

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd**

**Stanovení buněčné cytotoxicity vybraných
vanadocenových a 1,1'-dimethyl
vanadocenových komplexů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:
Vedoucí práce:

Bc. Petra Doležalová
doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**Determination of cellular cytotoxicity of
selected vanadocene and 1,1'-dimethyl
vanadocene complexes**

THESIS

Author: Bc. Petra Doležalová
Supervisor: doc. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.

2009

zadání DP:

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Petra Doležalová

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jaromír Vinklárkovi, Dr. za jeho odborné rady a poskytnuté informace, které jsem mohla využít při zpracování této práce. Zejména bych však chtěla poděkovat Mgr. Lence Zárybnické za její velkou ochotu, všestrannou pomoc a vstřícný přístup při vypracování této práce. V neposlední řadě děkuji katedře radiobiologie Univerzity Obrany v Hradci Králové za možnost využití jejich analyzátorů.

Mé poděkování patří bezpochyby i mé rodině a přátelům za jejich nepostradatelnou pomoc a podporu při celém mém studiu.

Jediný gram poučeného pozorování má ve vědě větší hodnotu než tuna snů.

Marguerite Yourcenonarová

ANOTACE

Vanadocendichlorid Cp_2VCl_2 (VDC) zastupuje skupinu lomených metallocenů, jež jsou v dnešní době intenzivně studovány z hlediska jejich kancerostatické aktivity. Tato práce je zaměřena na stanovení buněčné cytotoxicity vanadocenových a 1,1'-dimethyl vanadocenových komplexů v porovnání se standardně používaným cytostatikem *cis*-diaminodichloroplatinou (*c*DDP). Pro srovnání byla do studie zahrnuta také chemikálie titanocendichlorid Cp_2TiCl_2 (TDC), který byl doposud, jako jediný zástupce ze skupiny metallocenů, v klinických studiích testován pro své kancerostatické vlastnosti. Vybraným modelem byla nádorová linie HL-60.

Testovanými látkami v této práci byly: Cp_2VCl_2 , $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$, a methylované deriváty $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$, $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$. Výsledné informace byly získány pomocí dvou metod – MTT-testem a Apoptestem.

Výsledná data potvrdily protinádorovou účinnost vanadocenových komplexů. Jejich hodnoty LD_{50} se pohybovaly v rozmezí 0,14 – 0,20 mmol / l. Testované vanadocenové sloučeniny indukují apoptózu u nádorové buněčné linie HL-60 spolu s *c*DDP. U komplexu TDC byla prokázána minimální schopnost indukovat apoptózu buněk HL-60.

Klíčová slova: rakovina, cytostatika, *cis*-platina, lomené metalloceny, titanocendichlorid, vanadocendichlorid, vanadocenové komplexy, MTT-test, Apoptest

ANNOTATION

Vanadocene dichloride Cp_2VCl_2 (VDC) represent the group of metallocenes which are intensively studied for their cancerostatic activity. The thesis was focused on the research of cell cytotoxicity of the vanadocene and 1,1'-dimethyl vanadocene complexes in comparison with standardly used cytostatic drug *cis*-diamminedichloroplatinum (*c*DDP). In this study was comprised also titanocene dichloride Cp_2TiCl_2 (TDC), which was the only one from the group of metallocenes clinical tested for his antitumor activity. As a model system was selected cancer cell line HL-60.

In the project were tested these substances: Cp_2VCl_2 , $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$, and methyl derivates $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$, $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$. For the testing we used two methods – MTT-test and Apoptest.

The results confirmed anticancer effect of the vanadocene complexes. The values of LD_{50} ranged between 0,14 – 0,20 mmol / l. The vanadocene compounds and *c*DDP caused the induction of apoptosis in the cell line HL-60. The minimal induction of apoptosis was proved after the exposure of the complex TDC in the cell line HL-60.

Keywords: cancer, cytostatic drugs, *cis*-platinum, metallocenes, titanocene dichloride, vanadocene dichloride, vanadocene complexes, MTT-test, Apoptest

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

aa	aminokyselina
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloblastická leukémie
Ann	Annexin
ATP	adenosintrifosfát
BB pufr	binding buffer
bb	buňky
cDDP	<i>cis</i> -platina, [Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]
Cp	cyklopentadienyl, η ⁵ -C ₅ H ₅
DMSO	dimethyl sulfoxid
dTMP	deoxythymidin monofosfát
dUMP	deoxyuridin monofosfát
EAT	Ehrlichův ascitovaný tumor
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FS	forward scatter
FTS	fetální telecí sérum
G0, G1, G2	klidové fáze buněčného cyklu
hTF	lidský sérový transferin
IMDM	Iscova modifikace Dulbeccova média
LD ₅₀	50% letální dávka

M	mitóza
MDR	multidrug resistance
MeVDC	dimethylvanadocendichlorid, $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$
MeVD-His	dimethylvanadocenhistidin, $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$
MeVD-Ox	dimethylvanadocenoalát, $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
MTX	methotrexát
ot. / min.	otáček za minut
PBS	fosfátový pufr
PI	propidiumjodid
PNC	penicilin
PS	fosfatidylserin
S	syntetická fáze buněčného cyklu
SS	side scatter
STR	streptomycin
TDC	titanocendichlorid, Cp_2TiCl_2
VD-acac	vanadocenacetylacetonát, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$
VDC	vanadocendichlorid, Cp_2VCl_2
VD-His	vanadocenhistidin, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$
VD-Ox	vanadocenoalát, $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$

OBSAH

1. ÚVOD.....	13
2. Cytostatika.....	14
2.1 Chemoterapie nádorových onemocnění.....	14
2.2 Rezistence na cytostatika.....	15
2.3 Rozdělení cytostatik.....	16
2.3.1 Alkylující látky.....	16
2.3.2 Antimetabolity.....	16
2.3.3 Rostlinné alkaloidy.....	18
2.3.4 Antibiotika.....	19
2.3.5 Hormony.....	19
2.3.6 Ostatní cytostatika.....	19
2.4 Vedlejší účinky chemoterapie.....	20
2.4.1 Myelotoxicita.....	20
2.4.2 Orální a gastrointestinální toxicita.....	21
2.4.3 Nefrotoxicita a urotoxicita.....	21
2.4.4 Neurotoxicita.....	21
2.4.5 Kardiotoxicita.....	21
2.4.6 Infertilita.....	22
2.4.7 Teratogenní účinek.....	22
2.4.8 Mutagenní účinek a sekundární malignity.....	22
3. Protinádorové sloučeniny platiny.....	23
3.1 Cis-platina.....	23
3.2 Karboplatina.....	24
3.3 Oxaliplatina.....	24
4. Lomené metalloceny.....	26
4.1 Struktura metallocenů.....	26
4.2 Vliv metallocenových derivátů na kancerostatický efekt.....	27
4.3 Mechanismus cytostatického účinku metallocenů.....	28
4.3.1 Vazba metallocenů s DNA.....	28
4.3.2 Vazba metallocenů s proteiny.....	29
4.3.3 Vazba metallocenů na mitotické vřeténko.....	29
4.4 Titanocendichlorid (TDC).....	30
4.5 Vanadocendichlorid (VDC).....	30
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
5.1 Použité přístroje a pomůcky.....	32
5.2 Použité chemikálie a roztoky.....	33
5.3 Použitá buněčná linie.....	34

5.3.1	Příprava kultivačního média.....	34
5.3.2	Rozmrazování buněk	34
5.3.3	Počítání a pasážování buněk	34
5.4	MTT-test	36
5.4.1	Princip MTT-testu	36
5.4.2	Postup při MTT-testu.....	36
5.4.2.1	<i>Příprava roztoku MTT barviva</i>	<i>36</i>
5.4.2.2	<i>Příprava buněčné suspenze</i>	<i>37</i>
5.4.2.3	<i>Příprava koncentrační řady</i>	<i>37</i>
5.4.2.4	<i>Příprava mikrotitrační desky pro chemikálie</i>	<i>38</i>
5.4.2.5	<i>Provedení detekce.....</i>	<i>39</i>
5.4.3	Vyhodnocení MTT-testu.....	41
5.5	Apoptest	43
5.5.1	Princip Apoptestu	43
5.5.2	Postup při Apoptestu.....	44
5.5.2.1	<i>Příprava buněčné linie.....</i>	<i>44</i>
5.5.2.2	<i>Příprava koncentrace chemikálií</i>	<i>44</i>
5.5.2.3	<i>Příprava roztoků pro měření.....</i>	<i>45</i>
5.5.3	Vyhodnocení Apoptestu.....	47
5.5.3.1	<i>Identifikace buněčné linie HL-60</i>	<i>47</i>
5.5.3.2	<i>Vyhodnocení fluorescenčních diagramů Apoptestu</i>	<i>50</i>
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
6.1	MTT-test	54
6.2	Apoptest	56
7.	ZÁVĚR	62
8.	Literatura.....	63

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin předčasného úmrtí v lidské populaci. Použití protinádorových chemoterapeutik je vedle chirurgického odstranění a ozáření nádoru nedílnou součástí při léčbě rakoviny.

V dnešní době lze vybírat ze širokého spektra cytostatik a indikovat je u celé řady rakovinových onemocnění. Velkou výhodou chemoterapie je možnost vzájemného kombinování cytostatik. Protože však při terapii těmito léčivy dochází k rozvoji vedlejších nežádoucích účinků, jsou z tohoto důvodu stále syntetizována a testována nová cytostatika.

Lomené metalloceny, jejichž kancerostatická aktivita byla prokázána již na konci 70. let 20. století na rozsáhlém panelu lidských nádorů, patří v současnosti mezi intenzivně studované potencionálně cytostatické sloučeniny. Do této skupiny organokovových komplexů je řazen i vanadocendichlorid a jeho odvozené deriváty, jež také vykazují cytostatický účinek.

Cílem této diplomové práce je testování vybraných vanadocenových a 1,1'-dimethylvanadocenových komplexů na lidské buněčné nádorové linii HL-60. Studovanými sloučeninami jsou: Cp_2VCl_2 , $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$, a methylované deriváty $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$, $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$ a $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$. Na základě spektrofotometrické metody stanovit 50 % letální dávku (LD_{50}) pro jednotlivé sloučeniny. Metodou průtokové cytometrie porovnat schopnost testovaných komplexů indukovat buněčnou apoptózu. Získaná data vyhodnotit a porovnat je s výsledky získanými testováním komplexu *cis*-diamminchloroplatnatého $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ a titanocendichloridu Cp_2TiCl_2 .

2. Cytostatika

Cytostatika, jsou protinádorová chemoterapeutika, která se využívají, vedle dalších terapeutických postupů (chirurgické odstranění a ozáření nádoru), k léčbě různých typů rakovinových onemocnění. Tyto sloučeniny obecně patří mezi látky cytotoxické, které svými účinky ovlivňují buněčný cyklus nádorových buněk. V dnešní době je dostupné široké spektrum těchto látek a díky tomu, je velkým pokrokem možnost volby jejich vzájemné kombinace. Ta může zesilovat účinky podávaných léčiv a také omezit vznik rezistence buněk vůči cytostatikům. Vzhledem k tomu, že tyto látky mají řadu nežádoucích účinků, využívá se při léčbě nádorů i pomocná (adjuvantní) terapie. Do této skupiny patří například látky proti zvracení (antiemetika) nebo léky zabraňující bakteriálním infekcím (antibiotika)¹.

2.1 Chemoterapie nádorových onemocnění

Hlavním cílem cytostatické léčby je bezpochyby vyléčení nemocného pacienta. Z farmakologického hlediska je cílem protinádorové chemoterapie zajištění optimálního farmakoterapeutického účinku, tedy dlouhodobé kompletní remise (zastavení růstu nádoru) tak, aby byla cytostatika maximálně účinná vůči nádorovému onemocnění, byla možná prevence vývoje rezistence a zároveň zachována minimální toxicita vůči organismu. Mezi cesty, které vedou k tomuto cíli, patří: zvyšování dávek, kombinace protinádorových léčiv, využití podpůrné terapie nebo antagonistů vedlejších nežádoucích účinků cytostatik. Dále se hledají různé kombinace cytostatik s jinou terapií. Důležitou roli hrají i vhodné cesty podání chemoterapeutik a znalosti o cirkadiálních rytmech při zjišťování farmakologických vlastností antitumorózních léčiv.

Hledá se tak vztah mezi cytostatickým účinkem a kinetikou cytostatik, který by sloužil k předpovědi účinků terapeutického a toxického, a na jehož základě je možné sestavit návrh individuálního dávkování².

Působení velkého množství cytostatik je závislé na fázi buněčného cyklu, ve kterém se nádorová buňka právě nachází. Protinádorový účinek je zaměřen na rychle se množící

buňky v proliferativní fázi, protože buňky v této fázi jsou mnohem citlivější na chemoterapii než buňky, které se nachází v klidové fázi^{1,2}.

Obecně existují dva typy fázových účinků. První typ je **fázově nespecifický účinek**, který ovlivňuje buněčný cyklus ve všech jeho fázích a buňky odumírají exponencionálně se vzrůstající dávkou. Tímto způsobem fungují např. alkylyjící látky nebo *cis*-platina. **Fázově specifický účinek** postihuje jen určité fáze buněčného cyklu a projevuje se tím více, čím je rychlejší dělení buněk. Se stoupající dávkou se rychlost usmrcení buněk sice zvyšuje, ale při vyšších dávkách dosahuje jen daného maxima. Mezi látky se specifickým účinkem řadíme například antimetabolity².

2.2 Rezistence na cytostatika

Protinádorová chemoterapeutika jsou obecně cytotoxické látky. Buňky si tedy vytváří proti nim určité ochranné postupy, tzv. rezistenci¹, která se však projevuje jen u nádorových buněk, ale nikoliv u buněk zdravých⁶.

Rezistence může být buď primární (přirozená) nebo sekundární (získaná). Primární rezistence vychází z přímé reakce organismu na podávané cytostatikum, v jejímž důsledku dochází k rozvoji vnitřních procesů vedoucích k potlačení účinku léčiva. Vykazuje-li organismus rezistenci i po změně medikace vůči jinému typu chemoterapeutika, hovoříme o rezistenci sekundární. Pokud vznikne přirozená i získaná rezistence, pak je vyžadována změna léčebného postupu^{2,5,6}.

Mechanismus vzniku rezistence nádorů na chemoterapeutika je považován za multifaktoriální⁴. Uvádí se několik způsobů, jak se buňky mohou bránit cytostatikům:

- Buňky netvoří transportní proteiny a léčivo se tak nedostává do buněk.
- Buňky mohou měnit formy enzymů a proteinů, proti kterým jsou cytostatika namířena.
- Nádorové buňky tvoří více enzymů, které opravují poškozené molekuly nádorových buněk^{3,4} (opravy mají stejnou rychlost jako poškození lékem).
- Buňky exprimují tzv. transmembránový P-glykoprotein, transportér pro mnoho látek. Protein transportuje cytostatika ven z buňky rychleji, než do buňky vstupují. Je příčinou mnohočetné rezistence řady léčiv (multidrug resistance – MDR)¹⁻⁶.

2.3 Rozdělení cytostatik

Skupiny cytostatik jsou rozlišovány podle mechanismu účinku a původu účinných látek.

2.3.1 Alkylující látky²⁻⁶

Tyto látky (deriváty dusíkatého yperitu) obsahují ve své molekule bis(2-chlorethyl) aminoskupiny. Jsou to velmi reaktivní sloučeniny, které zastavují buněčné dělení tím, že se váží pevnou kovalentní vazbou na molekuly DNA. Řetězce se deformují, spojují dohromady a buňka se nemůže dělit.

Hlavními zástupci jsou **cyklofamid** a **ifosfamid**. Mění se v organismu na metabolický produkt akrolein, který poškozuje močový systém. Tomuto nežádoucímu účinku se zabraňuje podáním merkaptoethansulfonátu sodného, tzv. mesny, který se na akrolein váže. Do této skupiny patří dále **mechloreタミン** a **melfalan**.

Alkylující látky se používají k léčbě Hodgkinova lymfomu, některých solidních tumorů (nádory ovárií a prsu), nefrotického syndromu, leukémie a při transplantaci kostní dřeně. Mezi jejich nežádoucí účinky patří: urotoxicita, hematologická toxicita a gastrotoxicita.

Deriváty nitrosomočoviny^{2,5,6}, jimiž jsou **karmustin** a **lomustin**, se řadí svým antitumorózním účinkem také mezi alkylační látky. Ve fyziologickém prostředí se deriváty mění na účinný 2-chlorethyldiazonový kation. Velkou výhodou těchto cytostatik je rozpustnost v tucích, kterou využívají k průniku do centrálního nervového systému, a proto jsou indikovány v jiné oblasti než výše zmíněná cytostatika. Deriváty nitrosomočoviny se používají zejména k léčbě primárních a metastatických tumorů mozku. Vedlejší účinky zahrnují myelosupresi, pocit na zvracení (nauzeu) a zvracení (vomitus), ztrátu vlasů (alopecii) a neplodnost (infertilitu).

2.3.2 Antimetabolity

Cytostatika, která působí jako antagonisté endogenních metabolitů v buňkách, se nazývají antimetabolity. Tyto látky ovlivňují metabolické pochody, které probíhají

v buňce. Antimetabolity působí na průběh enzymové reakce nebo na její produkt. Enzym pak rozpoznává chemicky modifikovanou strukturu látky, která je podobná struktuře přirozené látky.

Rozdělují se do tří skupin: antagonisté kyseliny listové, antagonisté purinů a antagonisté pyrimidinů.

Hlavním antagonistou kyseliny listové, která je nezbytná pro syntézu DNA, je **methotrexát** (MTX, antifolát), který se využívá k léčbě lymfoblastických leukémií a solidních nádorů. Vedle cytotoxických účinků má MTX i imunosupresivní a protizánětlivé účinky. MTX má jako jediný svého antagonistu – leukovarin (kyselina folinová), což umožňuje použití širokého spektra dávek a snižuje se tím jeho toxicita. Mezi vedlejší účinky se řadí hematologická toxicita, alopecie a mukozitidy (při vyšších dávkách) ²⁻⁶.

6-merkaptopurin ^{2,6} (6-aminopurin) je derivátem adeninu a 6-hydroxypurinu. V nádorových buňkách se bioaktivuje na účinné thiopuriny a jejich nukleotidy. Je antagonistou syntézy purinů *de novo*, a tím inhibuje tvorbu RNA a DNA. Využívá se zejména u akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Jeho indikace je provázena myelosupresí a hematologickou toxicitou.

Nové antimetabolity purinů zastupují **fludarabin**, **kladribin** a **pentostatin**. Tyto sloučeniny blokují enzym adenosindeaminázu, která zahajuje degradaci nukleosidů adeninu. Inhibicí tohoto enzymu dochází k nahromadění adeninových nukleosidů, a tím je způsoben toxický efekt fludarabinu, kladribinu a pentostatinu. Jsou užívány k léčbě lymfatickým nádorů. Nežádoucí účinky jsou oportunní infekce a myelosuprese.

K antagonistům pyrimidinů se řadí cytarabin a 5-flourouracil ²⁻⁶. **Cytarabin** (cytosin arabinosid) je derivátem deoxycytidinu, který zřejmě kompetitivně blokuje enzym DNA-polymerázu. Indikuje se např. u chronické lymfoblastické leukémie a non-Hodgkinových lymfomů. Vedlejší účinky zahrnují útlum kostní dřeně, stomatitidy a emetogenní obtíže.

5-flourouracil je v buňce aktivován fosforylací na dva důležité antimetabolity 5-flourouridin monofosfát a 5-flourodeoxyuridin monofosfát. 5-flourouridin monofosfát se vmezeřuje do různých typů RNA a ovlivňuje tak jejich funkce. Druhý antimetabolit 5-

flourodeoxyuridin monofosfát se kovalentně váže na enzym thymidylátsyntázu (enzym zodpovědný za konverzi deoxyuridin monofosfátu – dUMP na deoxythymidin monofosfát – dTMP), čímž inhibuje syntézu DNA *de novo*. Toto cytostatikum se používá k léčbě solidních nádorů (karcinom prsu, hlavy a krku) a kolorektálních karcinomů. Toxicita 5-fluorouracilu se projevuje zejména hematologickou toxicitou a mukozitidami.

2.3.3 Rostlinné alkaloidy

Vinkristin a **vinblastin** pochází z barvínku růžového (*Vinca rosea*). Patří mezi tzv. vřeténkové jedy. Zastavují mitózu tím, že přeruší shlukování mikrotubulů vřeténkových vláken a následkem toho neprobíhá buněčné dělení⁴. Používají se k léčbě ALL, Hodgkinovy choroby a solidních tumorů (karcinom prsu, testikulární karcinom). Nežádoucí účinky jsou neurotoxicita (vinkristin) a myelosuprese (vinblastin). Mezi nové zástupce alkaloidů se řadí **vindesin** a **vinorelbin**, které se indikují u nemalobuněčného karcinomu plic²⁻⁶.

Taxany – **paklitaxel** (taxol) a **docetaxel** – se izolují z kůry tisu pacifického (*Taxus brevifolia*). V současné době se však vyrábí polosynteticky. Jsou to jedny z nejsilnějších cytostatik vůbec. Hlavním principem jejich účinku je zabránění depolymerizace mikrotubulů, čímž vznikají netypické mikrotubuly. Příznivou odpověď na tato cytostatika vykazují karcinomy ovarií a karcinomy prsu. Vedlejší účinky zahrnují neutropenii, alopecii, popř. mukozitidy²⁻⁶.

Podofylotoxiny se extrahují například z kořene noholistu štítnatého (*Podophyllum peltatum*). **Etopozid** a **tenipozid** jsou polysyntetické alkaloidy, které obsahují účinnou látku podofylotoxin. Inhibují topoizomerázu II, která je zodpovědná za správné udržování a opravu chromozomální DNA. Následkem inhibice enzymu dochází k ireverzibilnímu poškození aparátu buňky. Podofylotoxiny se indikují např. u solidních nádorů, Hodgkinovy choroby, mozkových tumorů a ALL. Myelosuprese, alopecie a mukozitidy provází léčbu těmito chemoterapeutiky²⁻⁶.

2.3.4 Antibiotika

Do této skupiny se řadí hlavně antracykliny – **doxorubicin** a **daunorubicin**. Mají schopnost se vmezeřovat mezi páry bazí DNA a blokovat tak topoizomerázu II. Tímto způsobem inhibují replikaci a transkripci DNA a RNA. V jejich přítomnosti se uvolňují navíc reaktivní sloučeniny kyslíku, což má za následek peroxidaci lipidů a poškození myokardu. Antracykliny se užívají k léčbě ALL, akutní myeloblastické leukémie (AML), Hodgkinovy choroby, non-Hodgkinových lymfomů a solidních tumorů (karcinom prsu, osteosarkom). Chemoterapie je provázena zejména kardiotoxicitou, myelosupresí, gastrotoxicitou a alopecii²⁻⁶.

Dalšími zástupci antibiotik s cytostatickým efektem jsou **mitoxantron** a **bleomycin**.

2.3.5 Hormony²

Steroidní hormony se váží na receptorové proteiny v nádorových buňkách. Míra odpovědi buňky na léčbu je závislá na množství receptorů v buňce. V určitých nádorových buňkách byly nalezeny receptory specifické pro estrogeny (estrogen- pozitivní karcinomy prsu), androgeny (v karcinomu prostaty) a pro kortikoidy (v prednison-senzitivních lymfomech).

Mezi antiestrogeny patří **tamoxifen**, který blokuje receptory pro estrogeny v buněčném tumoru. Antiandrogeny zastupuje **flutamid**, nesteroidní hormon, který brání účinkům testosteronu na cílovou tkáň. Tuto léčbu provází např. nauzea a tromboembolické komplikace.

Do skupiny hormonů patří bezpochyby **glukokortikoidy**. Jejich užití vede k rozpadu lymfocytů, a tím se mohou indikovat u akutní leukémie, lymfomů a ostatních hematologických malignit.

2.3.6 Ostatní cytostatika

Asparagináza², enzym izolovaný z mikroorganismů *E. coli* nebo *Erwinia carotovora*, snižuje plazmatickou koncentraci asparaginu a glutaminu. Na základě toho některé leukemické buňky nemohou využít tyto aminokyseliny (aa) jako zdroj pro svůj

růst. Asparagináza se používá k léčbě ALL, která je však provázena hepatotoxicitou, hematologickou toxicitou, pankreatitidou a neurotoxicitou. Objevují se i alergické reakce.

Užití **prokarbazinu** má za následek oslabení struktury nukleových kyselin, snížení jejich viskozity a poškození chromosomů. Toto cytostatikum je součástí kombinovaných postupů, zejména u Hodgkinovy choroby. Toxicita představuje riziko leukopenie a trombocytopenie ^{2,3,5}.

Interferon α se používá u pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem, myeloidní leukémií a k léčbě Kaposiho sarkomu u nemocných s AIDS ².

Irinotecan a **topotecan**, inhibitory topoizomerázy I, se indikují u žaludečních a kolorektálních karcinomů, malobuněčného karcinomu plic a karcinomu ovaria rezistentního na léčbu *cis*-platinou. Léčbu provází hlavně průjemy ^{2,5}.

Cis-platina, oxaliplatina, karboplatina budou zvlášť popsány v kapitole 3.

2.4 Vedlejší účinky chemoterapie

Vzhledem k tomu, že protinádorová chemoterapeutika jsou cytotoxické látky a působí na rychle se dělící buňky – nádorové buňky, působí zároveň na zdravé vlasové folikuly, buňky střevního traktu či buňky kostní dřeně. Tento fakt je přímou příčinou řady nežádoucích účinků, které je třeba vzít při návrhu farmakoterapie v potaz.

2.4.1 Myelotoxicita

Myelotoxicita (poškození myeloidní řady kostní dřeně) má postupný vývoj. Nejdříve cytostatika postihují granulocyty (neutropenie), poté krevní destičky (trombocytopenie) a na závěr erytrocyty (anémie). Podáním hematopoetických růstových faktorů (kolonie stimulující faktor granulocytů G-CSF, kolonie stimulující faktor

granulocytární a monocytární linie GM-CSF) nebo autologních kmenových buněk lze snížit riziko toxicity cytostatik^{1,2,5}.

2.4.2 Orální a gastrointestinální toxicita

Velmi často se po chemoterapii objevuje nauzea a vomitus. Tyto projevy jsou však přímo závislé např. na cestě podání cytostatika a množství užití dávky. Tyto komplikace se dají zmírnit antiemetiky. Mukozitidy vznikají následkem perorálního podávání chemoterapeutik, kdy je porušena sliznice úst, a tím se pacient stává velmi citlivým k infekcím^{1,2,5}.

2.4.3 Nefrotoxicita a urotoxicita

Poškození ledvin má více příčin. Toxicita cytostatik se projevuje zejména u ledvinných tubulů, které jsou velmi dobře zásobené krví a navíc odstraňují účinné látky z těla ven. Důležité je zajištění hydratace pacienta. Močový měchýř je místem, kde se chemoterapeutika mohou hromadit a způsobit až renální selhání nebo fatální krvácení. Preventivně se podává mesna^{1,2,5}.

2.4.4 Neurotoxicita

Neurotoxicita se vyznačuje parestezií, motorickými poruchami prstů, křečemi a také zácpou už v začátku léčebného procesu. Leukovarin se doporučuje ke zmírnění těchto nežádoucích účinků^{1,2,5}.

2.4.5 Kardiotoxicita

Tento negativní účinek je zřejmě způsobován oxidativním stresem tkáně poškozené reaktivními sloučeninami kyslíku. Akutní kardiotoxicita se klinicky dobře zvládá podáním antiarytmik. Chronická kardiotoxicita projevující se např. tachykardií, tachypnoí a dilatací srdce, velmi často ohrožuje život pacienta^{1,2,5}.

2.4.6 Infertilita

Cytostatika mohou způsobovat neplodnost. K této komplikaci dochází zejména u mužů. U žen jsou tyto vedlejší účinky daleko méně časté^{1,2,5}.

2.4.7 Teratogenní účinek

Citace podle Lincové²: „*Prakticky všechna cytostatika mohou působit teratogenně*“. Pokud je tedy nutné podávat chemoterapeutika těhotným ženám, pak lze předpokládat vrozené malformace plodu.

2.4.8 Mutagenní účinek a sekundární malignity

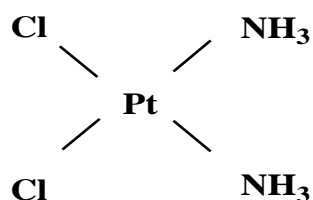
Mutagenní účinek cytostatik spočívá ve schopnosti narušovat metabolické procesy DNA, čímž může docházet i ke změnám v genetické výbavě nekarcinogenních buněk. Tímto se vysvětluje např. vznik leukémie, k jejímuž rozvoji dojde i několik let po ukončení léčby chemoterapeutiky (sekundární malignity)^{1,2,5}.

3. Protinádorové sloučeniny platiny

3.1 *Cis*-platina

V roce 1965 byla *cis*-diaminodichloroplatina (*cis*-platina, *cDDP*) zcela náhodně objevena profesorem Barnettem Rosenbergem a jeho spolupracovníky ⁷, během studia působení elektrolýzy na růst mikroorganismu *E. coli*, za užití platinové elektrody a chloridu amonného, jako elektrolytu.

Protinádorový účinek *cDDP* (obr. 1) spočívá v tom, že reaktivní atom Pt tvoří koordinační vazby s atomy dusíku purinových i pyrimidinových bazí a kovalentně se váže na N7-polohu guaninu a N3-polohu cytidinu v DNA ^{8,9}. Dále jsou narušeny i Watson-Crickovy vodíkové vazby mezi guanosinem a cytidinem ¹⁰. Následkem působení *cis*-platiny dochází k zastavení replikace DNA a nádorová buňka hyne programovanou buněčnou smrtí (apoptóza).



Obr. 1: Struktura *cis*-platiny.

Cis-platina se v dnešní době používá zejména při léčbě nádorů varlat, vaječníků a rakoviny prsu. Indikována je i u nemalobuněčného karcinomu plic, rakoviny hlavy a krku ¹¹. I přes úspěchy v léčbě některých typů nádorů má toto protinádorové cytostatikum nevýhodu vysoké nefrotoxicity ¹². Navíc je *cDDP* silně emetogenní.

Z důvodu vedlejších nežádoucích účinků *cis*-platiny a vzniku rezistence některých druhů nádorů při léčbě tímto chemoterapeutikem, byla syntetizována celá řada nových sloučenin obsahujících reaktivní atom platiny ¹³. Byly vyvinuty například modifikované *trans*-izomery platiny ¹⁴⁻¹⁶, jednojaderné komplexy ¹⁷ a vícejaderné komplexy ¹⁸⁻²¹, které

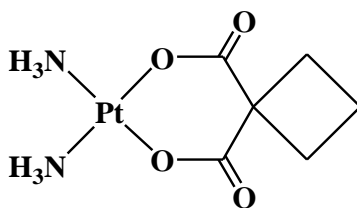
mají ve srovnání s *cis*-platinou buď podobné nebo odlišné mechanismy cytotoxického účinku.

I přes velké množství nově syntetizovaných derivátů *cis*-platin, se v klinické praxi při léčbě rakoviny uplatnily zejména dva komplexy, a těmi jsou karboplatina a oxaliplatina.

3.2 Karboplatina

Druhou generaci sloučenin platiny zastupuje *cis*-diammin-cyklobutan-1,1'-dikarboxylátplatnatý komplex, triviálním názvem karboplatina^{6,12,22} (obr. 2).

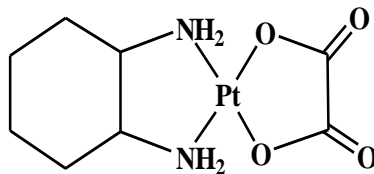
Hlavním mechanismem jejího antitumorózního vlivu je inhibice syntézy DNA. Karboplatina našla uplatnění zejména v léčbě nádorů prsu, ovárií a varlat. Přesto, že není její nefrotoxicita tak vysoká jako u *c*DDP, jejím nedostatkem je hematologická toxicita.



Obr. 2: Struktura karboplatiny.

3.3 Oxaliplatina

Třetí generaci sloučenin platiny představuje 1*R*,2*R*-diammin-cyklohexan-oxalátplatnatý komplex, který se v klinické praxi nazývá oxaliplatina^{23,24} (obr. 3).



Obr. 3: Struktura oxaliplatiny.

Oxaliplatina tvoří kovalentní vazby mezi bazemi DNA, a to jak uvnitř vláken, tak i mezi vlákny DNA, v čemž spočívá její mechanismus cytotoxického účinku. Přesto se od *cis*-platiny liší.

*c*DDP má protinádorové účinky jen tehdy, když jsou přítomny tzv. intaktní geny odpovědné za reparaci DNA, zatímco oxaliplatina vykazuje cytotoxicitu i při defektech výše zmiňovaných genů. Poškození intaktních genů se objevuje zejména u kolorektálních karcinomů, na které *cis*-platina neúčinkuje. Oxaliplatina však vykazuje cytostatický efekt na kolorektální nádory, a proto je v této oblasti běžně indikována ²⁵.

Z hlediska dalšího použití našla oxaliplatina uplatnění i při chemoterapii karcinomu žaludku, karcinomu slinivky, a dále pak při léčbě karcinomu ovaríí, varlat a prsu.

Velkou výhodou oxaliplatiny je synergismus cytotoxického účinku s některými dalšími protinádorovými léky. Kombinuje se například s 5-fluorouracilem a leukovarinem ²⁶. Ve výzkumu je i kombinace oxaliplatiny s epirubicinem a docetaxelem, která přináší lepší toxický profil než při použití *cis*-platiny ²⁷.

Při léčbě oxaliplatinou se objevuje buď akutní neurotoxicita, která je vratná ²⁸, nebo chronická neuropatie, která je závislá na zvyšujících se dávkách tohoto chemoterapeutika ^{3,29}.

4. Lomené metalloceny

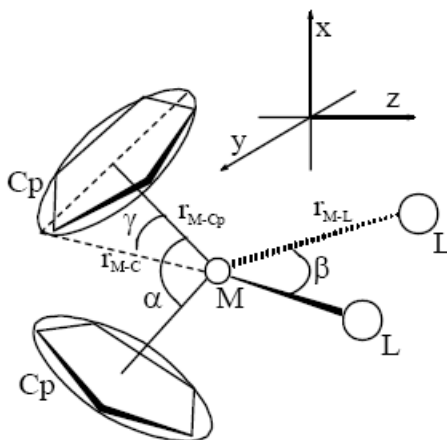
Lomené metalloceny jsou skupinou látek, která je strukturně obdobná s cytostaticky aktivními sloučeninami platiny. Na základě této skutečnosti jsou tyto organokovové komplexy intenzivně studovány pro své antitumorové účinky.

4.1 Struktura metallocenů

Lomené metalloceny jsou skupinou látek, která je strukturně obdobná s cytostaticky aktivními sloučeninami platiny. Na základě této skutečnosti jsou tyto organokovové komplexy intenzivně studovány pro své antitumorové účinky.

Metallocenové komplexy s obecnou strukturou $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{ML}_2$ (obr. 4) představují skupinu neutrálních bis(cyklopentadienylových) sloučenin, které obsahují jako centrální atom (M) přechodný kov Ti, V, Mo a Nb v oxidačním stavu +IV. Dva cyklopentadienové kruhy (Cp) jsou nespecifickou η^5 vazbou vázány k centrálnímu kovu, k němuž se kovalentně váží i dva acidoligandy (L). Ligandy mohou být zastoupeny halogenidy (Cl, Br, I), pseudohalogenidy (CN, SCN, OCN, N₃...) nebo také fenoláty, thiofenoláty a dalšími skupinami.

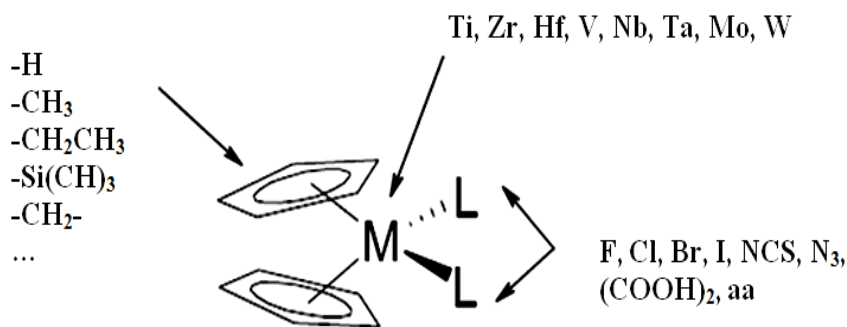
Již v roce 1979 byly díky manželům Köpfovým prokázány kancerostatické vlastnosti metallocendihalogenidů, kteří tyto komplexy studovali z hlediska biologické aktivity^{30,31}.



Obr. 4: Molekula lomeného metallocenu.

4.2 Vliv metallocenových derivátů na kancerostatický efekt

Pro testování antitumorových vlastností lomených metallocenů byl manželzy Köpfovými zvolen základní nádorový systém, a to Ehrlichův ascitový tumor (EAT). Jednotlivé deriváty metallocenů, které se mohou od sebe navzájem lišit centrálním atomem, acidoligandem nebo i rozdílnou substitucí na cyklopentadienových kruzích (obr. 5), byly testovány na EAT *in vivo* ³².



Obr. 5: Deriváty lomených metallocenů.

U metallocendihalogenidů Cp_2MX_2 , kde X je Cl a M jsou Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, Mo, a W, bylo zjištěno, že největší vliv na cytostatický účinek má právě centrální **atom kovu**. Komplexy, kde centrální atom je zastoupen titanem, vanadem, molybdenem a niobem vykazovaly podstatně vyšší protinádorovou aktivitu oproti sloučeninám s tantalem a wolframem. Komplexy se zirkoniem a hafniem byly zcela neúčinné.

Další z možností ovlivnění cytostatického efektu je změna **acidoligandu**, která byla testována na titanocendichloridu Cp_2TiCl_2 (TDC). Výměna chloridového ligandu za jakýkoliv jiný acidoligand, například Br, I, NCS, není spojena se zásadním vlivem na kancerostatickou účinnost.

Při studiu vlivu modifikace **cyklopentadienových kruhů** (Cp kruhy) na EAT byly použity deriváty TDC. Na Cp kruzích mohou být substituovány odlišné organické zbytky, jako jsou například $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-Si(CH_3)_3$ a $-CH_2-$.

Byl prokázán pokles antitumorové aktivity testovaných látek sloučenin, a to takto: nesubstituovaný derivát > monosubstituce > 1,1' disubstituce > ansa (1,1' můstek) > dekasubstituce.

V posledních letech se ukazuje, že některé substituované deriváty mohou mít mnohonásobně vyšší aktivitu vůči některým typům nádorů, oproti TDC³³.

Experimentální biologické výsledky ale také ukazují, že například titanocenové komplexy s aminokyselinami $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{aa})_2]\text{Cl}_2$ mají nižší kancerostatický účinek, oproti samotnému titanocendichloridu^{34,35}.

Testování cytotoxického vlivu derivátů VDC, kde ligandem je například aminokyselina nebo dikarboxylová kyselina, se stal předmětem této diplomové práce. Výsledky jsou shrnuty v kapitole 6.

4.3 Mechanismus cytostatického účinku metallocenů

Kancerostatické chování skupiny lomených metallocenů bylo prokázáno na rozsáhlém panelu³² zvířecích i lidských nádorových linií, například na EAT, lymfoidní leukémii L1210, lymfocytární leukémii P388, Lewisově plicním karcinomu, melanomu B16, na některých střevních karcinomech a jiných.

Samotný mechanismus účinku lomených metallocenů však stále není zcela znám.

Z doposud dosažených experimentálních výsledků vyplývá, že by metallocenové částice, nebo jejich metabolity, mohly ovlivňovat buď molekuly DNA nebo proteiny, které jsou nezbytnou součástí jejich struktur (histony), a které jsou důležité pro správnou funkci a metabolismus (nehistonové proteiny, enzymy - topoisomeráza II a proteinkináza C) nukleových kyselin^{36,37}.

4.3.1 Vazba metallocenů s DNA

K průkazu vlivu metallocendihalogenidů (TDC a VDC) na metabolismus DNA a RNA byl použit test inkorporace značených prekurzorů (DNA – thymidin, RNA – uridin, proteiny – leucin). Výsledek potvrdil, že oba studované komplexy inhibují syntézu nukleových kyselin^{39,40}.

Studium subcelulární distribuce kovů prokázalo v buněčných oblastech, které jsou bohaté na nukleové kyseliny, hromadění kovů právě v těchto lokalitách. V jaderném heterochromatinu byly nalezené koncentrace nejvyšší, v euchromatinu, jadérku a ribosomech koncentrace značně poklesly. V mitochondriích se kov nevyskytoval^{41,42}.

4.3.2 Vazba metalocenů s proteiny

Hlavními transportními proteiny kovů v lidském séru jsou **transferin (hTF)** a albumin. Zároveň bylo zjištěno, že transferin se ve vysoké míře nachází na povrchu nádorových buněk, což je nejspíše zapříčiněno jejich zvýšenými nároky na metabolismus, růst a vývoj buněk.

Bylo prokázáno, že TDC má schopnost se vázat na hTF za nutné účasti adenosintrifosfátu (ATP). Cyklopentadienové kruhy se uvolní a titan zaujímá vazebné místo pro železitý kation za vzniku přechodného komplexu Ti_2 -hTF. Poté je však titan částečně vytěsněn díky vlivu Fe (+III) a vzniká komplex $Fe_C Ti_N$ -hTF. Zatím se neprokázala možnost rozpoznání komplexu buněčným receptorem pro transferin⁴³.

V nedávné době byla zkoumána vazba VDC na hTF. Ze zjištěných dat vyplývá, že dochází ke změně v sekundární struktuře hTF v důsledku vazby aminového zbytku proteinu s atomem V (+IV)⁴⁴. Je to tedy možná cesta transportu metallocendihalogenidů a jejich dodání k cílovým nádorovým buňkám.

Metallocendihalogenidy také značně inhibují enzymy **proteinkinázu C** a **topoizomerázu II**⁴⁵. Proteinkináza C je zodpovědná za buněčnou proliferaci a topoizomerázy jsou enzymy, které katalyzují změny v terciální struktuře DNA a jejich působením dochází ke změně α -helixu. Aktivitu proteinkinázy C zastavují VDC a MDC (molybdenocen). VDC a NDC (niobocen) mají schopnost inhibovat topoizomerázu II.

4.3.3 Vazba metalocenů na mitotické vřeténko

Při testování vanadocendichloridu (VDC) bylo prokázáno, že tento komplex je schopen přerušovat mitotické vřeténko. Dochází ke vzniku jiného uspořádání v buňce, a

tím k zastavení buněčného dělení ve fázi G2/M buněčného cyklu³⁸. Tento účinek by mohl být dalším možným mechanismem cytostatického efektu na rakovinotvorné buňky.

4.4 Titanocendichlorid (TDC)

Neutrální komplex titanocendichlorid (Cp_2TiCl_2) jako jediný ze skupiny metallocendihalogenidů vstoupil do klinického testování, díky svým významným antitumorovým vlastnostem.

První fáze klinických zkoušek skončila v roce 1993. TDC i přesto, že vykazoval některé nežádoucí účinky, jako například nefrotoxicitu a nauzeu, neměl žádný toxický efekt na proliferativní aktivitu kostní dřeně. Z tohoto důvodu vstoupil o rok později do druhé fáze testování. TDC byl podáván pacientům s pokročilým renálním karcinomem a prsním metastatickým karcinomem, ale jeho výsledný efekt nebyl dostačující k tomu, aby byla zahájena třetí fáze klinického testování³⁵.

Důvodem ukončení poslední fáze klinického testování je i fakt, že mechanismus cytostatického účinku tohoto organokovového komplexu nebyl dosud přesně popsán. Přesto s velkou pravděpodobností se mechanismus TDC liší od ostatních metallocendihalogenidů a také od *cis*-platiny.

Na některých typech nádorových linií se prokázala vyšší účinnost TDC než při užití *c*DDP. Jedná se i o nádory, které jsou na *c*DDP rezistentní. Na nádorové linii A2780 (linie karcinomu ovarii) bylo prokázáno, že TDC podporuje inhibici buněčného dělení na rozhraní pozdní S fáze a počátku G2 fáze⁴⁶.

4.5 Vanadocendichlorid (VDC)

Vanadocendichlorid (**1**, VDC, Cp_2VCl_2) je stejně tak jako TDC neutrální organokovový komplex, který patří do skupiny metallocendihalogenidů. Na centrální atom vanadu s oxidačním číslem +IV jsou vázány η^5 -způsobem dva cyklopentadienové kruhy a kovalentní vazbou dva chloridové ligandy.

Stejně jako ostatní ze skupiny metallocendihalogenidů, u kterých byly prokázány antitumorové vlastnosti na širokém spektru karcinomů (viz kap. 4.3), tak i VDC vykazuje vysokou cytostatickou aktivitu.

Kancerostatický efekt VDC byl prokázán na řadě nádorových linií. Testování VDC probíhalo *in vitro* například na lidském epidermálním karcinomu (Hep-2)⁴⁷, na lidských leukemických buňkách (NALM-6)⁴⁸ nebo na testikulárních rakovinných buňkách (Tera-2 a Ntera-2)⁴⁹, kde VDC vykazoval oproti ostatním metallocendihalogenidům nejvyšší cytostatický efekt. Jeho antitumorózní efekt byl prokázán také *in vivo*, kdy byl VDC testován na myším adenokarcinomu linie TA3Ha. Oproti *c*DDP nevykazoval nefrotoxické ani gastrotoxické vedlejší účinky⁴⁷.

Mimo cytotoxických vlastností jsou lomené vanadoceny (+IV) testovány pro svoji spermicidní aktivitu. Zejména vanadocen dithiokarbamát (VDDTC) byl zkoušen *in vivo* na králičím a prasečím modelu. Zjistilo se, že VDDTC inhibuje pohyb spermií bez nežádoucí vedlejší toxicity. Díky tomuto účinku se mohou stát vanadocenové komplexy slibnou skupinou antikoncepčních přípravků⁵⁰.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité přístroje a pomůcky

analytické váhy – METTLER AE 240

centrifuga – Schoeller instruments, UNIVERSAL 32R

chladnička CALEX C-370

CO₂ inkubátor – SANYO

parní sterilizátor (autokláv) – HS 121A

průtokový cytometr CyAn ADP – DakoCytomation

sterilní box ABH 2000 – UNIMAK

světelný mikroskop

universal microplate reader FLUOstar OPTIMA – BMG LABTECH

Summit Software 4.3 - DakoCytomation

Sterilní kultivační láhve, sterilní kryozkumavky, skleněná kádinka, sterilní mikrozukavky, sterilní 96 jamkové mikrolesky typu P, kultivační rakvičky TPP, buněčný filtr (Fischer Scientific; MCE; 0,2 μm), sterilní jehly a injekční stříkačky (2 ml, 5 ml), centrifugační zkumavky, faxové zkumavky, multikanálová mikropipeta (SOCOREX, CALIBRA 852), mikropipety (Nichyrio), sterilní špičky na mikropipety, Bürkerova komůrka a krycí skla.

5.2 Použité chemikálie a roztoky

Annexin V-FITC Kit – DakoCytomation:

100 μ l Annexin V-FITC, 250 μ g PI, 3 x 1,7 ml 10 x koncent. binding pufr (BB pufr)

antibiotika: penicilin (PNC) a streptomycin (STR) – Sigma-Aldrich

dimethyl sulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich

ethanol bezvodý – p.a., Lachema Brno, a.s.

fetální telecí sérum (20 %) – Sigma-Aldrich

formaldehyd – p.a., Lachema Brno, a.s.

fosfátový pufr (10x koncentrovaný) - pH 7,4 (PBS) – Sigma-Aldrich

glutamin – PAA

glycerol (10 %) – p.a., Lachema Brno, a.s.

HCl (1 M) – p.a., Lachema

Iscova modifikace Dulbeccova média – Sigma-Aldrich

MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid)- Aldrich

NaCl – p.a., Lachema Brno, a.s.

2-propanol – p.a., Lachema Brno, a.s.

propidium jodid (PI), (5 mg / 1 ml deionizované vody) – Sigma-Aldrich

Trypanová modř – Sigma-Aldrich

voda destilovaná, deionizovaná

testované látky **1 – 8** – Katedra obecné a anorganické chemie, Univerzita Pardubice

cis-platina – Sigma-Aldrich (látko **9**)

1	VDC	Cp_2VCl_2
2	MeVDC	$(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$
3	VD-Ox	$\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$
4	MeVD-Ox	$(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$
5	VD-His	$[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$
6	MeVD-His	$[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$
7	VD-acac	$[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$
8	TDC	Cp_2TiCl_2
9	<i>c</i> DDP	$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$

5.3 Použitá buněčná linie

Pro testování vybraných látek byla použita buněčná linie HL-60, která představuje leukemické prekurzory odvozené od blastů a promyelocytů akutní lidské promyelocytární leukémie. Nádorová linie byla získána z Evropské sbírky buněčných kultur (Porton Down, Salisbury, Velká Británie).

5.3.1 Příprava kultivačního média

Pro kultivaci buněk byla použita Iscova modifikace Dulbeccova média (IMDM). 50 ml kultivačního média obsahuje: 38 ml IMDM, 10 ml 20 % fetálního telecího séra, 1 ml glutaminu a 1 ml roztoku antibiotik (penicilin + streptomycin).

5.3.2 Rozmrazování buněk

Zamrazené buňky jsou v kryozkumavce vkládány do skleněné kádinky s vodou o teplotě 37° C. Po důkladném rozmrazení je vnější povrch zkumavky vydezinfikován roztokem 90 % ethanolu. Do sterilní kultivační láhve obsahující 10 ml čerstvého roztoku IMDM je přepipetován celý obsah zkumavky. Kultivační láhev je dána do inkubátoru na 24 hodin (37° C, 5% CO₂). Uzávěr láhve je mírně povolený.

Po 24 hodinové kultivaci jsou buňky sterilně přeneseny do centrifugační zkumavky a poté centrifugovány při daných podmínkách (10 minut, 1100 ot. / min., 20° C). Do nové kultivační láhve s 10 ml čerstvého média je přenesen sediment s 1 ml IMDM. Takto upravený sediment je znovu inkubován.

5.3.3 Počítání a pasážování buněk

Z kultivační láhve je do zkumavky napipetováno 50 µl buněčné suspenze, k ní je přidán stejný objem roztoku trypanové modři a celý obsah je důkladně protřepán. Bürkerova komůrka je naplněna suspenzí buněk. Buňky jsou počítány v 50 čtvcích. Výsledný počet buněk (p) udává koncentraci buněk v IMDM: $p \times 10^4$ buněk / ml.

Po stanovení aktuální koncentrace jsou buňky dále naředěny médiem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 2×10^5 buněk / ml. Posléze jsou inkubovány 24 hodin. Pasážování buněk je prováděno každý druhý den. Je doporučováno opakovat pasážování maximálně dvacetkrát, aby byly zachovány optimální vlastnosti buněčné linie.

5.4 MTT-test

5.4.1 Princip MTT-testu

MTT test je spektrofotometrická metoda, jejíž princip byl popsán v roce 1983 Timem Mosmannem⁵¹. V současné době patří mezi standardní, běžně používané techniky^{34,38}, které umožňují rychlé a přesné stanovení zastoupení živých buněk v buněčných suspenzích *in vitro*, sledování míry buněčné proliferace či testování cytotoxicity chemikálií.

Test je založen na jednoduchém principu, kdy dochází vlivem mitochondriální dehydrogenázy živých buněk⁵² k redukci tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) na její redukovanou formu MTT formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenylnitrazolium formazan). Barevná změna je následně detekována spektrofotometricky. Z původně žlutého roztoku ($\alpha_{\max} = 378 \text{ nm}$) vznikají fialové krystalky ($\alpha_{\max} = 570 \text{ nm}$), které se detekují. Po přidání roztoku HCl / 2-propanol (1:24) dochází k zastavení enzymatické reakce^{52,53}.

MTT se běžně používá ke stanovení cytotoxické aktivity lomených metalocenů^{33,48}. Na základě toho byl využit k testování vybraných vanadocenových komplexů v této práci. Struktury testovaných chemikálií jsou uvedeny v příloze 1.

5.4.2 Postup při MTT-testu

5.4.2.1 Příprava roztoku MTT barviva

Pro test bylo naváženo 50 mg barviva MTT a kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 25 ml. Navážka byla rozpuštěna v roztoku PBS a doplněna do objemu 25 ml. Výsledná koncentrace byla 2 mg MTT/ 1 ml PBS. Odměrná baňka byla obalena alobalem, aby se zamezilo přístupu světla. Roztok byl uchován ve tmě při teplotě 4° C.

5.4.2.2 Příprava buněčné suspenze

Pasážované buňky byly přepočítány a byla tak zjištěna jejich aktuální koncentrace. Po přenesení buněk do nové kultivační láhve byla jejich koncentrace upravena čerstvým IMDM médiem na koncentraci 3×10^5 bb/ ml. Poté byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37° C, v prostředí 5% CO₂ po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinové inkubaci byla buněčná suspenze znovu naředěna čerstvým médiem na koncentraci $7,5 \times 10^5$ bb / 1 ml.

5.4.2.3 Příprava koncentrační řady

Tento a navazující postupy byly prováděny pouze v prostředí sterilního boxu. Testované chemikálie **1 – 8**, které nebyly syntetizovány v p.a. čistotě, obsahují chloridy. Na molekulovou hmotnost chemikálie připadá ekvivalentní množství chloridů v poměru 1:1. Proto bylo nutné tento fakt vzít v potaz a započítat hmotnostní faktor chloridů do výpočtu navážek testovaných látek.

Roztoky testovaných chemikálií byly připraveny o výchozí koncentraci 10 mmol / l v objemu 1,4 ml. V mikrozkuvkách byly v 1,4 ml roztoku IMDM rozpuštěny navážky látek **1 - 7** (tab. 1). Navážky látek **8 a 9** byly nejprve rozpuštěny v 140 µl DMSO, a poté v 1260 µl IMDM (1:9). Za použití injekční stříkačky a buněčného filtru byly tyto nesterilní roztoky přefiltrovány do nových sterilních mikrozkuvek. Postupným ředěním výchozího roztoku médiem byly připraveny koncentrační řady testovaných látek v rozmezí 10 – 0,01 mmol / l.

Tab. 1: Navážky chemikálií pro přípravu 10 mmol/l o objemu 1,4 ml

Chemikálie	M (g.mol ⁻¹)	Navážka (mg)
(1) VDC	252,0	3,53
(2) MeVDC	282,0	3,95
(3) VD-Ox	269,0	4,59
(4) MeVD-Ox	299,0	5,02
(5) VD-His	370,7	6,02
(6) MeVD-His	400,7	6,45
(7) VD-acac	283,0	4,79
(8) TDC	248,9	3,49
(9) cDDP	300,1	4,20

5.4.2.4 Příprava mikrotitrační desky pro chemikálie

Každá chemikálie byla testována na jedné mikrotitrační destičce ve zvolené koncentrační řadě v rozmezí 0,01 – 10 mmol / l. V každém sloupci na mikrotitrační destičce byla vždy napipetována jedna koncentrace testované chemikálie o objemu 80 μ l / jamku. Každá koncentrace byla vyšetřována v triplicátu. Negativní kontrola (NK) a pozitivní kontrola (PK) byly také vyšetřovány v triplicátech. Blanky k příslušným roztokům byly vyšetřovány v duplikátu. (Obr. 6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ch ₁	ch ₂	ch ₃	ch ₄	ch ₅	ch ₆	ch ₇	ch ₈	ch ₉	ch ₁₀	ch ₁₁	ch ₁₂
B	ch ₁	ch ₂	ch ₃	ch ₄	ch ₅	ch ₆	ch ₇	ch ₈	ch ₉	ch ₁₀	ch ₁₁	ch ₁₂
C	ch ₁	ch ₂	ch ₃	ch ₄	ch ₅	ch ₆	ch ₇	ch ₈	ch ₉	ch ₁₀	ch ₁₁	ch ₁₂
D	b _{ch1}	b _{ch2}	b _{ch3}	b _{ch4}	b _{ch5}	b _{ch6}	b _{ch7}	b _{ch8}	b _{ch9}	b _{ch10}	b _{ch11}	b _{ch12}
E	b _{ch1}	b _{ch2}	b _{ch3}	b _{ch4}	b _{ch5}	b _{ch6}	b _{ch7}	b _{ch8}	b _{ch9}	b _{ch10}	b _{ch11}	b _{ch12}
F												
G	NK	NK	NK	b _{NK}	b _{NK}			PK	PK	PK	b _{PK}	b _{PK}
H												

Obr. 6: Experimentální uspořádání mikrotitrační destičky.

ch₁ - ch₁₂ ... koncentrační rozmezí chemikálie <0,01 ; 10>

ch₁ ... chemikálie při nejnižší koncentraci (0,01 mmol/l)

ch₁₂ ... chemikálie při nejvyšší koncentraci (10 mmol/l)

NK ... negativní kontrola PK ... pozitivní kontrola

b_x ... blanky k příslušným roztokům

Účelem negativní a pozitivní kontroly je zpětné ověření správnosti průběhu pokusu a vyloučení vlivu nepředvídatelných faktorů. V negativní kontrole, kde se buňky nachází v běžných kultivačních podmínkách, zůstává zachována maximální životnost buněk. V pozitivní kontrole, ve které jsou buňky ovlivňovány roztokem 3% formaldehydu, dochází naopak k minimalizaci buněčného přežívání. Roztoky obsahující blanky slouží k eliminaci vlivu případného barevného pozadí analyzovaných suspenzí.

V řádcích A – C bylo k příslušné koncentraci testované látky připipetováno za stálého promíchávání 80 μ l buněčné suspenze HL-60, o koncentraci 6×10^4 bb / 80 μ l média. V řádcích D a E bylo k příslušné koncentraci chemikálie připipetováno do každé jamky 80 μ l IMDM, což by blank testované chemikálie.

Do negativní kontroly (NK) bylo napipetováno 80 μ l suspenze buněk a 80 μ l IMDM. Blank negativní kontroly obsahoval 160 μ l IMDM. Pozitivní kontrola byla složena z 80 μ l suspenze buněk a 80 μ l 3% roztoku formaldehydu (FA). Blank pozitivní kontroly obsahoval 80 μ l formaldehydu a 80 μ l IMDM.

Takto připravená destička byla vložena do inkubátoru na 24 hod při 37° C, v prostředí 5% CO₂.

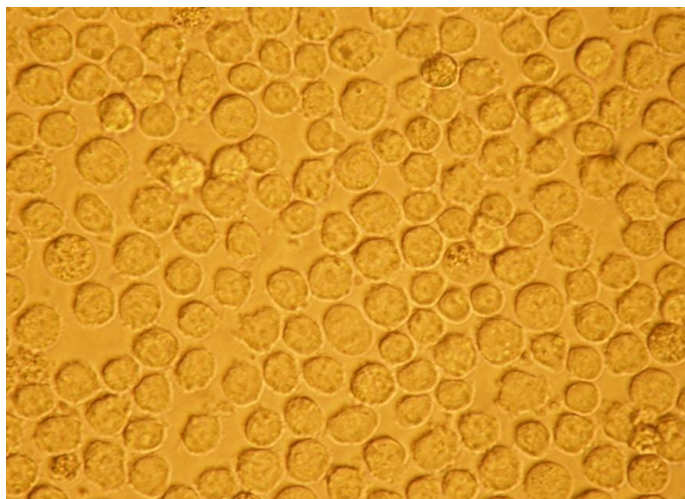
5.4.2.5 *Provedení detekce*

Po 24 hodinové inkubaci byla destička s chemikálií a kontrolami vyjmuta. Do každé jamky bylo multikánalovou pipetou přidáno 25 μ l roztoku MTT (2 mg MTT/ ml PBS). Obě desky byly znovu vloženy do inkubátoru na 3 hod (37° C, 5% CO₂).

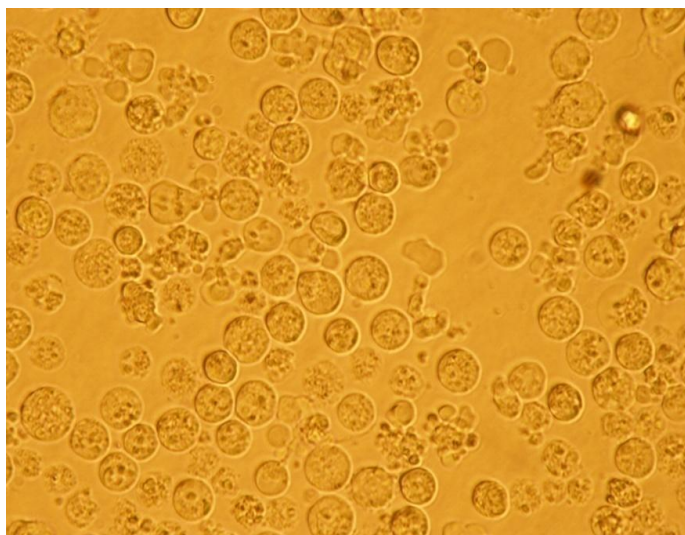
Po inkubaci byl přidán do všech jamek multikanálovou pipetou roztok 1M HCl / 2-propanol (1:24). Vše bylo důkladně promícháno tak, aby došlo k rozpuštění vzniklých formazanových krystalků, které vznikly po redukci MTT barviva.

Pro samotné měření byla destička vložena do FLUOstar readeru. Přestože absorpční maximum MTT barviva se nachází při vlnové délce 570 nm, byla v této práci měřena absorbance při vlnové délce 550 nm, z důvodu přístrojového omezení.

Součástí MTT-testu, vedle detekce absorbance, se stalo po 24 hodinové inkubaci destičky pozorování pod mikroskopem při celkovém zvětšení 1500x. Jednalo se o kontrolu, zda-li testované chemikálie ovlivňují buněčnou linii při různých koncentracích. Například testovaná chemikálie VDC (**1**) byla sledována při koncentracích 0,01 mmol / l (obr. 7) a 0,08 mmol / l (obr. 8).



**Obr. 7: Mikroskopický pohled – Vliv 0,01 mM VDC na buňky HL-60.
(po 24 hod inkubaci, zvětšení 1500x)**



**Obr. 8: Mikroskopický pohled – vliv 0,08 mM VDC na buňky HL-60.
(po 24 hod inkubaci, celkové zvětšení 1500x)**

Z obr. 7 je zřejmé, že při nejnižší koncentraci vyšetřované chemikálie **1** se neprojevují téměř žádné morfologické změny buněk. Se stoupající koncentrací, obr. 8 lze pozorovat u buněk změny struktury a tvaru.

5.4.3 Vyhodnocení MTT-testu

Cílem této práce je stanovení hodnoty 50% letální dávky (LD_{50}) testovaných chemikálií **1 – 9**. LD_{50} je taková koncentrace látky, při které přežije právě $1/2$ buněk.

Získané výsledky při měření udávají hodnoty absorbancí všech testovaných roztoků v jednotlivých jamkách mikrotitrační desky. Výsledné hodnoty absorbancí **A** zvláště pro jednotlivé koncentrace byly vypočteny jako rozdíl:

$$A = P(A_x) - P(A_b)$$

$P(A_x)$... průměrná hodnota absorbance příslušné koncentrace testované látky.

$P(A_b)$... průměrná hodnota absorbance blanku (chemikálie s IMDM).

Stejně byly vyhodnoceny i negativní a pozitivní kontroly.

Hodnota absorbance negativní kontroly A_{NK} je hodnota, při které nejsou ovlivněny buňky. Její poloviční hodnota $A_{NK}^{1/2}$ odpovídá 50 % přeživších buněk. Proto byla $A_{NK}^{1/2}$ použita k určení LD_{50} .

Byla sestavena křivka závislosti absorbance na koncentraci u každé testované látky. Hodnoty koncentrací byly vynášeny v logaritmickém měřítku. Byla určena rovnice závislosti:

$$A = k_1 * \ln c + k_2$$

k_1, k_2 ... konstanty závislosti

c ... koncentrace testované chemikálie (mmol / l)

Byla vypočtena taková koncentrace látky, která způsobí usmrcení právě $1/2$ buněk (LD_{50}). Rovnice po dosazení hodnoty $A_{NK}^{1/2}$:

$$A_{NK}^{1/2} = k_1 * \ln LD_{50} + k_2$$

Ke každé hodnotě LD_{50} byly u testovaných látek **1 – 9** vypočítány směrodatné odchylky (SDV).

5.5 Apoptest

5.5.1 Princip Apoptestu

Programovaná buněčná smrt, tedy apoptóza, je přísně regulovaný a selektivní fyziologický proces, při kterém se odstraňují staré nebo jinak změněné buňky.

Apoptest je metoda *in vitro*, pomocí které se určuje životaschopnost buněk. Při tomto testu se stanovují živé buňky, nekrotické buňky a stádia apoptózy – časná a pozdní fáze. K měření buněčné smrti a jejich stádií slouží metoda průtokové cytometrie.

Vyšetřování stádií apoptózy, ve kterých se buňky právě nachází, je umožněno sledováním fosfatidylserinu (PS). Tento negativně nabitý fosfolipid se u živých buněk přirozeně vyskytuje v buněčné membráně na vnitřní cytoplazmatické straně lipido-proteinové dvojvrstvy. Určité množství molekul PS se v **časné fázi apoptózy** přemísťuje (translokuje) na vnější stranu membrány, kde už je možné jej detekovat pomocí Annexinu V konjugovaného s fluorochromem fluoresceinisokyanátem (FITC). Annexin V (Ann) je protein, který má přirozenou afinitu k PS a váže se s ním za přítomnosti vápenatých iontů. S rostoucím průběhem apoptózy vzrůstá i počet exprimovaného PS na vnější straně membrány.

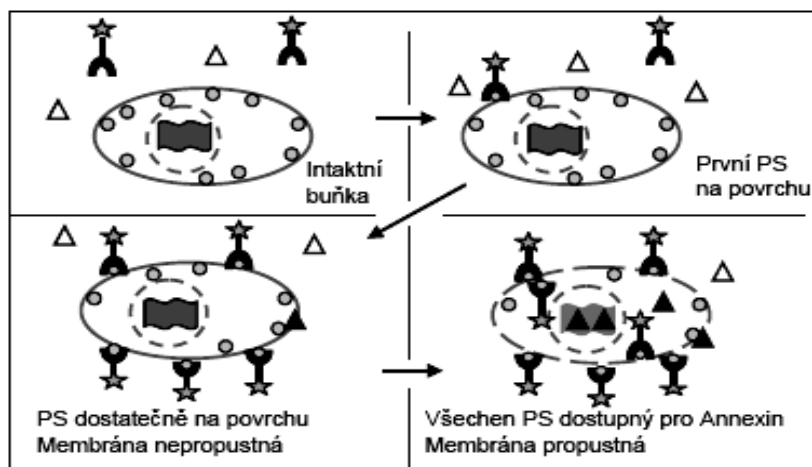
V **pozdním stádiu apoptózy** se jaderná membrána stává průchozí i pro druhou fluorescenční látku propidium jodid (PI). PI má schopnost prostupovat porušenou jadernou membránou a tvořit nespecifické vazby se strukturami RNA a DNA.

Nekrotické buňky mají běžně poškozenou membránu a z tohoto důvodu PI snadno prostoupí do buněk. Annexin V se již neváže⁵⁴.




Živé, neapoptické buňky, v důsledku neporušenosti svých membrán, neváží na PS Annexin V, ani neumožňují vmezeření PI do své DNA.

Princip testu je znázorněn na obr. 9.

Schopnost lomených metalocenů vyvolat programovanou smrt buněk byla již dříve prokázána⁴⁶. Apoptest byl proto zvolen i v této práci ke studiu stádií apoptózy vybraných sloučenin.



Obr. 9: Princip značení flouorchromy při stádiích apoptózy.

 Annexin-FITC;
  PI;
  PS

5.5.2 Postup při Apoptestu

5.5.2.1 Příprava buněčné linie

Buňky byly připraveny stejně jako u MTT-testu (viz 5.4.2.2). Po 24 hodinové inkubaci byla jejich koncentrace upravena čerstvým médiem na aktuální koncentraci $7,5 \times 10^5$ bb / ml média.

5.5.2.2 Příprava koncentrace chemikálií

Pro porovnání účinku látek **1 - 9** na indukci apoptózy byly zvoleny koncentrace 0,15 mmol / l a 0,2 mmol / l. Jako výchozí koncentrace pro přípravu daných koncentrací byla použita koncentrace 10 mmol/l stejně jako u MTT-testu. Chemikálie **1 - 7** byly naváženy a rozpuštěny v 1 ml média. Látky **8 a 9** byly nejprve rozpuštěny v 100 μ l DMSO, a poté v 900 μ l IMDM v poměru 1:9. Navážky pro přípravu koncentrace 10 mmol / l v objemu 1 ml jsou shrnuty v tabulce 2. Při výpočtu navážek byl započítán hmotnostní faktor chloridů (viz 5.4.2.3).

Tab. 2: Navážky chemikálií pro přípravu 10 mmol/l o objemu 1ml

Chemikálie	M (g.mol ⁻¹)	Navážka (mg)
(1) VDC	252,0	2,52
(2) MeVDC	282,0	2,82
(3) VD-Ox	269,0	3,28
(4) MeVD-Ox	299,0	3,59
(5) VD-His	370,7	4,30
(6) MeVD-His	400,7	4,61
(7) VD-acac	283,0	3,42
(8) TDC	248,9	2,49
(9) cDDP	300,1	3,00

Poté byly roztoky sterilně přefiltrovány do nových sterilních mikrozkrumavek. Postupným ředěním výchozího roztoku dané chemikálie (= 10 mmol / l) médiem byl připraven 1 ml roztoku chemikálie o koncentraci 1 mmol / l. Z tohoto roztoku bylo odebráno 150 µl, resp. 200 µl do kultivačních rakviček a zředěno 850 µl, resp. 800 µl IMDM médiem. Takto byly připraveny koncentrace 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l v 1 ml média. Každá testovaná látka byla vyšetřována v triplicátu. Do kultivační rakvičky s negativní kontrolou bylo napipetováno 1 ml IMDM a do rakvičky s pozitivní kontrolou 1 ml FA. Kontroly byly také vyšetřovány v triplicátu.

Po přípravě daných koncentrací látek (0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l) byly kultivační rakvičky s chemikáliemi a kontrolami uloženy na 15 minut do inkubátoru (37° C, 5% CO₂). Po inkubaci bylo přidáno do každé rakvičky s 1 ml chemikálie ekvivalentní množství buněk, tedy 1 ml buněčné suspenze (HL-60) o koncentraci 7,5 x 10⁵ bb / ml. 1 ml buněk byl přidán i k NK a PK. Takto připravené rakvičky s přidanými buňkami byly inkubovány 24 hodin (37° C, 5% CO₂). Uzávěry rakviček byly mírně povolené.

5.5.2.3 Příprava roztoků pro měření

Následující manipulace s rakvičkami probíhala uchováním na ledu, aby se zabránilo vzniku sekundární apoptózy. Na začátku práce byl připraven čerstvý BB pufr a to

tak, že 10x koncentrovaný BB pufr byl zředěn 10x destilovanou vodou na požadovaný objem. Takto připravený BB pufr byl umístěn na led.

Po 24 hodinové inkubaci byly všechny buněčné suspenze promyty 1 ml PBS a celý objem byl přenesen do zkumavek se zeštíhleným dnem. K nim bylo přidáno 5 ml PBS za účelem promytí buněk. Zkumavky s roztoky byly centrifugovány (5 min., 1200 ot. / min., 8° C). Po kontrole usazeniny byly roztoky slity (převrácením zkumavek) a roztřepány. Opět bylo přidáno 5 ml PBS a zkumavky byly centrifugovány (5 min., 1200 ot. / min., 8° C). Po slítí a protřepání bylo přidáno 100 μ l PBS do každé zkumavky a z toho následně odebráno 100 μ l buněčné suspenze (u PK 200 μ l) do nových zkumavek. Tyto zkumavky byly centrifugovány (5 min., 1200 ot. / min., 8° C). Po odsátí supernatantu na minimum a roztřepání bylo do každé zkumavky přidáno 100 μ l BB pufru.

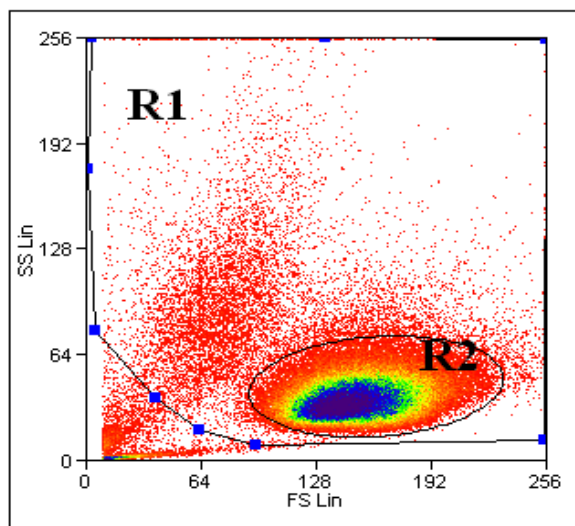
Obsah zkumavek s BB pufrům byl přepipetován do faxových zkumavek. K těmto 100 μ l buněčné suspenze byl přidán 1 μ l roztoku Annexinu V konjugovaného s FITC. Po inkubaci (10 min., 0° C, tma) bylo k roztokům přidáno dalších 250 μ l zředěného BB pufru. Takto připravené roztoky bylo nutné proměřit do 5 minut na průtokovém cytometru. Těsně před měřením bylo do každé faxové zkumavky přidáno 2,5 μ l roztoku PI.

5.5.3 Vyhodnocení Apoptestu

5.5.3.1 Identifikace buněčné linie HL-60

Pomocí měření parametrů velikosti buněk (forward scatter, FS) a jejich granularity (side scatter, SS) je možné získat diagram, jež je charakteristický pro studovanou buněčnou linii HL-60. Použitím softwarové výbavy (Summit Software 4.3) je poté z populace buněk část vybrána a ohraničena. Tímto tzv. zónováním („gateováním“) jsou získány výsledky, které nejsou ovlivněny např. buněčnou drtí nebo jinými nečistotami, jež se nachází mimo ohraničenou zónu. Při zónování se získávají informace o nejméně 500 000 buňkách, což stačí pro nezkrácenou statistickou analýzu buněčné linie. Jeden bod na diagramu znázorňuje jednu buňku.

Pro ukázkou zónování byly použity digramy negativní kontroly testované buněčné linie HL-60 (obr. 10), pozitivní kontroly (obr. 11) a testovaných chemikálií VDC (obr. 12), TDC (obr. 13) a cDDP (obr. 14). Tyto diagramy byly dále použity při stanovení aktuálního stavu a počtu buněk.

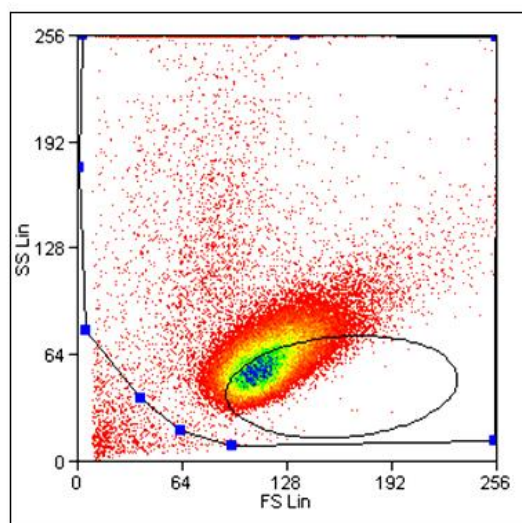


Obr. 10: Zónování buněk HL-60 kultivovaných v IMDM (NK).

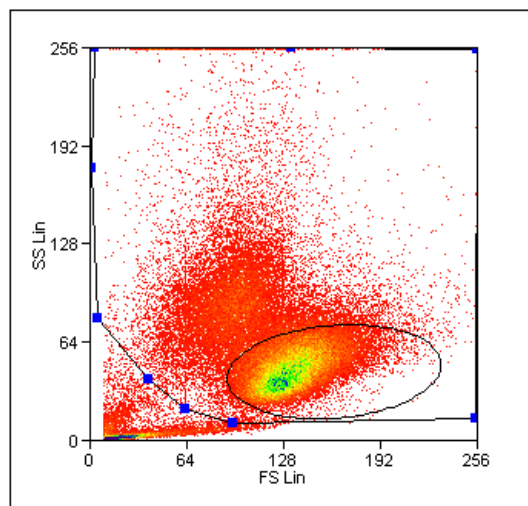
Zóna R1 obsahuje všechny buňky HL-60 i včetně buněk apoptických, které byly zahrnuty do následné analýzy apoptestem. Tento „gate“ nebyl vyřazen z analýzy, ale

nebyla na tuto zónu zaměřena pozornost. Jedná se pouze o ilustrační zónu, pomocí které bylo možné pozorovat posun buněk a změny jejich parametrů SS a FS při vstupu do apoptózy.

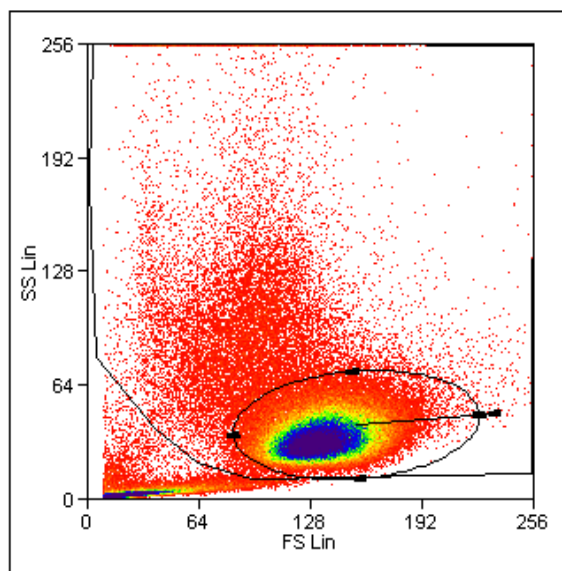
Zóna R2 znázorňuje, kde jsou v tomto diagramu umístěny živé neapoptické buňky. V tomto „gatu“ probíhala další analýza buněk.



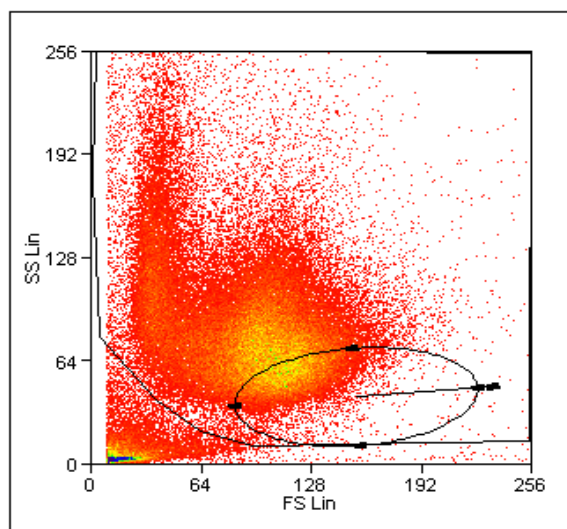
Obr. 11: Zónování buněk HL-60 kultivovaných s 3% roztokem formaldehydu (PK).



Obr. 12: Zónování HL-60 s 0,15 mM VDC.



Obr. 13: Zónování HL-60 s 0,15 mM TDC.



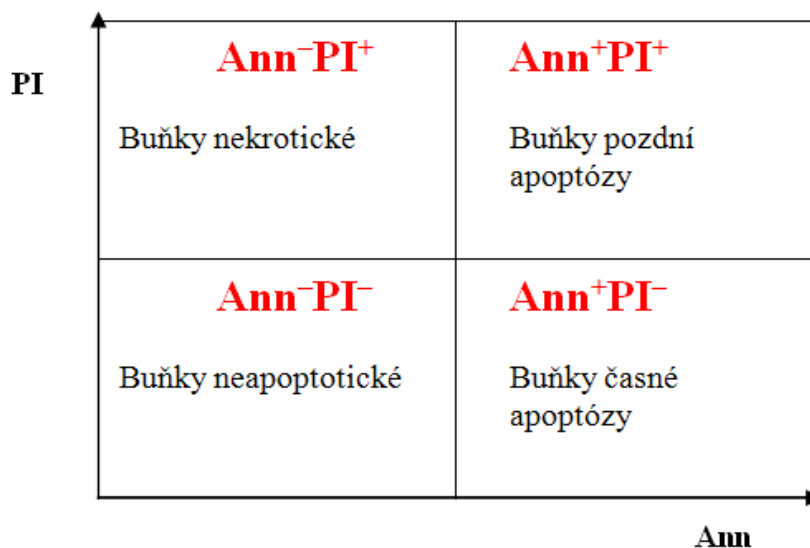
Obr. 14: Zónování HL-60 s 0,15 mM cDDP.

5.5.3.2 Vyhodnocení fluorescenčních diagramů Apoptestu

Pomocí detekce fluorescence je získávána další výstupní informace.

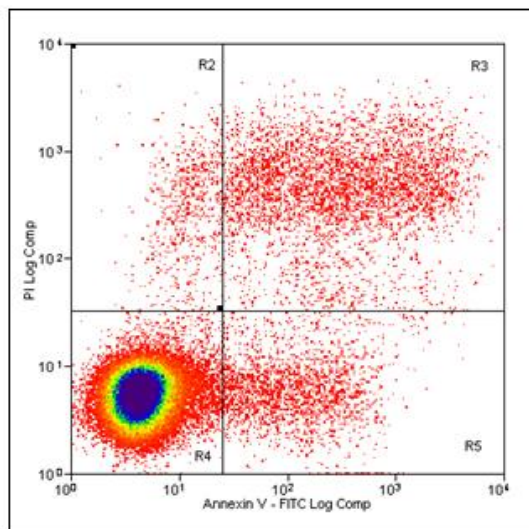
Detekce fluorochromu FITC, který excituje při vlnové délce 488 nm a emituje v rozmezí 530/30 nm, probíhá v prvním fluorescenčním kanálu (FL1). Druhý fluorescenční kanál (FL2) detekuje intenzitu záření PI, který emituje v intervalu 575/25 nm.

V grafu závislosti intenzity fluorescenčního záření FITC na fluorescenci PI má každá buňka svoje umístění. Lokalita, ve které se buňka právě nachází, je dána tím, jaké množství Annexin-FITC je na ní navázáno a jaké množství PI se vmezeřilo do její DNA. Buňky jsou rozděleny do čtyř možných skupin (kvadrantů) podle emitující fluorescence, což je znázorněno na ilustračním obrázku č. 15.



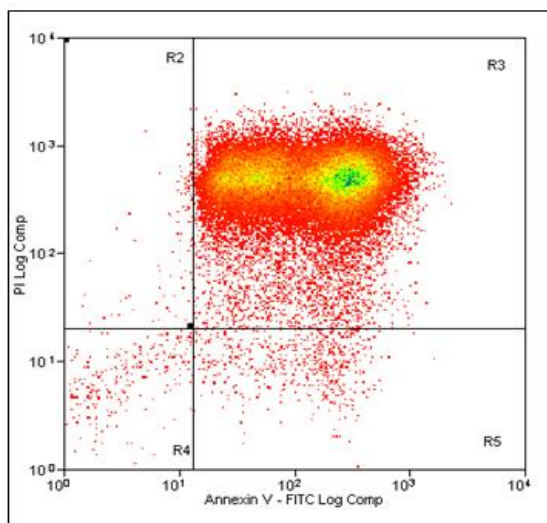
Obr. 15: Rozdělení buněk do kvadrantů podle typu fluorescence.

Na obrázcích č. 16 – 18 jsou ukázány diagramy závislosti mezi intenzitou fluorescence FITC (Annexin V-FITC, osa X) a mezi intenzitou záření PI (osa Y), pro vzorky negativní kontroly (obr. 16), pozitivní kontroly (obr. 17) a VDC (obr. 18) při koncentraci 0,15 mmol / l.



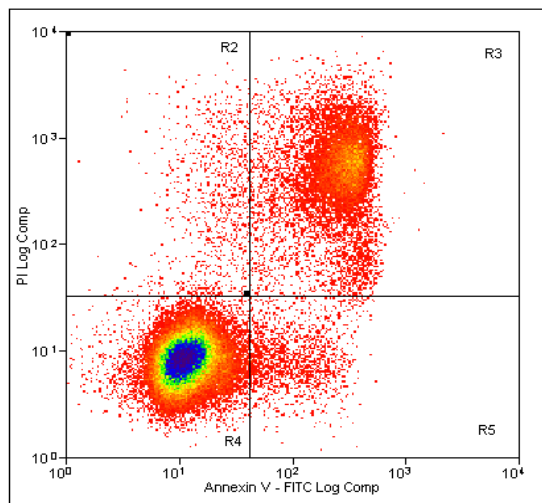
Obr. 16: Fluorescenční diagram Apotestu - negativní kontrola.

Z obr. 16 vyplývá, že většina buněk je soustředěna v oblasti Ann⁻PI⁻, což znázorňuje buňky živé neapoptické, které neváží žádné množství Annexinu V ani PI.



Obr. 17: Fluorescenční diagram Apotestu - pozitivní kontrola.

Na obr. 17 je patrné, že buňky pozitivní kontroly se vyskytují ve stádiu pozdní apoptózy Ann^+PI^+ . Na molekuly PS se váže velké množství Annexinu V a buňky mají v této fázi již porušenou jadernou membránu, tudíž dochází i k vazbě PI na DNA.



Obr. 18: Fluorescenční diagram Apotestu – 0,15 mM VDC.

V diagramu (obr. 18) testované chemikálie VDC při koncentraci 0,15 mmol / l lze hodnotit, že velká část buněk se nachází v oblasti Ann^-PI^- . Je však patrné, že u malého množství buněk dochází k rostoucímu stádiu apoptózy. VDC tedy indukuje u buněk apoptózu, nikoliv nekrózu.

Do analýzy byly zahrnuty buňky z výše uvedené zóny R2. Na základě toho, byly získány informace o procentuálním zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech.

Chemikálie **1 – 9** byly vyšetřovány vždy v triplicátech při zvolených koncentracích 0,15 mmol / l a 0,2 mmol / l. Z každé trojice hodnot byla následně vypočítána průměrná hodnota (AVG) se směrodatnou odchylkou (SDV) k této trojici dat. Hodnoty negativní a pozitivní kontroly byly vyhodnoceny stejným způsobem.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Na buněčné linii HL-60 byla testována cytotoxická aktivita lomených vanadocenových komplexů spolu s jejich 1,1'-dimethylovanými deriváty VDC (**1**), MeVDC (**2**), VD-Ox (**3**), MeVD-Ox (**4**), VD-His (**5**), MeVD-His (**6**), VD-acac (**7**) a porovnána s cytostatickým účinkem sloučenin TDC (**8**) a cDDP (**9**).

Vzhledem k tomu, že titanocendichlorid patří do skupiny lomených metallocenů, stejně jako vanadocenové komplexy, a protože je to jediný metallocen, který byl testován ve dvou klinických fázích, byl vybrán k porovnání s chemikáliemi **1-7**.

Cis-platina byla zvolena z důvodu její strukturální podobnosti s lomenými metalloceny a na základě jejího standardního použití při léčbě některých nádorových onemocnění.

Pomocí metody MTT-testu byly stanoveny hodnoty 50% letální dávky LD₅₀ testovaných komplexů. Tento test je standardní metodou při preklinickém testování cytotoxických látek, a proto byl zvolen i k vyšetřování VDC a jeho derivátů, TDC a cDDP.

Metoda Apoptest byla zvolena k potvrzení indukce apoptózy vyšetřovaných látek **1-9** při zvolených koncentracích 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l. Součástí tohoto stanovení bylo i porovnání antitumorové účinnosti látek **1-9**. Vzhledem k tomu, že lze touto metodou určovat vedle stádií apoptózy, ve kterých se buňky vyskytují, také procentuální zastoupení buněk, je Apoptestem podáváno větší množství informací ve srovnání s MTT-testem. Přestože Apoptest se řadí mezi přesné metody, patří mezi jeho nevýhody vysoká cena přístrojového vybavení a potřebných chemikálií.

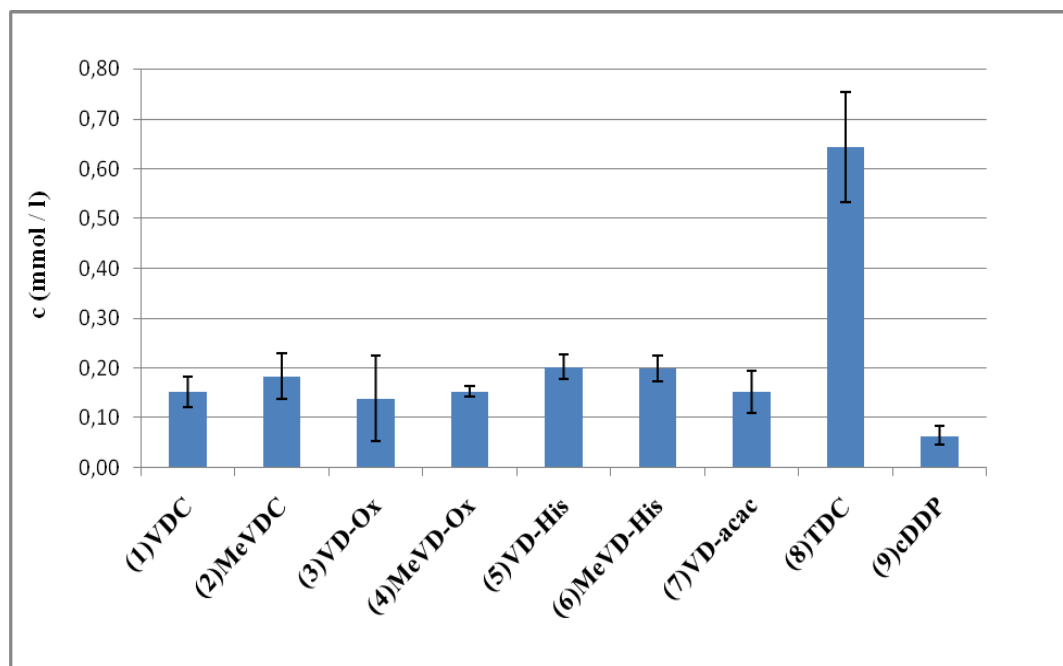
6.1 MTT-test

Pomocí spektrofotometrické metody MTT-testu byly stanoveny hodnoty LD₅₀ testovaných chemikálií **1 – 9**, jež jsou shrnuty v tab. 3 spolu se směrodatnými odchylkami. Hodnota 50% letální dávky znázorňuje hodnotu takové koncentrace, jež způsobí usmrcení právě 1/2 buněk.

Ze získaných výsledků byl pro srovnání hodnot LD₅₀ v závislosti na testované látce sestaven graf (obr. 19).

Tab. 3: Výsledné hodnoty LD₅₀ jednotlivých chemikálií

chemikálie	LD ₅₀ (mmol / l)	SDV
(1) VDC	0,15	± 0,03
(2) MeVDC	0,18	± 0,05
(3) VD-Ox	0,14	± 0,09
(4) MeVD-Ox	0,15	± 0,01
(5) VD-His	0,20	± 0,02
(6) MeVD-His	0,20	± 0,03
(7) VD-acac	0,15	± 0,04
(8) TDC	0,64	± 0,11
(9) cDDP	0,06	± 0,02



Obr. 19: Graf závislosti testovaných chemikálií 1 – 9 na jejich hodnotě LD₅₀.

U vanadocenových komplexů **1** – **7** byl potvrzen kancerostatický vliv na buněčnou linii HL-60. Hodnoty LD₅₀ těchto sloučenin se pohybovaly v poměrně úzkém koncentračním rozmezí, a to od 0,14 mmol / l do 0,20 mmol / l. Hodnota 50% letální dávky chemikálie **8** byla oproti látkám **1** – **7** velmi vysoká, což prokazuje nižší antitumorózní účinek ve srovnání s chemikáliemi **1** – **7**. Látka **9** naopak vykazuje nejlepší cytotoxický efekt v porovnání s látkami **1** – **8**, protože její hodnota LD₅₀ je nejnižší. Mezi chemikáliemi **1** – **7** ve srovnání s látkou **8**, resp. **9** je statisticky významný rozdíl v jejich cytostatické účinnosti.

Vzhledem k poměrně blízkým hodnotám koncentrace u chemikálií **1** – **7** lze usuzovat, že za cytotoxický efekt je zodpovědná ta část, která je těmito látkám společná. Což je v tomto případě vanadocenový fragment [Cp₂V⁺], popřípadě jeho methylovaný fragment [MeCp₂V⁺].

Při porovnání vlivu methylace na Cp kruhu byla pozorována snížená účinnost substituované látky **2**, resp. **4** ve srovnání s látkami **1**, resp. **3**. U látky **6** nebyl pozorován téměř žádný vliv methylace v porovnání s jeho nemethylovanou formou **5**.

6.2 Apoptest

Na základě Apoptestu lze stanovit procentuální zastoupení živých buněk (neapoptických), buněk časně apoptických a pozdně apoptických, a také buněk nekrotických. Vedle toho, lze kontrolovat, zda-li testované látky, tedy chemikálie **1 – 9** vyvolávají proces apoptózy při koncentracích 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l, nebo naopak mají na buňky nekrotický vliv, což je nežádoucí.

Bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk ve všech čtyřech stádiích, ve kterých lze buňky identifikovat prostřednictvím tohoto testu. Tyto výsledné průměrné hodnoty (AVG) při výše zmiňovaných koncentracích jsou shrnuty v tabulce 4, resp. 5 spolu s jejich směrodatnými odchylkami (SDV).

K potvrzení indukce apoptózy u látek **1 – 9** a srovnání jejich účinku při koncentracích 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l, byl zvolen, jako základní oblast vyhodnocení, kvadrant **Ann⁻PI⁻**. V této oblasti se neváže žádný Annexin V -FITC ani PI.

Na základě získaných výsledných hodnot z kvadrantu Ann⁻PI⁻ byl sestaven graf závislosti testovaných komplexů **1 – 9** při výše zmiňovaných koncentracích na procentuálním zastoupení živých buněk (Ann⁻PI⁻), obr. 20, spolu se směrodatnými odchylkami.

Tab. 4: Procentuální zastoupení (AVG, %) buněk, podle emitované fluorescence, ve vzorcích negativní kontroly (NK), pozitivní kontroly (PK) a testované chemikálie 1 - 9 (0,15 mmol / l).

		Ann ⁻ PI ⁺	Ann ⁺ PI ⁺	Ann ⁻ PI ⁻	Ann ⁺ PI ⁻
NK	AVG	0,82	7,40	90,39	1,40
	SDV	± 0,22	± 1,62	± 0,43	± 1,21
PK	AVG	0,49	97,80	0,48	1,23
	SDV	± 0,36	± 1,27	± 0,52	± 0,65
(1)VDC	AVG	2,26	14,67	79,70	3,37
	SDV	± 0,79	± 8,10	± 6,02	± 1,29
(2)MeVDC	AVG	1,59	8,56	88,00	1,86
	SDV	± 0,56	± 3,17	± 1,00	± 1,62
(3)VD-Ox	AVG	3,65	10,44	83,77	2,15
	SDV	± 1,08	± 4,59	± 4,29	± 1,39
(4)MeVD-Ox	AVG	3,11	12,61	82,58	1,71
	SDV	± 2,12	± 5,67	± 6,54	± 1,26
(5)VD-His	AVG	1,28	8,60	88,64	1,51
	SDV	± 0,25	± 2,61	± 1,00	± 1,36
(6)MeVD-His	AVG	2,71	7,23	88,85	1,23
	SDV	± 1,19	± 0,18	± 0,64	± 0,71
(7)VD-acac	AVG	1,82	9,65	87,42	1,12
	SDV	± 0,48	± 4,32	± 3,85	± 0,95
(8)TDC	AVG	1,10	6,89	90,61	1,41
	SDV	± 0,61	± 2,06	± 2,05	± 0,62
(9)cDDP	AVG	0,02	26,05	1,31	72,63
	SDV	± 0,01	± 10,08	± 1,60	± 8,49

Procentuální zastoupení buněk v oblasti Ann⁻PI⁻ u chemikálií **1 – 7** se pohybuje v rozmezí 79, 70 – 88, 85 %. Z toho vyplývá, že tyto komplexy v malé míře indukují apoptózu při koncentraci 0,15 mmol / l. Nejvíce účinnou látkou z vyšetřovaných vanadocenových sloučenin je látka **1**.

Procenta živých buněk u chemikálie **8** jsou velmi blízké negativní hodnotě, z čehož je patrné, že tento komplex vykazuje minimální účinnost na buňkách HL-60 při koncentraci 0,15 mmol / l.

Chemikálie **9** ve srovnání s ostatními komplexy vykazuje minimální procentuální zastoupení buněk v oblasti Ann⁻PI⁻, ale v oblasti Ann⁺PI⁻ už je procentuální zastoupení buněk vysoké, což naznačuje, že většina buněk je v časně apoptóze.

Tab. 5: Procentuální zastoupení (AVG, %) buněk, podle emitované fluorescence, ve vzorcích negativní kontroly (NK), pozitivní kontroly (PK) a testované chemikálie (0,2 mmol / l)

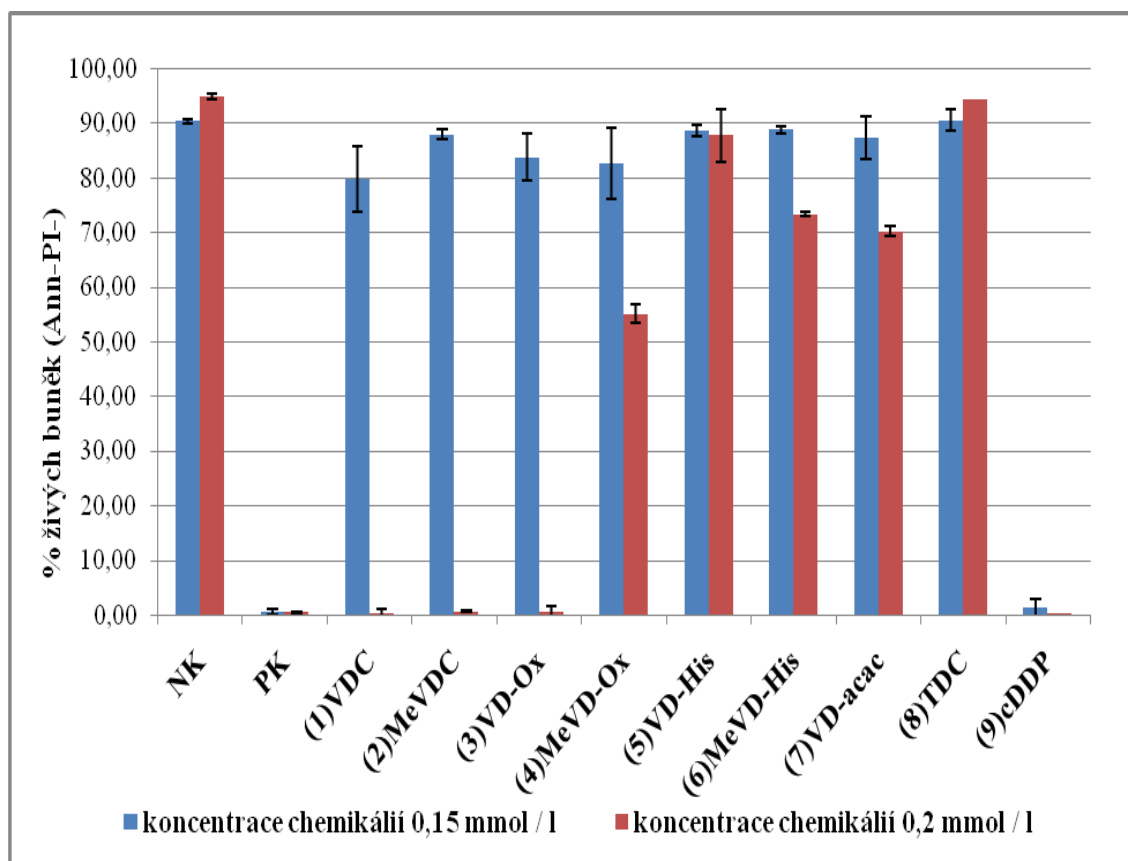
		Ann⁻PI⁺	Ann⁺PI⁺	Ann⁻PI⁻	Ann⁺PI⁻
NK	AVG	0,96	3,14	94,98	0,93
	SDV	± 0,20	± 0,75	± 1,04	± 0,10
PK	AVG	0,49	97,80	0,48	1,23
	SDV	± 0,36	± 1,27	± 0,52	± 0,65
(1)VDC	AVG	1,17	77,20	0,40	21,23
	SDV	± 0,42	± 4,76	± 0,13	± 4,29
(2)MeVDC	AVG	0,02	56,64	0,64	42,70
	SDV	± 0,01	± 5,78	± 0,53	± 6,15
(3)VD-Ox	AVG	0,04	63,06	0,50	36,40
	SDV	± 0,02	± 2,76	± 0,19	± 2,59
(4)MeVD-Ox	AVG	1,29	30,23	55,12	13,36
	SDV	± 0,21	± 2,63	± 1,05	± 1,65
(5)VD-His	AVG	0,89	6,43	87,75	4,92
	SDV	± 0,12	± 1,28	± 1,62	± 0,47
(6)MeVD-His	AVG	0,81	12,47	73,39	13,33
	SDV	± 0,17	± 2,00	± 4,94	± 3,62
(7)VD-acac	AVG	2,03	17,15	70,24	10,57
	SDV	± 0,32	± 0,68	± 0,37	± 0,67
(8)TDC	AVG	0,44	4,13	94,32	1,11
	SDV	± 0,08	± 0,72	± 0,85	± 0,11
(9)cDDP	AVG	0,02	37,32	0,21	62,46
	SDV	± 0,00	± 5,99	± 0,05	± 5,95

Při koncentraci 0, 2 mmol / l se procentuální zastoupení živých buněk v kvadrantu Ann⁻PI⁻ značně liší u komplexů **1 – 7**. Vanadocenové komplexy **1 – 3** vykazují minimální procentuální zastoupení Ann⁻PI⁻ buněk v rozmezí 0, 40 – 0,64 %, což je srovnatelné s chemikálií **9**.

U sloučenin **4 – 7** je statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupením neapoptických buněk v Ann⁻PI⁻. Jejich hodnoty procent živých buněk se pohybují v rozmezí 55, 12 – 87,75 %.

Vyšetřovaná chemikálie **8** i při zvýšené koncentraci vykazuje velmi podobný profil jako při koncentraci 0,15 mmol / l. Tedy procentuální zastoupení buněk po ovlivnění 0,2

mmol / l látkou **8** v Ann-PI⁻ se statisticky neliší s procenty živých buněk u negativní kontroly.



Obr. 20: Graf závislosti testovaných chemikálií na procentuálním zastoupení buněk.

Z obr. 20 vyplývá, že při porovnání testovaných chemikálií při koncentraci 0,15 mmol / l s koncentrací 0,2 mmol / l, jsou zřetelné velké rozdíly mezi testovanými sloučeninami, a to jak z hlediska indukce apoptózy, tak z pohledu vlivu methylové skupiny na Cp kruhu u látek **1 – 7**.

Při koncentraci 0,15 mmol / l vykazují nejnižší hodnoty procentuálního zastoupení živých buněk chemikálie **1, 3, 4** z vanadocenových sloučenin. Při koncentraci 0,2 mmol / l však vykazují nejnižší hodnoty živých buněk látky **1, 2, 3**.

U těchto chemikálií je patrný statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení živých neapoptických buněk při změně koncentrace z 0,15 mmol / l na 0,2 mmol / l, což ale nemusí být významný rozdíl z hlediska jejich klinické účinnosti.

U chemikálie **5** došlo k minimální změně procentuálního zastoupení živých buněk při zvýšení koncentrace.

U sloučeniny **6** není pozorován statistický rozdíl v procentuálním zastoupení buněk při koncentraci 0,15 mmol / l a 0,2 mmol / l. Statisticky významný rozdíl je patrný u chemikálie **7** při změně koncentrace z 0,15 mmol / l na 0,2 mmol / l.

Komplex **8** nevykazuje téměř žádné statisticky významné rozdíly hodnot při obou zvolených koncentracích. Vzhledem k tomu, že jeho hodnoty jsou velmi blízké k hodnotám negativních kontrol, je zjevné, že tato látka vyvolává pouze minimální indukci apoptózy u buněk HL-60 a vykazuje nejnižší kancerostatickou účinnost v porovnání s ostatními testovanými chemikáliemi.

Zcela odlišné výsledné hodnoty procentuálního zastoupení vykazuje chemikálie **9** při koncentraci 0,15 mmol / l v porovnání se sloučeninami **1** – **8**. Důvodem těchto rozdílných výsledků je, že zvolená koncentrace 0,15 mmol / l je značně nad hranicí LD₅₀ této chemikálie. U této sloučeniny navíc není významný statistický rozdíl při koncentracích 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l.

Vliv metylace na Cp kruhu při koncentraci 0,15 mmol / l je na obr. 20 pozorován zejména u látky **2**, u které je statisticky významný rozdíl v porovnání s jeho nesubstituovanou formou **1**. Po zvýšení koncentrace na hodnotu 0,2 mmol / l, už tento vliv methylové skupiny na kruhu není patrný, vzhledem k příliš nízkým procentuálním hodnotám pro jejich srovnání.

Při koncentraci 0,2 mmol / l se projevil značný vliv methylace na Cp kruhu u látky **4** v porovnání s jeho nesubstituovanou formou **3**. Naopak u látky **6** došlo vlivem methylace ke zvýšení účinnosti oproti jeho nemethylované formě **5** při koncentraci 0,2 mmol / l. Při koncentraci 0,15 mmol / l není tento jev zřetelný pravděpodobně díky nízké účinnosti při této koncentraci.

Z výše uvedených výsledků můžeme usuzovat, že testované vanadocenové komplexy **1 – 7** a chemikálie **9** vyvolávají apoptózu u použité buněčné linie HL-60, nikoliv nekrózu, při obou dvou koncentracích 0,15 mmol / l, resp. 0,2 mmol / l.

U testované sloučeniny **8** byla prokázána minimální indukce apoptózy a kancerostatický vliv na buňkách HL-60.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo testování cytotoxické aktivity vanadocenových a 1,1'-dimethylvanadocenových komplexů – Cp_2VCl_2 , $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$, $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$ a $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$, na nádorové linii HL-60. Získané výsledky byly porovnány s účinkem sloučenin Cp_2TiCl_2 a $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$.

Pomocí metody MTT-testu byly pro testované vanadocenové komplexy stanoveny hodnoty jejich 50 % letálních dávek (LD_{50}), které se pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,14 – 0,20 mmol / l. Tato hodnota byla experimentálně stanovena také pro chemikálie TDC (0,64 mmol / l) a cDDP (0,06 mmol / l). Chemikálie cDDP vykazovala signifikantně nejvyšší a TDC signifikantně nejnižší účinnost, v porovnání s ostatními testovanými látkami. Kancerostatický účinek vanadocenových komplexů vzrůstá v pořadí: $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$, $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$, Cp_2VCl_2 , $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$, $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$, $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$.

Na základě úzkého rozmezí výsledných hodnot LD_{50} , v rámci skupiny vanadocenových komplexů a jejich derivátů, byl určen jako faktor, pravděpodobně zodpovědný za protinádorovou aktivitu, vanadocenový fragment $[\text{Cp}_2\text{V}^+]$, popřípadě jeho methylovaný fragment $[\text{MeCp}_2\text{V}^+]$, který je daným látkám společný.

Prostřednictvím Apoptestu byla prokázána indukce apoptózy u všech vanadocenových a 1,1'-dimethylvanadocenových komplexů, včetně s cDDP a TDC. Žádná z testovaných chemikálií nevyvolávala, při dvou zvolených koncentracích (0,15 mmol / l a 0,2 mmol / l), u nádorové linie HL-60 nekrózu.

Doposud nevyřešeným problémem je mechanismus cytostatického účinku vanadocenových komplexů. Toto téma by se mělo stát předmětem dalších prací.

8. Literatura

1. Hynie S.: Speciální farmakologie, Díl VII/A, Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky, Karolinum Praha **2003**, 1 – 21.
2. Lincová, D., Farghali, H., et al.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2. vydání, Galén Praha **2007**, 541 – 558.
3. Stone, T., Darlingtonová, G.: Léky, drogy, jedy, Academia Praha **2003**, 267 – 279.
4. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Bieger, D.: Barevný atlas farmakologie, 2. vydání, Grada Praha **2001**, 296 – 299.
5. Perlík F.: Základy farmakologie, Klinická a speciální farmakologie, Galén Praha **2005**, 147 – 151.
6. Holý A.: Principy bioanorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik, Univerzita Palackého v Olomouci **2004**.
7. Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T.: *Nature* **205**, **1965**, 698 – 699.
8. Lippard, S. J.: Ed. *ACS Symp. Ser. 209*, **1983**.
9. Bellon, S. F., Coleman, J. H., Lippard, S. J.: *Biochemistry* **30**, **1991**, 8026-8035.
10. Schöllhorn, H., Raudaschl-Sieber, G., Müller, G., Thewalt, U., Lippert, B.: *J. Am. Chem. Soc.* **107**, **1985**, 5932 – 5937.
11. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E., Wu, Y.: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, **2005**, 3 – 11.
12. Holý A.: Principy bioanorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik, Univerzita Palackého v Olomouci **2004**, 227 – 228.
13. Wong, E., Giandomenico, CH. M.: *Chem. Rev.* **99**, **1999**, 2451 – 2456.
14. Khazanov, E. A., Barenholz, Y., Gibson, D., Najajreh, Y.: *J. Med. Chem.* **45**, **2002**, 5196 – 5204.
15. Kašpárková, J., Marini, V., Najajreh, Y., Gibson, D., Brabec, V.: *Biochemistry* **42**, **2003**, 6321 – 6332.
16. Nováková, O., Kašpárková, J., Malina, J., Natile, G., Brabec, V.: *Nucleic Acids Res.* **31**, **2003**, 6450 – 6460.
17. Lovejoy, K. S., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, **2008**, 8902-8907.

18. Farrell, N. P., De Almeida, S. G., Skov, K. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, **1988**, 5018 – 5019.
19. Farrell, N., Qu, Y., Feng, L., Van Houten, B.: *Biochemistry* 29, **1990**, 9522 – 9531.
20. Davies, M. S., Cox, J. W., Berners-Price, S. J., Barklage, W., Qu, Y., Farrell, N.: *Inorg. Chem.* 39, **2000**, 1710 – 1715.
21. Qu, Y., Rauter, H., Soares Fontes, A. P., Bandarage, R., Kelland, L. R., Farrell, N.: *J. Med. Chem.* 43, **2000**, 3189 – 3192.
22. Teuben, J. M., Bauer, C., Wang, A. H., Reedijk, J.: *Biochemistry* 38, **1999**, 12305 – 12312.
23. Melichar, B.: *Farmakoterapie* 6, **2005**, 561 – 569.
24. Lebwohl, D., Canetta, R.: *Eur J. Cancer* 34, **1998**, 1522 – 1534.
25. Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J., Cvitkovic, E.: *Mol. Cancer Ther.* 1, **2002**, 227 – 235.
26. De Gramont, A., et al: *J. Clin. Oncol.* 18, **2000**, 2938 – 2947.
27. Di Lauro, L., Giacinti, L., Arena, M. G., Sergi, D., Fattoruso, S. I., Giannarelli, D., Lopez, M.: *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28, **2009**.
28. Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., Cvitkovic, E.: *Ann. Oncol.* 8, **1998**, 1053 – 1071.
29. Gamelin, E., Gamelin, L., Bossi, L., Quasthoff, S.: *Semin. Oncol.* 29, **2002**, 21 – 33.
30. Köpf, H., Köpf-Maier, P.: *Angew. Chem.-Int. Ed. Engl.* 18, **1979**, 477 – 478.
31. Köpf-Maier, P., Leitner, M., Voigtlander, R., Köpf, H. Z.: *Z. Naturforsch.c-a J. Biosci.* 34, **1979**, 1174 – 1176.
32. Köpf, H., Köpf-Maier, P.: *ACS Symp. Ser.* 209, **1983**, 315 – 333.
33. Tacke, M., et al.: *J. Inorg. Biochem.* 98, **2004**, 1987 – 1994.
34. Hernández, R., Lamboy, J., Gao, L. M., Matta, J., Román, F. R., Meléndez, E.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, **2008**, 685 – 692.
35. Abeysinghe, P. M., Harding, M. M.: *Dalton Trans.* 28, **2007**, 3474 – 3482.
36. Kuo, L. Y., Liu, A. H., Marks, T. J.: *Met. Ions. Biol. Syst.* 33, **1996**, 53 – 85.
37. Mokdsi, G., Harding, M. M.: *J. Inorg. Biochem.* 83, **2001**, 205 – 209.

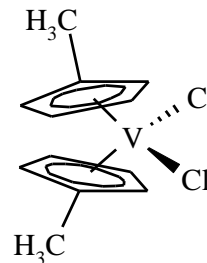
38. Navara, C. S., Benyumov, A., Vassilev, A., Narla, R. K., Ghosh, P., Uckun, F. M.: *Anti-Cancer Drugs* 12, **2001**, 369 – 376.
39. Köpf-Maier, P.: *Met. Compl. Cancer Chemother.* 5, **1993**, 259.
40. Köpf-Maier, P., Wagner, W., Köpf, H.: *Naturwissenschaften* 68, **1981**, 272 – 273.
41. Köpf-Maier, P., Krahl, D.: *Chem.-Biol. Interact.* 44, **1983**, 317 – 328.
42. Köpf-Maier, P.: *J. of Struct. Biol.* 105, **1990**, 35 – 45.
43. Guo, M., Sun, H., McArdle, H. J., Gambling, L., Sadler, P. J.: *Biochemistry* 39, **2000**, 10023 – 10033.
44. Du, H., Xiang, J., Zhang, Y., Tang, Y., Xu, G.: *J. Inorg. Biochem.* 102, **2008**, 146 – 149.
45. Harding, M. M., Mokdsi, G.: *Curr. Med. Chem.* 7, **2000**, 1289 – 1303.
46. Christodoulou, C. V., Eliopolous, A. G., Young, L. S., Hodgkins, L., Ferry, D. R., Kerr, D. J.: *Br. J. Cancer.* 77, **1998**, 2088 – 2097.
47. Murthy, M. S., Rao, L. N., Kuo, L. Y., Toney, J. H., Marks, T. J.: *Inorganica Chimica Acta* 152, **1988**, 117 – 124.
48. Dong, Y., Narla, R. K., Sudbeck, E., Uckun, F. M.: *J. Inorg. Biochem.* 78, **2000**, 321 – 330.
49. Ghosh, P., D’Cruz, O. J., Narla, R. K., Uckun, F. M.: *Clin. Cancer Res.* 6, **2000**, 1536 – 1545.
50. D’Cruz, O. J., Uckun, F. M.: *Contraception* 72, **2005**, 146 – 156.
51. Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods.* 65, **1983**, 55 – 63.
52. Berridge, M. V., Tan, A. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 303, **1993**, 474 – 482.
53. Alley, M. C., et al: *Cancer Res.* 48, **1988**, 589 – 601.
54. Zárýbnická, L.: Diplomová práce, Univerzita Pardubice, **2006**.

Příloha 1

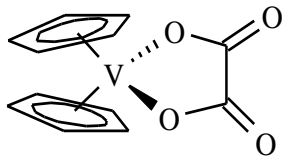
Struktury testovaných sloučenin



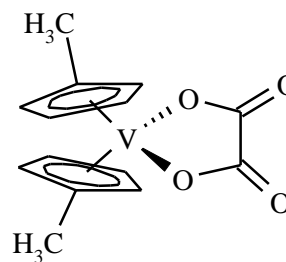
Obr. 21: Struktura Cp_2VCl_2



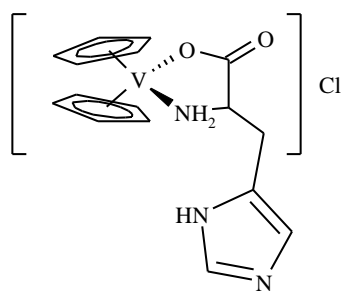
Obr. 22: Struktura $(\text{MeCp})_2\text{VCl}_2$



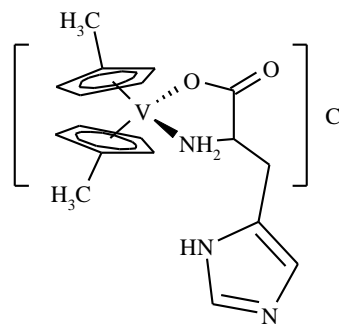
Obr. 23: Struktura $\text{Cp}_2\text{V}(\text{OOC})_2$



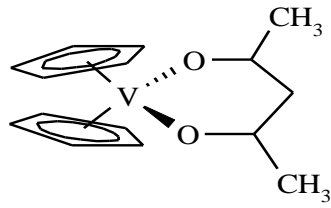
Obr. 24: Struktura $(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{OOC})_2$



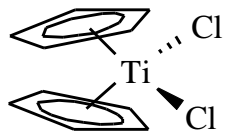
Obr. 25: Struktura $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$



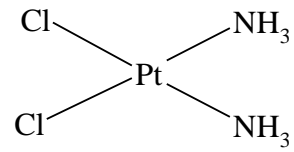
Obr. 26: Struktura $[(\text{MeCp})_2\text{V}(\text{his})]\text{Cl}$



Obr. 27: Struktura $[\text{Cp}_2\text{V}(\text{acac})]\text{Cl}$



Obr. 28: Struktura Cp_2TiCl_2



Obr. 29: Struktura $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$