděleny na 3 různé skupiny podle typu aplikovaného léčiva. Jako antidiabetické léčivo byly použity komplexy **65** a **66**. Jako standard látka TROLOX® (ve vodě rozpustný analog vitamínu E). Výsledky *in vivo* testování (**Tabulka 23**) ve značné míře odpovídaly výsledkům získaným *in vitro* testy, což se shoduje s navrhovaným mechanismem účinku alloxanu (při jeho působení v organismu hlodavců vznikají volné radikály).

U obou komplexů (**65** i **66**) byla prokázána významná antioxidační a antidiabetická aktivita. Tyto výsledky poukazují na možnost vytvoření biologicky aktivních potravinových doplňků, jako prevence před nemocemi způsobenými oxidačním stresem, kam se řadí také již zmiňovaný *diabetes mellitus*. [38]

Tabulka 23. Hodnoty hladiny glukózy v krvi myši po aplikaci komplexů **65** a **66**.

Sloučenina	Hladina glukózy v krvi (mM)				
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den
65 [Cu ₂ (sa) ₂ (H ₂ O)]·H ₂ O	5,50	6,10	6,80	7,40	6,50
66 [Cu(sa)(H ₂ O)] _n	8,04	6,80	8,40	8,90	8,10
TROLOX®	6,20	8,80	10,20	11,00	10,20
Kontrolní skupina myši	7,85	29,40	31,28	30,60	32,46

Alloxan – 1,3-diazinan-2,4,5,6-tetron (**Schéma 52**)

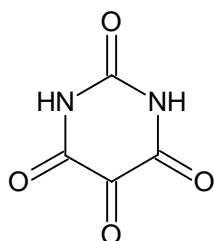


Schéma 52. Strukturní vzorec alloxanu.

TROLOX® – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromen-2-karboxylová kyselina (**Schéma 53**)

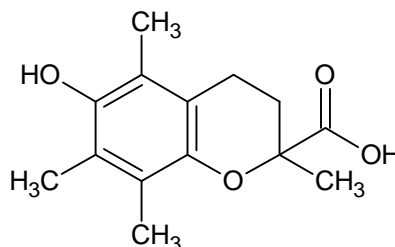


Schéma 53. Strukturní vzorec Troloxu.

KOMPLEX 67 (Schéma 54):

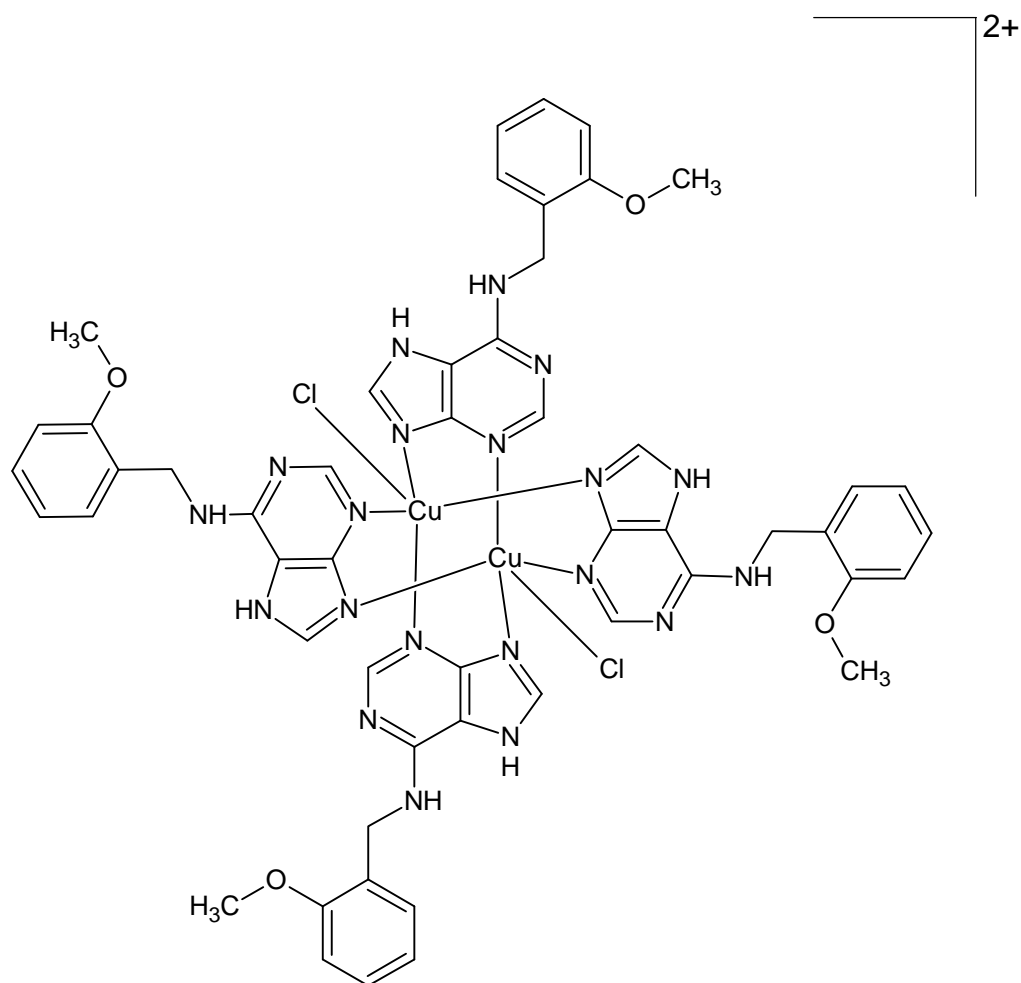
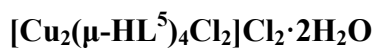
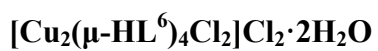


Schéma 54. Strukturní vzorec komplexu 67.

KOMPLEX 68:



Strukturní vzorec ligandu HL^6 je zobrazen ve *Schématu 55*.

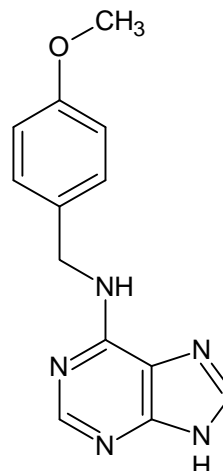


Schéma 55. Strukturní vzorec ligandu HL^6 .

KOMPLEX 69:

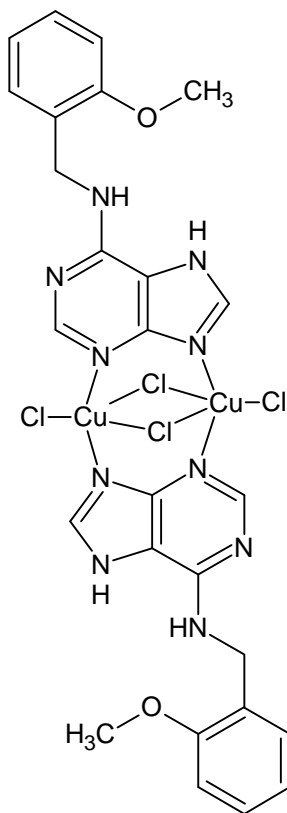
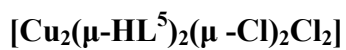
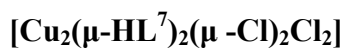


Schéma 56. Strukturní vzorec komplexu 69.

KOMPLEX 70:



Strukturní vzorec ligandu HL^7 je zobrazen ve *Schématu 57*.

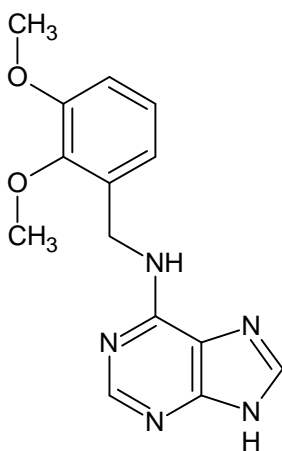


Schéma 57. Strukturní vzorec ligandu HL^7 .

Příprava komplexů 67 a 68:

2 mmol 2-methoxy-6-(benzylamino)purinu (komplex 67), popřípadě 4-methoxy-6-(benzylamino)purinu (komplex 68) byly suspendovány ve 20 ml HCl o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato suspenze byla přidána k roztoku, který byl připraven rozpuštěním 1 mmol $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 20 ml HCl o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Reakční směs byla míchána po dobu 6 hodin při teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Získaný světle modrý práškový produkt byl z roztoku odfiltrován, promyt malým množstvím HCl ($c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), destilované vody, ethanolu a diethyletheru. Promytý produkt byl vysušen při $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pod infralampou.

Příprava komplexů 69 a 70:

1 mmol 2-methoxy-6-(benzylamino)purinu (komplex 69), popřípadě 2,3-dimethoxy-6-(benzylamino)purinu (komplex 70) byl suspendován v 10 ml ethanolu. Tato suspenze byla za stálého míchání přidána k roztoku, který byl připraven rozpuštěním 1 mmol $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 10 ml ethanolu. Po 6 hodinách míchání a zahřívání ($50 \text{ }^\circ\text{C}$) reakční směsi se vytvořil žluto-zelený prášek. Ten byl odfiltrován, promyt malým množstvím ethanolu a diethyletheru a vysušen při $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pod infralampou.

Komplexy 67-70 byly podrobeny *in vivo* testování. Princip testovací metody je shodný s metodou použitou pro testování komplexů 65 a 66, kdy byl použit alloxan pro vyvolání diabetu u myši. Hodnoty hladiny glukózy v krvi myši, naměřené během pěti dnů, jsou uvedeny v *Tabulce 24*. Z provedených testů vyplývá, že komplexy 68 a 70 velmi dobře chránily pankreatické buňky myši před účinky alloxanu a jeho metabolických produktů, především pak před vysoce reaktivním hydroxylovým radikálem.[39]

Tabulka 24. Hodnoty hladiny glukózy v krvi myši po aplikaci komplexů 67- 70.

Sloučenina	Hladina glukózy v krvi (mM)				
	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den
67 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-HL}^5)_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,7	7,3	16,3	17,3	17,4
68 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-HL}^6)_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,1	7,2	7,4	7,8	8,1
69 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-HL}^5)_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Cl}_2]$	5,2	6,3	7,8	8,9	9,4
70 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-HL}^7)_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Cl}_2]$	4,6	7,4	6,8	7,2	7,7
Kontrolní skupina myši	5,1	8,0	7,7	8,6	9,2

2.3.4. Antimikrobiální aktivita

Je prokázáno, že měď (ať již čistá, ve slutinách nebo různých sloučeninách) vykazuje silný antimikrobiální účinek. To znamená, že je schopna inhibovat růst nebezpečných patogenů jako jsou bakterie, plísně, řasy, houby a viry. Měď je v současné době součástí mnoha různých antimikrobiálních produktů v zemědělství, námořnictví, zdravotnictví a v domácnostech. Je aktivní složkou ústních vod, zubních past a léků. Mechanismus, jakým měď patogeny ničí není přesně znám. Ovšem probíhající studie naznačují, že inaktivace virů je způsobena interakcí mědi s bílkovinnými složkami virového fágu, při které dojde k jeho oxidativnímu zničení. V některých případech může měď inhibovat takovou bílkovinu viru, která je pro něj životně důležitou. Například na HIV-1 proteázu, která je nezbytná pro replikaci viru HIV, se měď naváže a způsobí tak její celkovou inaktivaci.

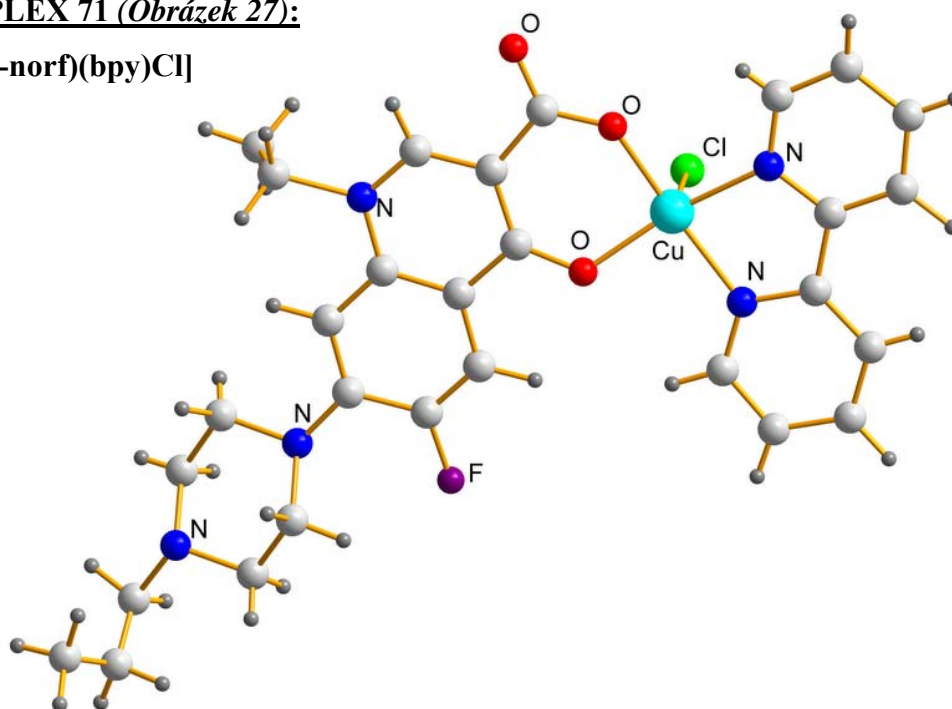
Způsob ničení bakterií (není také přesně znám) bude zřejmě založen na schopnosti iontů mědi narušit osmotickou rovnováhu bakteriální buňky a také způsobit unikání draslíku a glutamátu skrz vnější membránu bakterie.[40]

Z hlediska měďnatých komplexních sloučenin vykazují velmi dobrou antibakteriální a protiplísňovou aktivitu komplexy, jejichž součástí jsou N-donorové heterocyklické ligandy jako 2,2'-bipyridin, 1,10-fenantrolin a 2,2'-dipyridylamin.[41] Jako příklad takovéto sloučeniny lze uvést komplex **71**, který v testech prokázal šestnáctkrát větší aktivitu proti bakteriím *Escherichia coli* (*E. coli*) než běžně používané antibakteriální léčivo Hpr-norfloxacin (předepisováno především při zánětech močových cest).

Pro přiblížení problematiky týkající se antimikrobiálního účinku měďnatých komplexů, jsem na ukázkou vybral následujících 12 sloučenin. Tyto látky byly testovány jak na antibakteriální aktivitu (grampozitivní i gramnegativní bakterie), tak také na protiplísňovou aktivitu (houby, kvasinky).

KOMPLEX 71 (Obrázek 27):

[Cu(pr-norf)(bpy)Cl]



Obrázek 27. Molekulová struktura komplexu 71.

Příprava komplexu 71:

0,4 mmol Hpr-norf bylo rozpuštěno v 10 ml methanolu. K tomuto roztoku bylo přidáno 0,4 mmol CH₃ONa a 15 ml methanolického roztoku, který obsahoval 0,4 mmol CuCl₂·2H₂O. Poté byl přidán ještě roztok připravený rozpuštěním 0,4 mmol bpy v 15 ml methanolu. Reakční směs byla ponechána 1 hodinu pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Objem modrého roztoku byl zredukován asi na 10 ml a ponechán pomalu se odpařovat. Získané modrozelené krystaly odpovídaly požadavkům pro rentgenovou strukturní analýzu.

Komplex **71** byl spolu s ligandy Hpr-norf a bpy testován na antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) a *Pseudomonas aeruginosa*

(*P. aeruginosa*). Schopnost látek inhibovat tyto mikroorganismy byla vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC). Z **Tabulky 25** lze vyčíst, že komplex **71** vykazuje podstatně lepší antimikrobiální aktivitu než volné ligandy Hpr-norf a bpy. Nejvíce aktivní je komplex proti bakteriím rodu *E. coli*. [42]

Tabulka 25. Výsledky testování antimikrobiální aktivity pro komplex **71**.

Sloučenina	Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Hpr-norf	4,0	4,0	16,0
bpy	256,0	256,0	256,0
71 [Cu(pr-norf)(bpy)Cl]	0,25	8,0	8,0

KOMPLEX 72 (Schéma 58):

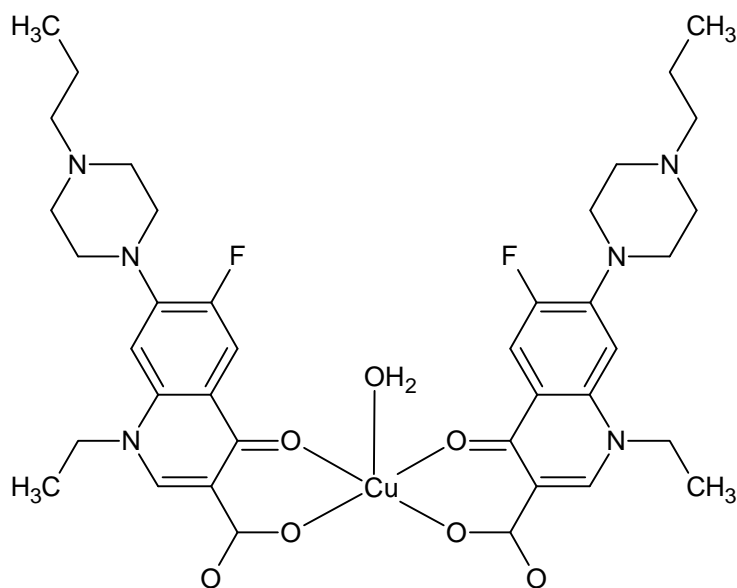


Schéma 58. Strukturní vzorec komplexu **72**.

KOMPLEX 73 (Schéma 59):

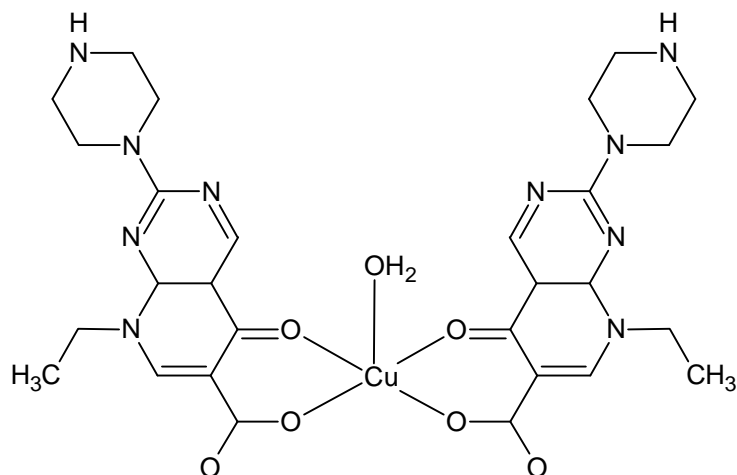
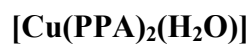


Schéma 59. Strukturní vzorec komplexu 73.

KOMPLEX 74 (Schéma 60):

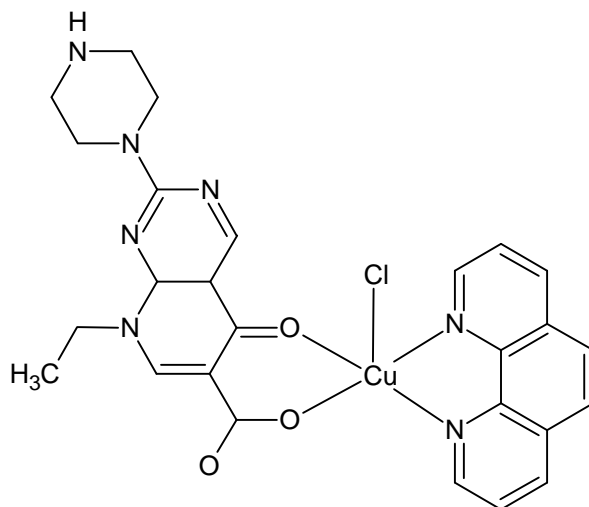


Schéma 60. Strukturní vzorec komplexu 74.

KOMPLEX 75 (Schéma 61):

[Cu(pr-norf)(phen)Cl]

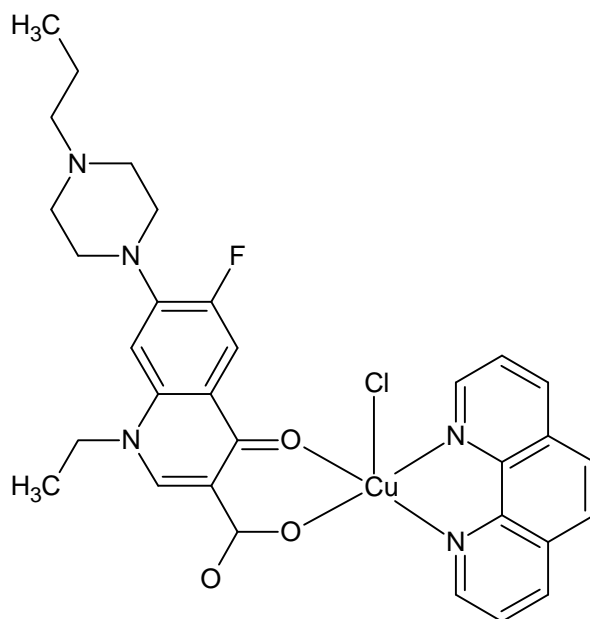


Schéma 61. Strukturní vzorec komplexu 75.

KOMPLEX 76 (Schéma 62):

[Cu(PPA)(bpy)Cl]

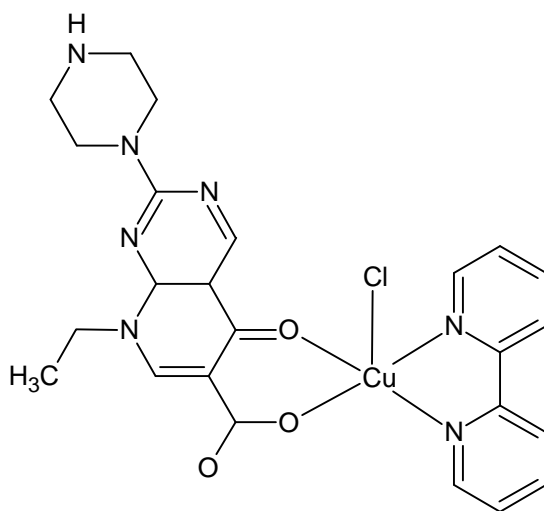


Schéma 62. Strukturní vzorec komplexu 76.

KOMPLEX 77 (Schéma 63):

[Cu(PPA)(bpyam)Cl]

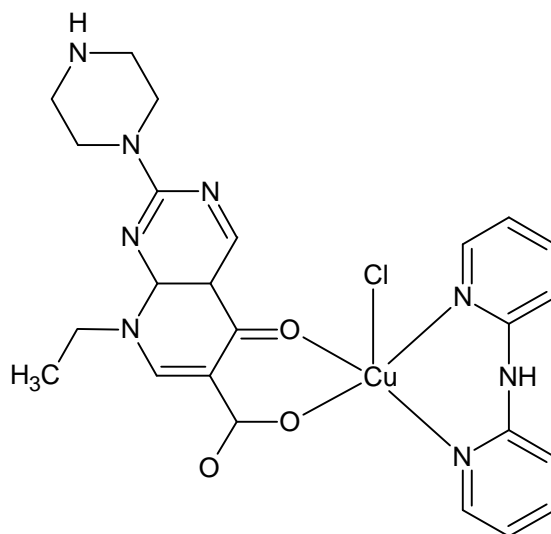


Schéma 63. Strukturní vzorec komplexu 77.

KOMPLEX 78 (Schéma 64):

[Cu(pr-norf)(bpyam)Cl]

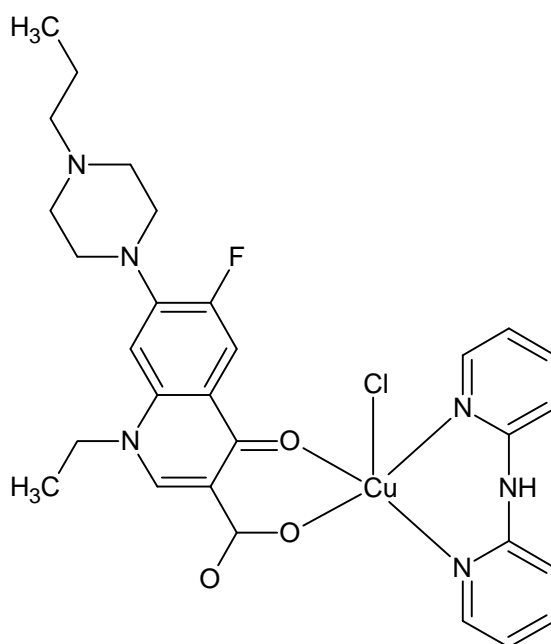


Schéma 64. Strukturní vzorec komplexu 78.

Příprava komplexu 72:

K 15 ml methanolického roztoku, který obsahoval 0,4 mmol Hpr-norf, bylo přidáno 0,4 mmol CH_3ONa . Dále byl přidán roztok připravený z 10 ml methanolu a 0,2 mmol $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Reakční směs byla ponechána 2 hodiny pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Poté byl roztok zfiltrován a nechán pomalu odpařovat. Po několika dnech se z roztoku vyloučily malé světle modré krystalky. Ty byly odfiltrovány, promyty methanolem a vysušeny.

Příprava komplexu 73:

K 15 ml methanolického roztoku, který obsahoval 0,4 mmol HPPA, bylo přidáno 0,4 mmol CH_3ONa . Dále byl přidán roztok připravený z 10 ml methanolu a 0,2 mmol $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Reakční směs byla ponechána 2 hodiny pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Poté byl roztok zfiltrován a nechán pomalu odpařovat. Po několika dnech se z roztoku vyloučily malé modrozelené krystalky. Ty byly odfiltrovány, promyty methanolem a vysušeny.

Příprava komplexu 74:

0,4 mmol HPPA bylo rozpuštěno v 15 ml methanolu. Poté bylo k tomuto roztoku přidáno 0,4 mmol CH_3ONa . Po 30 minutách míchání byl přidán methanolický roztok (10 ml) s 0,4 mmol $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nakonec byl po kapkách přidán methanolický roztok (10 ml) s 0,4 mmol phen. Reakční směs byla ponechána 1 hodinu pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Objem vzniklého modrého roztoku byl zredukován a roztok ponechán pomalu odpařovat. Odpařením rozpouštědla byly získány malé modrozelené krystalky.

Příprava komplexu 75:

Komplex byl připraven stejným způsobem jako komplex **74**, pouze místo HPPA bylo použito 0,4 mmol Hpr-norf. Konečným produktem syntézy byly malé modrozelené krystaly.

Příprava komplexu 76:

Komplex byl připraven stejným způsobem jako komplex **74**, namísto phen bylo použito 0,4 mmol bpy. Konečným produktem syntézy byly malé modrozelené krystaly.

Příprava komplexu 77:

Komplex byl připraven stejným způsobem jako komplex 74, phen byl zaměněn za 0,4 mmol bpyam. Konečným produktem syntézy byly malé modré krystalky.

Příprava komplexu 78:

Komplex byl připraven stejným způsobem jako komplex 74. Pouze bylo namísto HPPA použito 0,4 mmol Hpr-norf a namísto phen použito 0,4 mmol bpyam. Konečným produktem syntézy byly malé tmavé modrozelené krystalky.

Komplexy 72-78 byly spolu s použitými ligandy testovány na antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním (*S. aureus*) a proti gramnegativním (*E. coli* a *P. aeruginosa*) mikroorganismům. Schopnost sloučenin inhibovat tyto mikroorganismy byla vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC). Z *Tabulky 26* lze vyčíst, že komplexy, jejichž součástí je ligand pr-norf vykazují ze všech testovaných komplexů nejvyšší aktivitu. Největší inhibice mikroorganismů byla zpozorována u komplexu 72, konkrétně proti bakteriím rodu *E. coli*. [43]

Tabulka 26. Výsledky testování antimikrobiální aktivity pro komplexy 72-78.

Sloučenina	Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
HPPA	64,0	64,0	16,0
Hpr-norf	4,0	4,0	16,0
phen	32,0	32,0	32,0
bpy	256,0	256,0	256,0
bpyam	1024,0	1024,0	1024,0
72 [Cu(pr-norf) ₂ (H ₂ O)]	0,5	8,0	8,0
73 [Cu(PPA) ₂ (H ₂ O)]	8,0	8,0	16,0
74 [Cu(PPA)(phen)Cl]	4,0	4,0	8,0
75 [Cu(pr-norf)(phen)Cl]	2,0	0,25	16,0
76 [Cu(PPA)(bpy)Cl]	8,0	16,0	8,0
77 [Cu(PPA)(bpyam)Cl]	16,0	16,0	32,0
78 [Cu(pr-norf)(bpyam)Cl]	4,0	4,0	8,0

KOMPLEX 79 (Schéma 65):

[Cu(clof)₂(ron)₂]

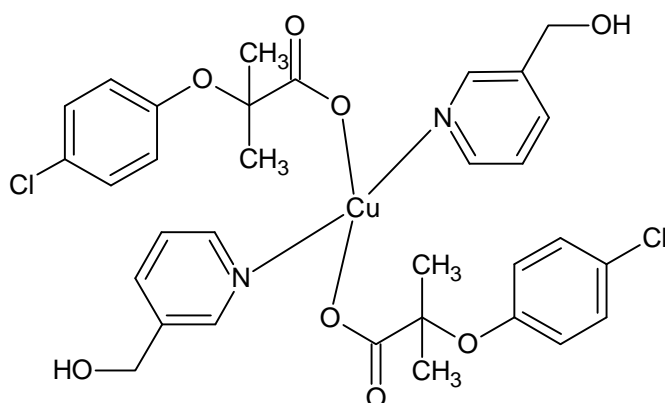


Schéma 65. Strukturní vzorec komplexu 79.

KOMPLEX 80 (Schéma 66):

[Cu(clof)₂(caf)₂]

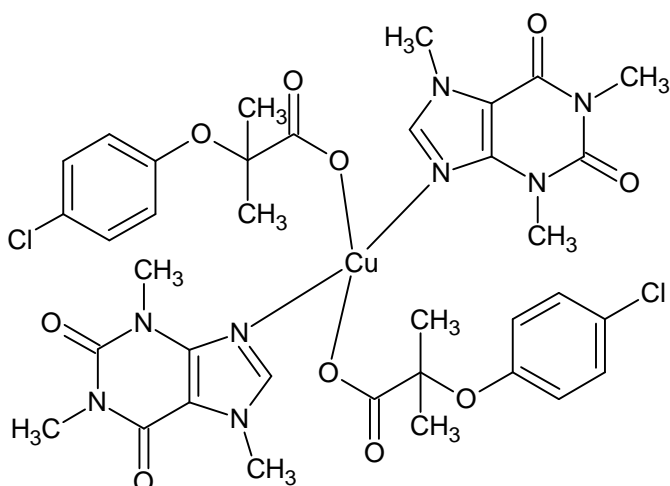
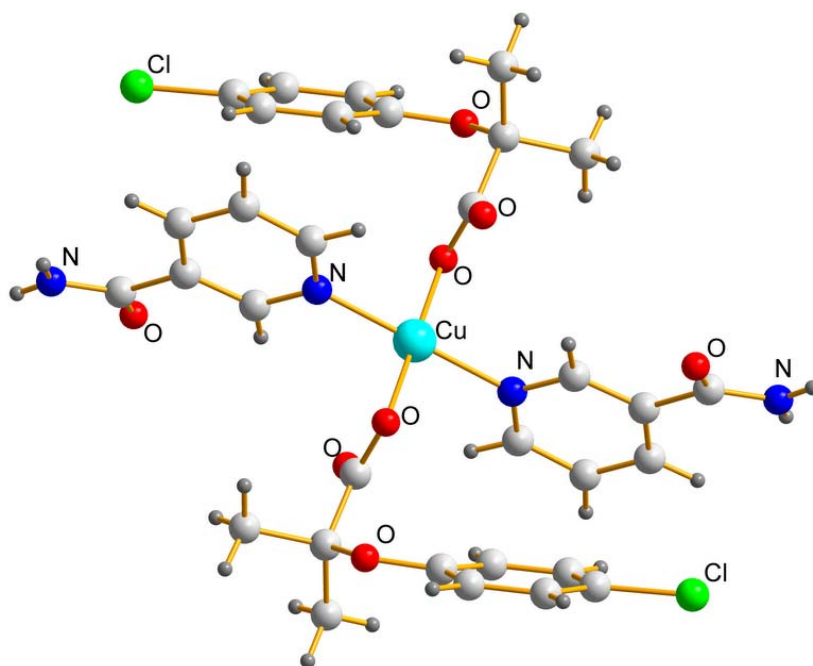


Schéma 66. Strukturní vzorec komplexu 80.

KOMPLEX 81 (Obrázek 28):

[Cu(clof)₂(na)₂]



Obrázek 28. Molekulová struktura komplexu 81.

Příprava komplexu 79:

$\text{Cu}(\text{clof})_2$ byl připraven reakcí vodného roztoku klofibrátu sodného (0,01 mol) s vodným roztokem síranu měďnatého (bezvodý), které byly smíchány v molárním poměru 2:1 (ligand:kov). Poté byl roztok nechán stát při pokojové teplotě až do vzniku zelenomodrých krystalů. Ty poté byly promyty studenou vodou a vysušeny při pokojové teplotě.

Komplex **79** byl připraven tak, že k methanolickeému roztoku obsahujícímu 0,01 mol $\text{Cu}(\text{clof})_2$ byl přidán nadbytek pyridin-3-ylmethanolu. Reakční směs byla zahřáta, poté zfiltrována a nechána stát při pokojové teplotě. Vzniklý modrý produkt byl kvůli znečištění ligandem překrystalizován v methanolu.

Příprava komplexu 80:

Komplex byl připraven přidáním 0,01 mol kofeinu k horkému methanolickeému roztoku, který obsahoval 0,01 mol $\text{Cu}(\text{clof})_2$. Směs byla míchána, za horka zfiltrována a poté nechána vychladnout na pokojovou teplotu. Vzniklý zelený produkt byl překrystalizován v methanolu za zisku zelených krystalků.

Příprava komplexu 81:

K methanolickému roztoku obsahujícímu 0,01 mol $\text{Cu}(\text{clof})_2$ byl přidán nadbytek nikotinamidu. Reakční směs byla zahřáta, poté zfiltrována a nechána stát při pokojové teplotě. Vzniklý modrý produkt byl kvůli znečištění ligandem překrystalizován v methanolu.

Komplexy **79-81** byly spolu s použitými ligandy testovány na protiplísňovou (antifungicidní) aktivitu proti vláknitým houbám (*Rhizopus oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Microsporum gypseum*) a proti kvasinkám (*Candida parapsilosis*, *Candida albicans*). Schopnost sloučenin inhibovat tyto mikroorganismy byla vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC). Z **Tabulky 27** lze vyčíst, že komplex **81** je nejúčinnějším z testovaných komplexů proti vláknitým houbám. Proti kvasinkám vykazovaly největší aktivitu komplexy **80** a **81**. [44]

Tabulka 27. Výsledky testování protiplísňové aktivity pro komplexy 79-81.

Sloučenina	Minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
	<i>R. oryzae</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. alternata</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
Hclof	> 10	> 10	> 10	5	> 5	> 5
ron	> 10	> 10	> 10	> 10	> 5	> 5
caf	> 10	> 10	> 10	$\leq 2,5$	> 5	> 5
na	≥ 10	> 10	> 10	> 10	> 5	> 5
$\text{Cu}(\text{clof})_2$	> 10	> 10	> 10	$\leq 2,5$	> 5	> 5
79 [$\text{Cu}(\text{clof})_2(\text{ron})_2$]	> 10	> 10	> 10	≤ 5	> 5	> 5
80 [$\text{Cu}(\text{clof})_2(\text{caf})$]	5	10	> 10	$\leq 2,5$	> 5	5
81 [$\text{Cu}(\text{clof})_2(\text{na})_2$]	< 1,25	> 10	> 10	≤ 5	> 5	5

2.3.5. Protiparazitní aktivita

Onemocnění způsobená parazity jsou v dnešní době celosvětově závažným problémem. Nejvíce ohrožené jsou tropické a subtropické oblasti. I přes závažnost tohoto problému je v současnosti proti těmto onemocněním, která jsou způsobená parazity, vynakládáno velice málo úsilí i finančních prostředků. Většina dnes používaných léčiv byla vyvinuta před několika desítkami let a jejich účinek bývá velice proměnlivý. Tato léčiva mají závažné nežádoucí účinky, jsou drahá, vyžadují dlouhodobou léčbu a není vyloučeno, že si parazit proti léčivé látce vytvoří rezistenci. Z tohoto důvodu je cílem výzkumných týmů vytvořit nová, účinná, levná a bezpečná léčiva, která by se používala k léčbě leishmaniózy, trypanosomiázy a malárie.[45]

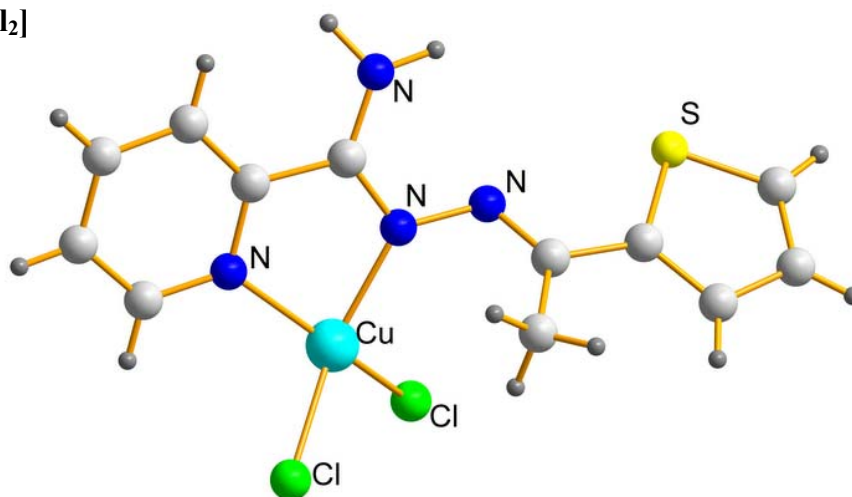
Malárie je v současnosti nejzávažnějším a nejhůře léčitelným onemocněním, které je způsobeno parazity. Touto nemocí je infikováno více jak 200 milionů lidí, z nichž každoročně 3 miliony této zákeřné infekci podlehnou. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace je 40 % veškeré populace malárií bezprostředně ohroženo. Situace je zhoršena ještě tím, že organismus parazita odpovědného za tuto nemoc (*Plasmodium falciparum*) si vytvořil proti většině běžně používaných antimalarických látek rezistenci. Z tohoto důvodu je nezbytné vytvořit nová účinná a selektivní antimalarika. Příkladem takto biologicky aktivních látek jsou měďnaté komplexy, ve kterých jako ligandy figurují například deriváty pyridin-2-karboxamidrazonu. Jedná se o látky se silným antimalarickým účinkem.[46]

Leishmanióza (souhrnné označení pro skupinu onemocnění způsobených parazity rodu *Leishmania*) se řadí mezi tropické choroby. Tento typ onemocnění se hned po malárii řadí mezi nejzávažnější onemocnění tohoto druhu. Leishmaniózou je nakaženo 12 milionů lidí a dalších 350 milionů lidí z 88 různých zemí světa je jí bezprostředně ohroženo. Nakazit se mohou při kontaktu s bodavým hmyzem, který slouží jako přenašeč prvoků rodu *Leishmania*. Nemoc se může projevit ve třech různých formách (kožní, mukokutánní a vnitřní), přičemž dostupná léčiva nejsou účinná proti vnitřní formě, která téměř ve většině případů končí fatálně.[47]

Pro ukázkou protiparazitně aktivního měďnatého komplexu jsem vybral sloučeninu, ve které je ligandem derivát již zmíněného pyridin-2-karboxamidrazonu. Tento komplex vykazuje silný antimalarický účinek a mohl by tak být součástí nově vyvíjených léčiv, proti kterým ze strany *Plasmodia falcipara* (nejdůležitější a nejrozšířenější původce malárie) neexistuje rezistence.

KOMPLEX 82 (Obrázek 29):

[Cu(atpka)Cl₂]



Obrázek 29. Molekulová struktura komplexu 82.

Příprava komplexu 82:

Komplex byl připraven smícháním ethanolického roztoku pyridin-2-karboxamidrazonu a ethanolického roztoku CuCl₂·2H₂O v molárním poměru 1:1. Směs byla ponechána 1 hodinu pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Vzniklý produkt byl po ochlazení z roztoku odfiltrován a vysušen ve vakuu. Rekrystalizací z acetonitrilu byly získány hnědé krystaly vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu.

Komplex **82** byl testován na schopnost antimalarického účinku, konkrétně na aktivitu proti *Plasmodium falciparum* (kmen 3D7). Účinnost komplexu byla vyjádřena pomocí efektivní dávky **ED₅₀**. *In vitro* testy naměřená hodnota efektivní dávky činí **0,13 μg·ml⁻¹**. Pro porovnání, hodnota **ED₅₀** pro **chlorochin** (běžně používané antimalarikum) je **0,01 μg·ml⁻¹**. Používaný chlorochin vykazuje vyšší účinnost, ovšem ve většině oblastí světa je mnoho kmenů *Plasmodia falcipara* proti této látce rezistentní.[46]

Chlorochin – *N'*-(7-chlorochinolin-4-yl)-*N,N*-diethylpentan-1,4-diamin (*Schéma 67*)

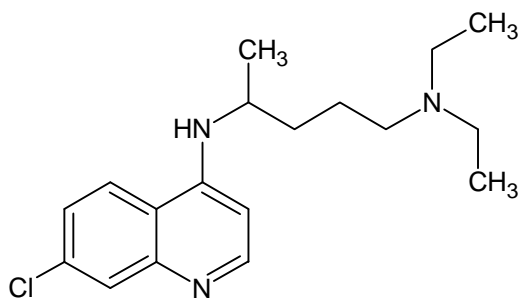


Schéma 67. Strukturní vzorec chlorochinu.

3. Experimentální část

Tato bakalářská práce je především prací rešeršní, a proto je její stěžejní částí část teoretická. Experimentální nadstavbou byla syntéza a charakterizace komplexních sloučenin mědi se dvěma různými N-donorovými heterocykly v koordinační sféře. Na základě výsledků testování biologické aktivity komplexů prezentovaných v teoretické části jsem se pokusil o přípravu několika podobných měďnatých komplexních sloučenin obsahujících 1,10-fenanthrolin a různé deriváty N6-benzylaminopurinu, u kterých lze očekávat biologickou aktivitu.[48, 49] Tyto nové koordinační sloučeniny by měly rozšířit sadu Cu(II) komplexů již připravených na Katedře anorganické chemie, PřF UP v Olomouci.

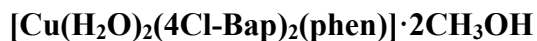
3.1. Použité chemikálie a přístroje

Pro přípravu Cu(II) komplexů byly použity následující látky: 1,10-fenanthrolin, 2,2'-bipyridin (Lachema); $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich); methanol, ethanol, 25 % roztok NH_3 (Penta). Deriváty N6-benzylaminopurinu byly připraveny školitelem dle postupu popsáním v literatuře. [50, 51]

Připravené látky byly charakterizovány C, H, N chemickou analýzou prvků (analyzátor EA-1108, Fisons Instruments), mid/far infračervenou spektroskopií (FT-IR spektrometr Nexus 670, ThermoScientific), UV/VIS spektroskopií (UV-VIS spektrometr Lambda40, Perkin-Elmer) a vodivostním měřením (konduktometr Cond 340i/SET, WTW).

3.2. Příprava komplexů

Komplexy byly připravovány různými postupy s různými molárními poměry reaktantů, kdy byl roztok příslušného derivátu N6-benzylaminopurinu (Bap) v methanolu či ethanolu smíchán s roztokem měďnaté soli a s 2,2'-bipyridinem či 1,10-fenanthrolinem. Vzhledem k tomu, že všechny syntézy nevedly k získání chemicky čisté látky, budou zmíněny pouze komplexy, u kterých bylo pomocí fyzikálně-chemických technik prokázáno, že jsou chemickými individui. Protože se nepodařilo připravit krystal použitelný pro rentgenovou strukturní analýzu, byly připravené látky charakterizovány pouze nepřímými metodami.

KOMPLEX A:**KOMPLEX B:****KOMPLEX C:**

Obečný strukturální vzorec komplexů **A**, **B**, **C** je zobrazen ve *Schématu 68*.

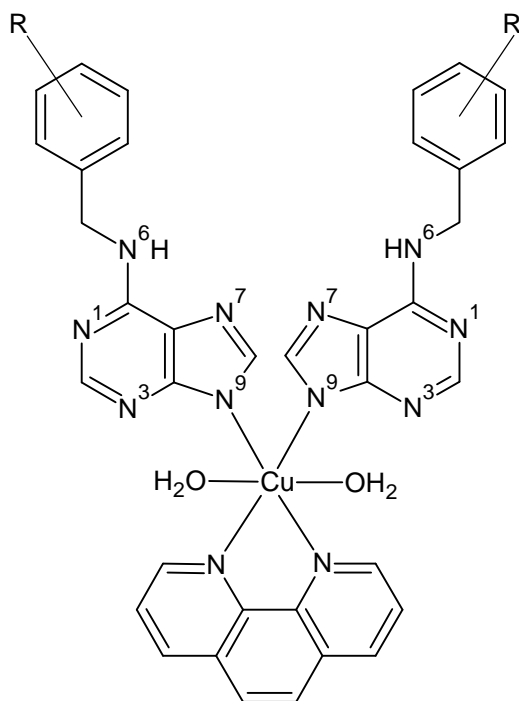


Schéma 68. Obečný strukturální vzorec komplexů A, B, C (kde R = Cl, OCH₃)

Příprava komplexů A, B, C:

K 30 ml methanolickeho roztoku 2 mmol R-Bap připraveného při teplotě 50 °C (pomocí ultrazvukové lázně) bylo přidáno 0,5 ml 25 % roztoku amoniaku a k této směsi byl poté pomalu přiléván roztok 1 mmol octanu měďnatého v 10 ml methanolu. Do vzniklého roztoku byl přisypán pevný 1,10-fenanthrolin (1 mmol). Reakční směs byla míchána do vychladnutí na laboratorní teplotu a poté nechána volně krystalizovat. Získané tmavě zelené

mikrokrystaly byly izolovány na fritě, promyty diethyletherem a vysušeny v exsikátoru (*Schéma 69*).

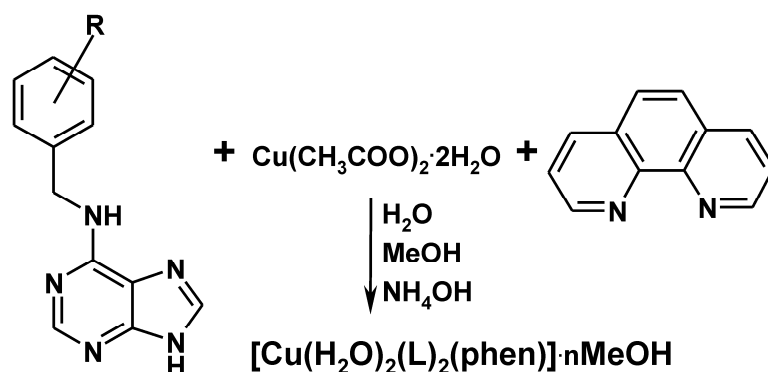


Schéma 69. Obecná příprava komplexů **A**, **B**, **C** (kde $R = \text{Cl}, \text{OCH}_3$).

3.3. Charakterizace komplexů

Chemická analýza prvků:

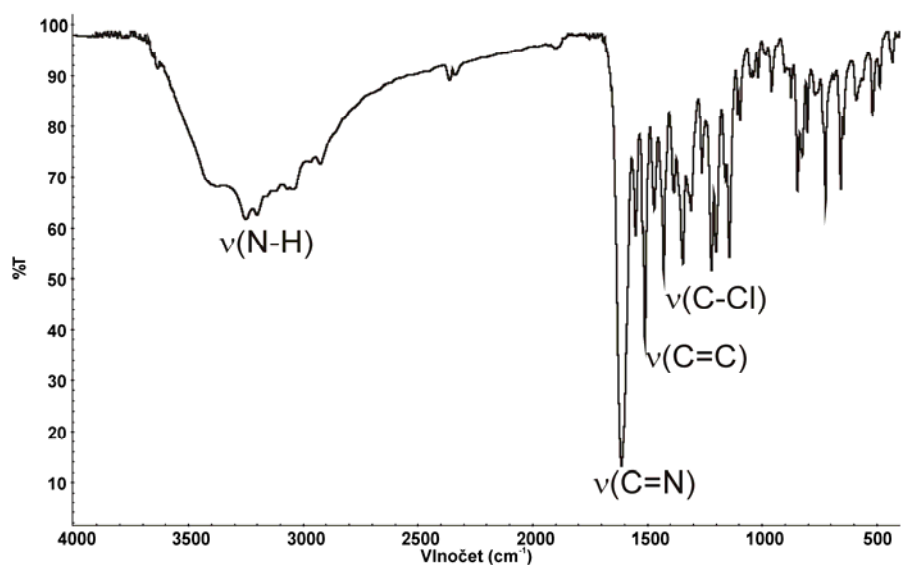
Výsledky chemické analýzy prvků (C, H, N) jsou uvedeny v *Tabulce 28*. Nalezené hodnoty zastoupení prvků jsou v poměrně dobré shodě s hodnotami vypočtenými.

Tabulka 28. Výsledky chemické analýzy prvků pro komplexy **A**, **B**, **C**.

Sloučenina	C vyp./nal.	H vyp./nal.	N vyp./nal.
A $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(3\text{Cl-Bap})_2(\text{phen})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$	53,59/54,20	4,13/4,02	20,27/20,06
B $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(4\text{Cl-Bap})_2(\text{phen})] \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$	52,99/53,53	4,45/4,35	19,52/18,98
C $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(3\text{OCH}_3\text{-Bap})_2(\text{phen})] \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$	56,36/55,86	5,20/4,89	19,72/19,14

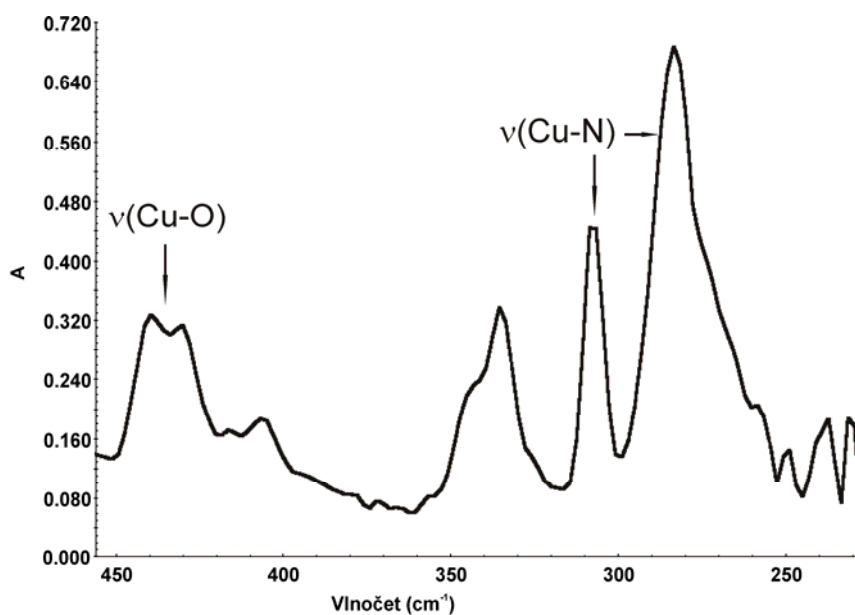
Infračervená spektroskopie:

Měření infračervených spekter komplexů ve střední oblasti ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) bylo provedeno KBr technikou. Vibrace vazeb organické části molekuly byly nalezeny 3440 cm^{-1} ($\nu(\text{N-H})$), 1640 cm^{-1} ($\nu(\text{C=N})$), $540, 1500$ a 1450 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$), 1255 cm^{-1} ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-O})$) u komplexu **C** a 1120 cm^{-1} ($\nu(\text{C}_{\text{ar}}\text{-Cl})$) pro komplexy **A** a **B**. [52] Mid/IR spektrum komplexu **A** znázorňuje *Obrázek 30*.



Obrázek 30. Mid IR spektrum komplexu A.

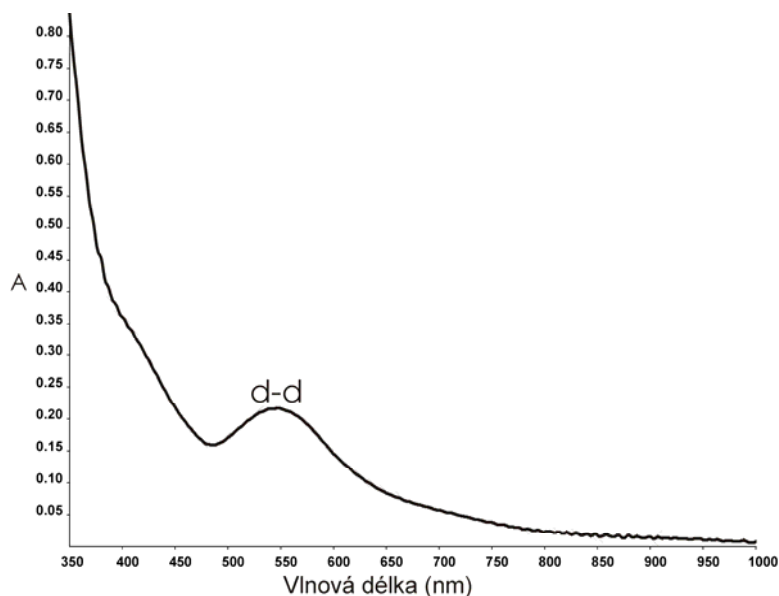
Far IR spektra byla měřena Nujolovou technikou v oblasti vlnocetů 600–150 cm^{-1} . V této oblasti byly sledovány vibrace vazeb mezi centálním atomem mědi a donorovými atomy ligand, které byly nalezeny při *ca* 440 cm^{-1} ($\nu(\text{Cu-O})$), 310 cm^{-1} ($\nu(\text{Cu-N}_{\text{Bap}})$) a 280 cm^{-1} ($\nu(\text{Cu-N}_{\text{phen}})$). [53, 54] Far/IR spektrum komplexu **B** znázorňuje *Obrázek 31*.



Obrázek 31. Far IR spektrum komplexu B.

UV/VIS spektroskopie:

Elektronová (UV/VIS) spektra a vodivosti byly měřeny u 10^{-3} molárních roztoků komplexů v DMF. V elektronových spektrech bylo nalezeno maximum při vlnové délce *ca* 560 nm, které odpovídá *d-d* přechodům měďnatých komplexů.[55] Typické spektrum znázorňuje **Obrázek 32**. Z hodnot naměřených vodivostí ($32 - 44 \text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$) vyplývá, že se jedná o komplexní neelektrolyty.[56]



Obrázek 32. Roztokové elektronové spektrum komplexu C.

Z důvodu absence vhodného monokrystalu jsme neměli možnost ověřit strukturu komplexů pomocí rentgenové strukturní analýzy, objasnili jsme jejich složení pomocí výsledků získaných z nepřímých metod. Na způsob koordinace derivátu N6-benzylaminopurinu lze usoudit na základě struktury podobných komplexů, které byly na Katedře anorganické chemie, PřF UP v Olomouci již v minulosti připraveny a u nichž byla pomocí rentgenové strukturní analýzy zjištěna koordinace přes N9-donorový atom purinového skeletu.

4. Závěr

V rámci literární rešerše bylo vybráno a popsáno celkem 82 koordinačních sloučenin mědi s N- a S-donorovými ligandy. Na základě biologické aktivity byly tyto komplexy rozděleny do 5 různých podkapitol, z nichž nejobsáhlejší je kapitola zabývající se protinádorovou aktivitou (obsahuje 53 biologicky účinných látek). Každá z prezentovaných sloučenin byla strukturně popsána, byl zde uveden způsob její přípravy a byla zhodnocena míra její biologické aktivity. Výsledky některých testů jsou natolik slibné, že nabízejí šanci, aby některé z těchto komplexů byly využity v klinické praxi.

Například komplexy **1** a **2** byly již při velmi nízké koncentraci vysoce účinné proti buňkám hepatocelulárního karcinomu, adenokarcinomu ledvin a rakovině plic. V porovnání s cisplatinou byly tyto komplexy téměř až desetinásobně účinnější. Proto je lze považovat za kandidáty pro vývoj nových chemoterapeutik. Rovněž velmi významnou aktivitu prokázal komplex **12**. Tato látka prokázala účinnost proti dvěma typům nádorových buněk slinivky břišní. O tomto onemocnění lze říci, že je nejhorším typem rakoviny. Je totiž velice špatně léčitelná a pro její vyléčení neexistují vhodná chemoterapeutika.

Pro další studium se velice hodí komplexy **27** a **28**, které vykazují neobyčejnou aktivitu proti leukemickým buňkám. K léčbě dnes tak časté rakoviny prsu by bylo možné využít biologickou aktivitu komplexu **43**. Pro vývoj nových silných protinádorových farmak je velice vhodný komplex **50**. Tato látka totiž při testování dokázala z více jak 97 % inhibovat buňky rakoviny žaludku. A to již při koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Velice nízká toxicita a vynikající schopnost inhibovat záněty je typická pro komplex **57**. Vynikající výsledky při testech prokázaly také komplexy z podkapitoly o antidiabetické, antimikrobiální a protiparazitní aktivitě. Výhodou většiny zde vyjmenovaných komplexů je, že jsou netoxické (nebo pouze mírně toxické) vůči zdravé tkáni, narozdíl od některých látek, které se při dnešní léčbě používají.

V rámci experimentální části se podařilo připravit a základními nepřímými metodami zcharakterizovat tři Cu(II) komplexy, ve kterých jako ligandy vystupují 1,10-fenanthrolin a různé deriváty N6-benzylaminopurinu. Jedná se o jednojaderné oktaedrické komplexy s chromoforem CuN4O2. Vzhledem k použitým ligandům a centrálnímu atomu lze tyto

komplexy také považovat za potenciálně biologicky aktivní. To se bohužel prozatím nepodařilo prokázat, protože testování těchto látek je stále ve fázi experimentu.

5. Summary

Copper has been recognized to be an essential trace metal for living organisms since the late 1930's. This metal is present in all human organs and tissues (in liver, brain, bosom, stomach, blood, bile and others). Copper is a cofactor for crucial enzymes. These include cytochrom c oxidase (the terminal enzyme in electron transport and respiration), Cu/Zn superoxide dismutase and ceruloplasmin (which deal with superoxide and other potentially damaging radicals), as well as tyrosinase (producing melanin pigment), lysyl oxidase (which cross-links elastin and collagen), dopamine-monoxygenase (necessary for catecholamine production) and peptidyl glycine α -amidating monoxygenase (required for modification of neuropeptide hormones).

Copper is also active against germs, parasites and fungi. Some of copper complexes show an antioxidant, antidiabetic, anticancer and antiinflammatory effect. These complexes could be suitable for use in medicine.

This bachelor work represents a summary of Cu(II) complexes with N-, S-donor ligands, which exhibit antitumour, antioxidant, antiinflammatory, antidiabetic, antimicrobial and antiparasitic activity. There are described structures, preparation and results of biological testing of 82 biologically active Cu(II) complexes in the theoretical part. Many of these complexes are useful in clinical practice for their low toxicity. They often have better effectivity than commonly used medicaments. The experimental section of this work contains preparation and characterization of Cu(II) complexes prepared by the author. These complexes are mononuclear and octahedral. They contain 1,10-phenanthroline and N6-benzylaminopurine derivatives as the ligands in the coordination sphere.

6. Seznam použitých zkratek

IC ₅₀	Koncentrace látky, která je potřebná k dosažení 50% buněčné smrti.
CD ₅₀	Koncentrace látky, při které se sníží absorbance léčených buněk vzhledem k buňkám referenčním (neléčeným) o 50 %.
LD ₅₀	Letální dávka (smrtebná dávka pro 50 % buněk).
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (udává minimální koncentraci antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst izolovaných mikroorganismů).
ED ₅₀	Efektivní dávka, při které je zpozorována 50% inhibice růstu parazita.

(pozn. Všechny zkratky jsou řazeny postupně, tak jak se nacházejí v textu)

phen	1,10-fenanthrolin
sal (salH ₂)	salicylát (kyselina salicylová)
bpy	2,2'-bipyridin
BZA (BZAH)	benzoát (kyselina benzoová)
RSHCl	R-sarcosinhydrochlorid (RO(O)CCH ₂ N(CH ₃)H ₂ ⁺ Cl ⁻)
SMDTC	S-methyldithiokarbazát
PyDT	pyrrolidin dithiokarbamát
NH ₄ [PyNCS ₂]	amonná sůl pyrrolidin dithiokarbamátu
Na[(CH ₃) ₂ NCS ₂]	sodná sůl N,N-dimethyl dithiokarbamátu
DMDT	N,N-dimethyl dithiokarbamát
nsa	Schiffova báze nimesulidu a salicylaldehydu
nhmb	Schiffova báze nimesulidu a 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehydu
ndhb	Schiffova báze nimesulidu a 2,3-dihydroxybenzaldehydu
nhbb	Schiffova báze nimesulidu a 2-hydroxy-3,5-ditert-butylbenzaldehydu
t-Bu	tert-butyl (1,1-dimethylethyl)
sac	sacharinátový anion
NNS'	S-benzyl-β-N-(2-acetylpyrid-2-yl)methylendithiokarbazát
NNS''	S-benzyl-β-N-(2-benzoylpyrid-2-yl)methylendithiokarbazát
NNS'''	S-benzyl-β-N-(6-methylpyrid-2-yl)methylendithiokarbazát

NS ¹	<i>S</i> -methyl-β- <i>N</i> -(2-furylmethyl)methylendithiokarbazát
NS ²	<i>S</i> -methyl-β- <i>N</i> -(5-methyl-2-furyl)methylendithiokarbazát
dienSS	Schiffova báze diethylentriaminu a 2-thiofenkarboxaldehydu
dienOO	Schiffova báze diethylentriaminu a 2-furaldehydu
2a-5mt	2-amino-5-methylthiazol
HDpT	dipyridylketon thiosemikarbazon
HDp4mT	dipyridylketon 4-methylthiosemikarbazon
HDp4eT	dipyridylketon 4-ethylthiosemikarbazon
HDp44mT	dipyridylketon 4,4-dimethylthiosemikarbazon
HDp4pT	dipyridylketon 4-fenylthiosemikarbazon
HDp4aT	dipyridylketon 4-allylthiosemikarbazon
Et ₃ N	triethylamin
maltol	3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-on
phendion	1,10-fenanthrolin-5,6-dion
dppz	dipyrido[3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i>]fenazin
bpg	4b,5,7,7a-tetrahydro-4b,7a-epiminomethanoimino-6 <i>H</i> - -imidazo[4,5 <i>f</i>][1,10]-fenanthrolin-6,13-dion (bipyridylglykoluril)
HL ¹	2,4-diiodo-6-((pyridin-2-ylmethylamino)methyl)fenol
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
TBZH	2-(4'-thiazol)benzimidazol (thiabendazol)
2-PyBZIMH	2-(2-pyridyl)benzimidazol
BZAH	kyselina benzoová
NQTS	1,2-naftachinon thiosemikarbazon
PQTSC	fenanthrenchinon thiosemikarbazon
hzkta	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-2,2'-(butan-2,3-diyliden)bis(hydrazinkarbothioamid)
dptaS	Schiffova báze dipropylentriaminu a thiofen-2-karboxaldehydu
dpta	dipropylentriamin
appc	<i>N</i> ¹ -(2-acetylpyridin)pyridin-2-karboxamidrazon
atpc	<i>N</i> ¹ -(2-acetylthiofen)pyridin-2-karboxamidrazon
ATICAR	5-amino-1-tolylimidazol-4-karboxylát
ppmn	1-[3-(2-pyridyl)pyrazol-1-ylmethyl]naftalen

HL ²	1,4-dihydro-4-amino-3-(2-pyridyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol
amtpt	4-amino-5-methylthio-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazol
H ₂ N ₉ -ABS	<i>N</i> -(9H-purin-6-yl)benzensulfonamid
SALSC	salicylaldehyd semikarbazon
HL ³	<i>N</i> -2-(5,6-dimethylbenzothiazol)toluensulfonamid
HL ⁴	<i>N</i> -2-(6-chlorobenzothiazol)benzensulfonamid
2a-2tzn	2-amino-2-thiazolin
dienNN	Schiffova báze diethylentriaminu a pyrrol-2-karboxaldehydu
Me ₅ dien	<i>N, N, N', N'', N'''</i> - pentamethyldiethylentriamin
2-tpca	thiofen-2-karboxylová kyselina
2-tpaa	thiofen-2-octová kyselina
NaBPh ₄	tetrafenylborát sodný
2-fa	furan-2-karboxylová kyselina
pa	pyridin-2-karboxylová kyselina (pikolinová kyselina)
sa	<i>N</i> -salicyliden-β-alanin
HL ⁵	2-methoxy-6-(benzylamino)purin
HL ⁶	4-methoxy-6-(benzylamino)purin
HL ⁷	2,3-dimethoxy-6-(benzylamino)purin
Hpr-norf	1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(4-propyl-1-piperaziny)-3-chinolinkarboxylová kyselina (Hpr-norfloxacin)
HPPA	8-ethyl-5-oxo-2-piperazin-1-yl-5,8-dihydropyrido[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-6-karboxylová kyselina
bpyam	2,2'-dipyridylamin
Hclof	ethyl 2-(4-chlorofenoxy)-2-methylpropanoát (klofibrát)
ron	pyridin-3-ylmethanol (ronicol)
caf	1,3,7-trimethyl-1 <i>H</i> -purin-2,6(3 <i>H</i> ,7 <i>H</i>)-dion (kofein)
na	pyridin-3-karboxamid (nikotinamid)
atpka	<i>N</i> ¹ -2-acetylthiofen-pyridin-2-karboxamidrazon
DMF	dimethylformamid

7. Seznam použité literatury

- [1] M. C. Linder, *Mutation Research* **475** (2001), 141-152
- [2] *International Copper Development Association* (www.copperinfo.co.uk)
- [3] *Copper Development Association* (www.copper.org)
- [4] A. P. Rebolledo, L. R. Teixeira, A. A. Batista, A. S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. Gonzalez, P. Hernandez, A. M. Ferreira, N. L. Speziali, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008), 939-948.
- [5] E. Račanská, O. Švajlenová, J. Valuška, J. Vančo, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* **53** (2006), 201-207.
- [6] M. Ferenčík, B. Škárka, M. Novák, L. Turecký, *Biochémiá, Slovak Academic Press* (2000).
- [7] N. M. Rao, *Medical Biochemistry, New Age International Publishers* (2006).
- [8] *Datový standard Ministerstva zdravotnictví ČR* (ciselniky.dasta.mzcr.cz).
- [9] R. W. Hay, *Bio-inorganic chemistry, Horwood Publishing* (1999).
- [10] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry, Medical Publishing Division* (2003).
- [11] W. L. Jolly, *Modern Inorganic Chemistry (Second Edition), McGraw-Hill, Inc.* (2006).
- [12] M. Devereux, D. O. Shea, A. Kellett, M. McCann, M. Walsh, D. Egan, C. Deegan, K. Kedziora, G. Rosair, H. Müller-Bunz, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007), 881–892.
- [13] M. Devereux, D. O'Shea, M. O'Connor, H. Grehan, G. Connor, M. McCann, G. Rosair, F. Lyng, A. Kellett, M. Walsh, D. Egan, B. Thati, *Polyhedron* **26** (2007), 4073-4084.
- [14] L. Giovagnini, S. Sitran, M. Montopoli, L. Caparrotta, M. Corsini, C. Rosani, P. Zanello, Q. P. Dou, D. Fregona, *Inorg. Chem.* **47** (2008), 6336-6343.
- [15] V. Ambike, S. Adsule, F. Ahmed, Z. Wang, Z. Afrasiabi, E. Sinn, F. Sarkar a S. Padhye, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007), 1517–1524.
- [16] T. B. S. A. Ravoof, K. A. Crouse, M. I. M. Tahir, A. R. Cowley, M. A. Ali, *Polyhedron* **26** (2007), 1159–1165.
- [17] M. T. H. Tarafder, K. Chew, K. A. Crouse, A. M. Ali, B. M. Yamin, H. K. Fun, *Polyhedron* **21** (2002), 2683-2690.

- [18] A. Th. Chaviara, P. J. Cox, K. H. Repana, R. M. Papi, K. T. Papazisis, D. Zambouli, A. H. Kortsaris, D. A. Kyriakidis, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004), 1271–1283.
- [19] P. V. Bernhardt, P. C. Sharpe, M. Islam, D. B. Lovejoy, D. S. Kalinowski, Des R. Richardson, *J. Med. Chem.* **52** (2009), 407–415.
- [20] A. Barve, A. Kumbhar, M. Bhat, B. Joshi, R. Butcher, U. Sonawane, R. Joshi, *Inorg. Chem.* **48** (2009), 9120–9132.
- [21] S. S. Hindo, M. Frezza, D. Tomco, M. J. Heeg, L. Hryhorczuk, B. R. McGarvey, Q. P. Dou, C. N. Verani, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009), 4353–4361.
- [22] Z. Afrasiabi, E. Sinn, J. Chen, Y. Ma, A. L. Rheingold, L. N. Zakharov, N. Rath, S. Padhye, *Inorg. Chim. Acta* **357** (2004), 271–278.
- [23] Z. Afrasiabi, E. Sinn, S. Padhye, S. Dutta, S. Padhyeb, Ch. Newton, Ch. E. Anson, A. K. Powell, *J. Inorg. Biochem.* **95** (2003), 306–314.
- [24] X. Zhong, J. Yi, J. Sun, H. L. Wei, W. S. Liu, K. B. Yu, *Eur. J. Med. Chem.* **41** (2006), 1090–1092.
- [25] A. T. Chaviara, P. J. Cox, K. H. Repana, A. A. Pantazaki, K. T. Papazisis, A. H. Kortsaris, D. A. Kyriakidis, G. S. Nikolov, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005), 467–476.
- [26] N. H. Gokhale, S. S. Padhye, S. B. Padhye, Ch. E. Anso, A. K. Powell, *Inorg. Chim. Acta* **319** (2001), 90-94.
- [27] M. Collins, D. Ewing, G. Mackenzie, E. Sinn, U. Sandbhor, Sh. Padhye, Sub. Padhye, *Inorg. Chem. Commun.* **3** (2000), 453-457.
- [28] H. Zhang, Ch. Liu, X. Bu, M. Yang, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005), 1119–1125.
- [29] F. Dallavalle, F. Gaccioli, R. Franchi-Gazzola, M. Lanfranchi, L. Marchio, M. A. Pellinghella, M. Tegoni, *J. Inorg. Biochem.* **92** (2002), 95-104.
- [30] J. L. García-Giménez, M. González-Álvarez, M. Liu-González, B. Macías, J. Borrás, G. Alzuet, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009), 923-934.
- [31] M. González-Álvarez, G. Alzuet, J. Borrás, L. del Castillo Agudo, S. García-Granda, J. M. M. Bernardo, *J. Inorg. Biochem.*, **98** (2004), 189-198.
- [32] J. E. Weder, C. T. Dillon, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, J. R. Biffin, H. L. Regtop, N. M. Davies, *Coord. Chem. Rev.*, **232** (2002), 95-126.
- [33] J. Patole, S. Dutta, S. Padhye, E. Sinn, *Inorg. Chim. Acta* **318** (2001), 207–211.

- [34] A. Th. Chaviara, P. C. Christidis, A. Papageorgiou, E. Chrysogelou, D. J. Hadjipavlou-Litina, C. A. Bolos, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005), 2102–2109.
- [35] P. C. Christidis, Z. D. Georgousis, D. Hadjipavlou-Litina, Ch. A. Bolos, *J. Mol. Struct.* **872** (2008), 73-80.
- [36] T. Kuzuya, S. Nakagawa, J. Satoh, Y. Kanazawa, Y. Iwamoto, M. Kobayashi, K. Nanjo, A. Sasaki, Y. Seino, Ch. Ito, K. Shima, K. Nonaka, T. Kadowaki, *Diabetes Research and Clinical Practice* **55** (2002), 65–85.
- [37] N. Yasumatsu, Y. Yoshikawa, Y. Adachi, H. Sakurai, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007), 4917–4922.
- [38] J. Vančo, J. Marek, Z. Trávníček, E. Račanská, J. Muselík, O. Švajlenová, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008), 595–605.
- [39] P. Štarha, Z. Trávníček, R. Herchel, I. Popa, P. Suchý, J. Vančo, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009), 432–440.
- [40] *Hungarian Copper Promotion Centre* (www.medportal.cz)
- [41] G. Psomas, A. Tarushi, E. K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, *J. Inorg. Biochem.* **100** (2006), 1764–1773.
- [42] E. K. Efthimiadou, H. Thomadaki, Y. Sanakis, C. P. Raptopoulou, N. Katsaros, A. Scorilas, A. Karaliota, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007), 64-73.
- [43] E. K. Efthimiadou, N. Katsaros, A. Karaliota, G. Psomas, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007), 4093-4102.
- [44] M. Melník, M. Koman, D. Hudecová, J. Moncol, B. Dudová, T. Glowiak, J. Mrozinski, C. E. Holloway, *Inorg. Chim. Acta* **308** (2000), 1-7.
- [45] L. E. da Silva, A. C. Joussef, L. K. Pacheco, D. G. da Silva, M. Steindelc, R. A. Rebelod, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007), 7553-7560.
- [46] N. H. Gokhale, S. B. Padhye, D. C. Billington, D. L. Rathbone, S. L. Croft, H. D. Kendrick, Ch. E. Anson, A. K. Powell, *Inorg. Chim. Acta* **349** (2003), 23-29.
- [47] M. Navarroa, E. J. Cisneros-Fajardo, M. Fernandez-Mestreb, D. Arriechec, E. Marchan, *J. Inorg. Biochem.* **97** (2003), 364-369.
- [48] J. L. García-Giménez, G. Alzuet, M. González-Álvarez, A. Castineiras, M. Liu-González, J. Borrás, *Inorg. Chem.* **46** (2007), 7178-7188.
- [49] Z. Dvořák, R. Vrzal, P. Štarha, A. Klanicová, Z. Trávníček, *Toxicology in Vitro* **24** (2010), 425-429.

- [50] Z. Trávníček, A. Klanicová, I. Popa, J. Rolčík, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005), 776-786.
- [51] Z. Trávníček, I. Popa, M. Čajan, R. Herchel, J. Marek, *Polyhedron* **26** (2007), 5271-5282.
- [52] C. J. Pouchert, *The Aldrich Library of Infrared Spectra, 3rd ed.*, Aldrich Chemical Company Press (1981).
- [53] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry, 5th ed.*, Wiley (1997).
- [54] A. Mašlejová, I. Potočňák, J. Šima, M. Kabešová, *J. Coord. Chem.* **43** (1998), 41-51.
- [55] A. B. P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy, 2th ed.*, Elsevier (1984).
- [56] W. J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971), 81-122.