

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY
LÉČIV

CHALKONY A JEJICH ANALOGY
JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA VIII.

Diplomová práce

Mnohokrát děkuji Mgr. Martě Kučerové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky při vzniku této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Věnceslavě Hronové za změření elementární analýzy, paní Ivě Vencovské za změření IČ spekter, pracovníkům mikrobiologické laboratoře Katedry biologických a lékařských věd za hodnocení mikrobiologické aktivity připravených látek a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně ocitovány.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Biosyntéza a struktura chalkonů.....	7
2.2 Účinky a použití chalkonů.....	8
2.3 Antineoplastické účinky chalkonů.....	8
2.3.1 Buněčný cyklus	9
2.3.1.1 Mikrotubuly a tubulin.....	10
2.3.2 Programovaná smrt buňky	12
2.3.2.1 Protein p53	12
2.3.2.2 Aktivátory kaspas.....	14
2.3.3 Cévní zásobení nádorů	15
2.3.3.1 Kolchicin a kombretastatin A4.....	15
2.3.3.2 Xanthoangelol a 4-hydroxyderricin.....	16
2.3.3.3 Další deriváty chalkonu inhibující angiogenezi	17
2.3.4 Inhibitory tyrosinkinasy	18
2.3.4.1 Struktura tyrosinkinasy.....	18
2.3.4.2 Potenciální inhibitory ze skupiny chalkonů.....	18
2.3.5 Hormon-dependentní nádory	19
2.4 Chalkon jako inhibitor proliferace.....	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Syntéza chalkonů	22
3.1.1 Charakteristika použitých metod	22
3.1.2 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů.....	23
3.1.3 Příprava acetylpyrazinů.....	24
3.1.4 Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(4-bromfenyl)prop-2-en-1-onů Claisen-Schmidtovou kondenzací	26
3.2 Biologické hodnocení	39
3.2.1 Testování antifungální aktivity.....	39
4. DISKUSE.....	41
5. ZÁVĚR	42
6. PŘÍLOHY.....	43

6.1 Příloha 1 Abstrakt diplomové práce	43
6.2 Příloha 2 Abstract of the diploma thesis	44
7. LITERATURA.....	45

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Problematikou chalkonů se Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy zabývá již několik let. Některé z výsledků byly také publikovány.^{1,2,3}

Cílem této diplomové práce byla příprava série pyrazinových derivátů chalkonu (struktura viz. kapitola 2.1) a některých meziproductů. Chalkony byly na kruhu B v poloze 4 substituovány bromem a různě alkylovány na kruhu A. Sloučeniny měly být testovány na antifungální a antimykobakteriální aktivitu.

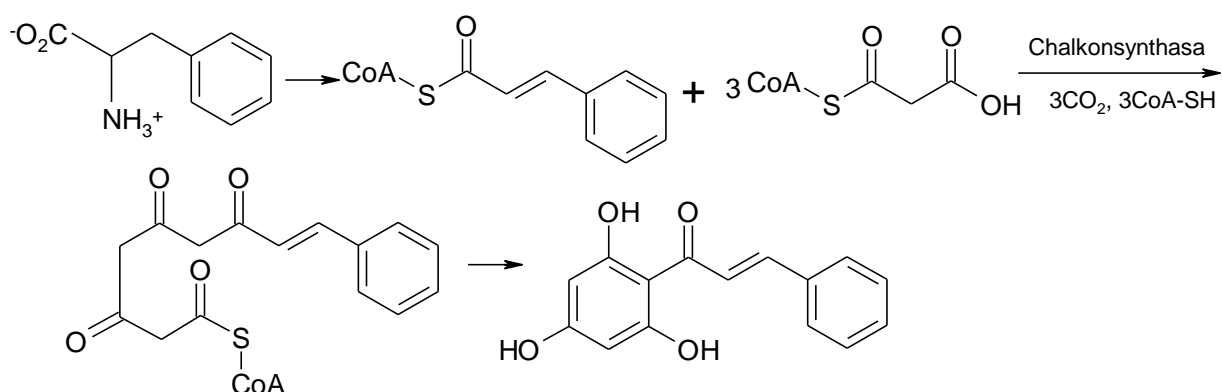
Chalkony se vyznačují širokou škálou účinků na lidský organismus, ovšem mechanismy působení těchto látek nejsou zcela objasněny. V teoretické části jsou shrnuty možné mechanismy účinku derivátů chalkonu se zaměřením na antineoplasticky působící látky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biosyntéza a struktura chalkonů

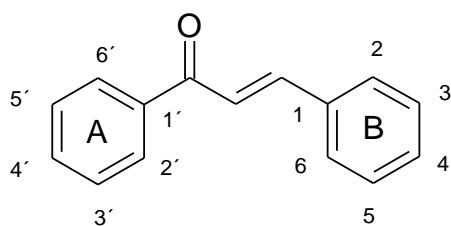
Chalkony představují zajímavou skupinu látek vyskytujících se hojně v požitelných rostlinách.⁴ Svůj název získaly díky své charakteristické barvě. Byl odvozen z řeckého slova „*chalcos*“, což v překladu znamená bronzový.

Najdeme je především v okvětních lístcích, ale také v listech, stoncích, plodech a kořenech stromů a rostlin jako biosyntetické prekurzory flavonoidů. Vznikají kondenzací cinnamoyl-CoA, odvozeného od fenylalaninu, a tří molekul malonyl-CoA. Tato reakce je katalyzována chalkonsynthasou a vede přes meziproduct k tvorbě hydroxychalkonů.



Z hlediska chemické struktury je chalkon triviálním názvem pro (*E*)-1,3-difenyprop-2-en-1-on (1). Tvoří jej dvě aromatická jádra, spojená tříuhlíkatým α,β -nenasyceným karbonylovým fragmentem. Díky volné rotaci jednoduché vazby mezi karbonylovým uhlíkem a α -uhlíkem se může vyskytovat ve dvou různých isomerních formách, a to *s-cis* a *s-trans*, z nichž termodynamicky stabilnější je *s-cis*-isomer. Naproti tomu na dvojně vazbě se častěji setkáváme s *E*-isomery.⁵

Kruhy A a B mají rozdílnou energetickou bariéru rotace, kruh A má tuto bariéru nižší, tudíž je flexibilnější a může se více odchylovat od planárního seskupení.⁶



1 chalkon

2.2 Účinky a použití chalkonů

Chalkony jsou skupinou látek se širokým okruhem biologických vlastností.⁷ Vyznačují se například účinky antimikrobními, antifungálními, protizánětlivými, antiprotozoálními, antiulcerózními, antineoplastickými, chemosenzitivizujícími, antioxidačními a mnohými dalšími. Mimoto působí modulačně na řadu enzymů, například na fosfodiesterasu, xanthinoxidasu nebo monoaminoxidasu a katechol-O-methyltransferasu.

Několik chalkonů se uplatnilo díky svým účinkům i v klinické praxi. Hesperidinmethylchalkon je využíván při léčbě chronické venózní insuficience dolních končetin, najdeme jej spolu s kyselinou askorbovou v přípravku Cyclo3 Fort. Jako inhibitor fosfodiesterasy III se používá isolikviritigenin a metochalkon našel uplatnění jako choleretikum a diuretikum.⁸

2.3 Antineoplastické účinky chalkonů

Rakovina, jako onemocnění, je v současné době jednou z nejčastějších příčin úmrtí.⁹ Ročně jí na světě podlehne okolo šesti miliónů mužů a žen.¹⁰ Na terapii různých forem nádorů bylo v posledních desetiletích vyvinuto mnoho úsilí a zkoumáno mnoho látek.⁹ Z praxe jsou známy 5-fluoruracil, cisplatina, mitomycin, adriamycin, taxol a další, jejich limitujícím faktorem jsou jejich nežádoucí účinky. Léčba rakoviny je tak často spojená s gastrointestinálními obtížemi, leukopenií a oslabením imunity. Proto se ukázalo jako nutné hledání nových látek, které by působily jak protinádorově, tak i zamezovaly tvorbě metastáz, a to vše bez významnějších vedlejších účinků.¹⁰ Jednou z oblastí zájmu jsou právě chalkony a jejich protinádorová aktivita, stejně tak různé mechanismy účinku, kterými tyto látky působí.⁷ Některé z nich zasahují do

buněčného cyklu, jiné spouštějí apoptózu, a další ovlivňují funkci membrán nebo činnost enzymů. Inhibicí angiogeneze pak mohou bránit vyživování nádoru. Není pravidlem, že by se jeden derivát vyznačoval jedním mechanismem účinku. Obvykle vykazuje tatáž látka i více mechanismů.

2.3.1 Buněčný cyklus

Sled procesů začínající v okamžiku rozdělení mateřské buňky a končící rozdělením buňky dceřinné označujeme jako buněčný cyklus. Rozdělujeme jej do čtyř základních fází – G₁, S, G₂ a M, jejichž časové trvání označujeme jako délku buněčného cyklu nebo jako generační dobu buňky.

G₁-fáze je charakterizována syntetickými procesy vedoucími k přírůstku hmotnosti buňky. Z hlediska časového trvání je ze všech čtyř fází nejvariabilnější, obvykle zaujímá 30 – 40 % celkové délky buněčného cyklu. Odráží se zde působení vnějších podmínek na délku buněčného cyklu. Tato fáze je hlavním kontrolním uzlem celého procesu.

S-fáze zahrnuje replikaci jaderné DNA a syntézu histonů. Její délka se liší podle typu buňky, ale u konkrétní buňky je vždy konstantní.

G₂-fáze je druhým kontrolním uzlem buněčného cyklu. Pokračuje syntéza proteinů, RNA a tvorba buněčných struktur.

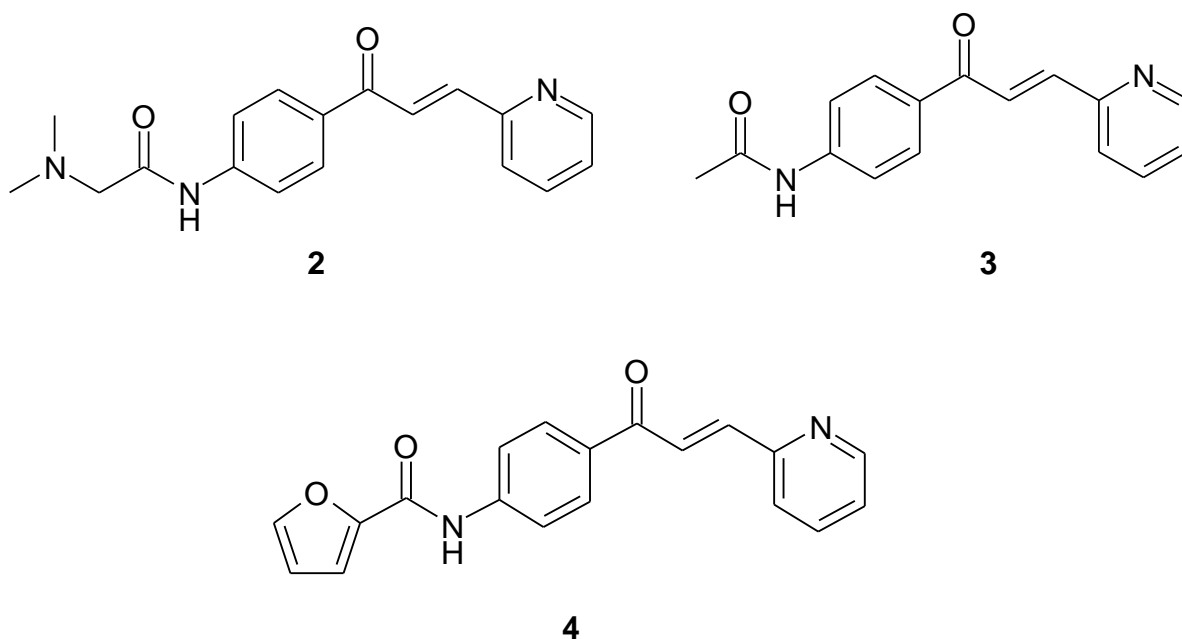
Poslední etapou buněčného cyklu je M-fáze. Její součástí jsou dva procesy: mitóza, rozdělení jádra, která je zakončená obvykle rozdělením buňky, tedy cytokinezí.¹¹

Buněčný cyklus je regulovaný proces. V organismu však mohou vzniknout buňky, které na regulační mechanismy nereagují a nekontrolovatelně se rozmnožují. Tato změna se označuje jako nádorová transformace buňky a může být základem pro vývoj nádoru.¹¹ Právě zastavení nekontrolované buněčné proliferace se stává ohniskem zájmu při hledání nových léků pro terapii nádoru.⁵

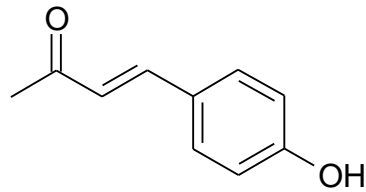
2.3.1.1 Mikrotubuly a tubulin

Nedílnou součástí buňky jsou mikrotubuly. Účastní se mnoha důležitých buněčných procesů, jako je třeba mitóza, morfogeneze, intracelulární transport nebo sekrece.¹² Vytváří cytoplazmatickou soustavu a dělicí aparát buňky, tzv. mitotické vřeténko. Základní bílkovinou mikrotubulů jsou α - a β -heterodimery tubulinu.¹¹ Právě tubulin může být terčem antiproliferativně působících látek, které se na něj naváží, tím naruší dynamickou stabilitu mikrotubulů a jejich následným rozrušením dojde k zastavení buněčného cyklu v M-fázi.

Byla popsána tři vazebná místa tubulinu, a to taxolové, vinblastinové a kolchicinové.¹³ Bylo zjištěno, že některé deriváty chalconů mají schopnost vazby právě na kolchicinové vazebné místo na β -podjednotce tubulinu. Následující látky **2**, **3** a **4** se osvědčily jako účinné inhibitory proliferace u buněčné linie HL-60.



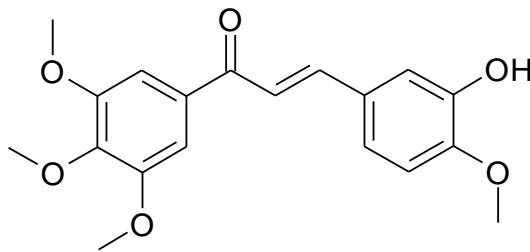
Mnohé klinicky užívané léky byly získány z přírodních zdrojů. Jich bylo využito i při hledání nových antiproliferativních látek. Z rostliny *Scutellaria barbata*, která je v tradiční čínské medicíně používána jako protizánětlivě a diuretický působící droga, byla izolována látka **5**:



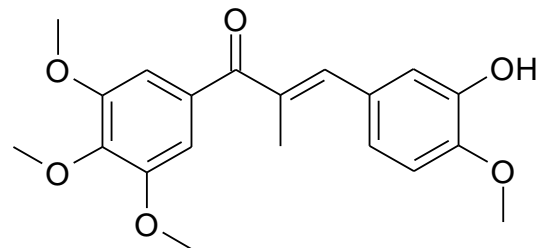
(*E*)-4-(4-hydroxyfenyl)but-3-en-2-on

5

Od ní odvozené chalkony se ukázaly jako účinné inhibitory buněčné proliferace. Přidáním methylové skupiny na uhlík v pozici α byly získány látky **6** a **7** s ještě větším potenciálem inhibice.¹⁴



6



7

Prostorové uspořádání dvou aromatických kruhů těchto látek je velmi podobné jako u kolchicinu (viz kapitola 2.3.3.1). A právě tato podobnost je základem pro jejich schopnost vázat se na tubulin a narušovat kontinuitu buněčného cyklu.¹⁴

Syntéza DNA a mitóza jsou cílem nových a v budoucnu nejspíš perspektivních derivátů chalkonů. Nejsou ale příliš účinné u pomalu rostoucích nádorů, jako je třeba rakovina tlustého střeva, kde mohou atakovat také zdravé buňky některých tkání, například kostní dřeně, vlasových folikulů nebo gastrointestinálního epitelu. Zde bylo třeba hledat látky s jiným mechanismem účinku.⁵

2.3.2 Programovaná smrt buňky

K programované smrti buňky dochází nejčastěji v průběhu embryonálního vývoje, ale také v dospělém organismu, kde slouží k odstraňování buněk opotřebovaných a nefunkčních. Je důležitá z hlediska likvidace buněk napadených viry a samozřejmě také buněk nádorových.

Je spouštěna aktivací určitých genů s projevy funkčními i morfologickými. Sled dílčích morfologicky nápadných procesů se nazývá apoptóza. Buňka zmenšuje svůj objem, vnitrobuněčné membránové systémy se odštěpují v podobě tzv. apoptotických tělísek, v něž se postupně mění celá buňka. Ta jsou následně fagocytována.

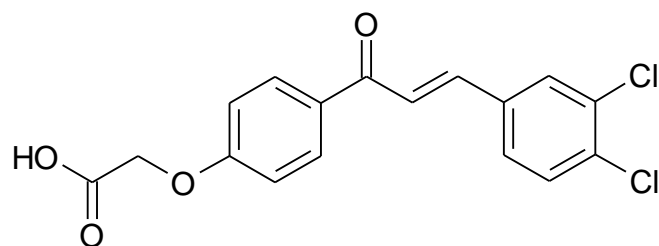
Tak jako všechny procesy v organismu, i programovaná smrt buňky je regulována, a to na genové úrovni. Některé geny apoptózu indukují, jiné potlačují.

2.3.2.1 Protein p53

Buněčný protein p53, který kontroluje buněčnou proliferaci, je produkt supresorového genu. Je odpovědný za kontrolu kvality syntézy DNA. Jestliže se v průběhu S-fáze buněčného cyklu objeví chyba v syntéze DNA, p53 aktivuje reparační proces ještě před nástupem M-fáze nebo spouští apoptózu.⁵ Stabilizace a aktivace samotného proteinu probíhá skrze řadu fosforylačních a acetylačních procesů, které jej uvolňují z vazby na MDM2 (oncoprotein mouse double minute-2).¹⁵ P53 interaguje s MDM2 na svém N-terminálním konci α -řetězce. Za normálních podmínek zde funguje zpětnovazebný mechanismus regulace, kdy syntéza p53 indukuje expresi MDM2.

Ztráta funkce p53 nebo naopak zvýšená exprese MDM2 se vyskytují až u poloviny nádorů. Právě zvýšená exprese MDM2 je typická u sarkomu, ale byla objevena i v případě rakoviny jícnu, děložního čípku, plic, nádoru v oblasti mozku a dalších typů nádorů.¹⁶

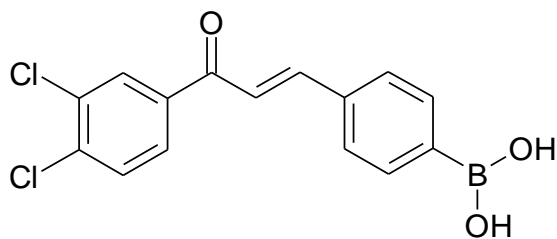
Proto se právě interakce mezi MDM2 a p53 stala dalším cílem při hledání nových protinádorových látek. Zde se jako účinné prokázaly chalkony s karboxymethoxyskupinou, které se váží na hydrofobní aktivní část N-terminálního konce MDM2.^{5,16}



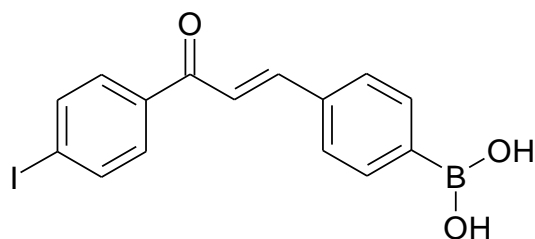
8

Výše uvedená sloučenina (**8**) kromě rozrušení vazby p53 a MDM2 zvyšuje také radiosenzitivitu nádorových buněk.⁵

Na základě zjištění, že přítomnost karboxylové skupiny je nutná k rozrušení interakce mezi onkoproteinem a proteinem p53 byla připravena také řada derivátů chalkonu s kyselinou boritou. Kyselina boritá je slabší kyselinou a při fyziologickém pH se vyskytuje převážně v neionizované formě. Zde se předpokládá spíše kovalentní vazba.⁶ Následující látky (**9** a **10**) prokázaly několikanásobně větší citlivost k buňkám nádoru prsu, na kterých byla jejich aktivita zkoušena, než ke zdravé okolní tkáni. Některé deriváty také indukovaly akumulaci p53 v buňce.¹⁵



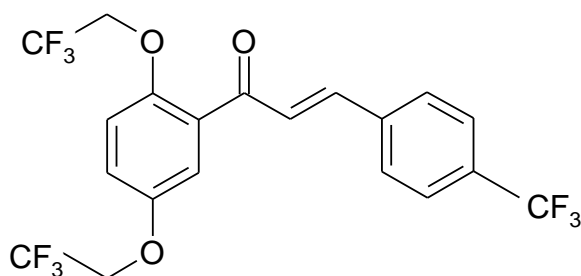
9



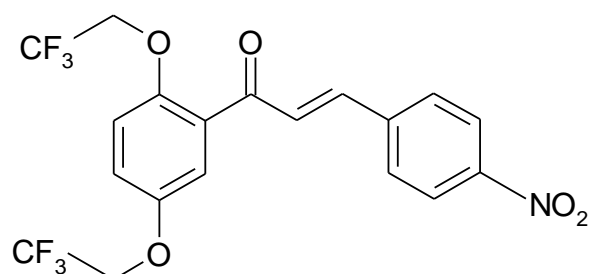
10

2.3.2.2 Aktivátory kaspas

Buněčná apoptóza může být indukována také aktivací specifických proteas, takzvaných kaspas, které štěpí a rozrušují proteiny nezbytné pro normální funkci buňky. Mnoho nádorových buněk produkuje inhibitory proteinů spouštějících apoptózu, což vede k nekontrolovanému množení buněk a vzniku nádorového bujení. Proto se některé studie zaměřily na hledání látek, které by v těchto buňkách aktivovaly kaspasy a indukovaly tak apoptózu. Vhodnými deriváty chalkonů se v tomto případě ukázaly: 1-[2,5-bis(2,2,2-trifluorethoxy)fenyl]-3-fenylpropenony (**11** a **12**).⁵

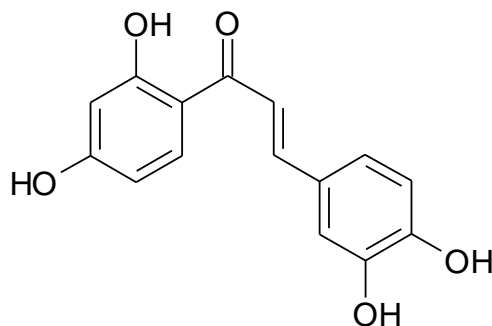


11



12

Také butein (**13**), chalkon izolovaný z rostliny *Rhus verniciflua*, která je v oblasti východní Asie tradičně používána pro léčbu bolesti, trombotických onemocnění, gastritidy, rakoviny žaludku a parazitických infekcí, má schopnost aktivovat kaspasy a indukovat apoptózu nádorových buněk.



13 butein

V dalších studiích se ukázalo, že toto není jediný mechanismus účinku, kterým butein působí.¹⁷

2.3.3 Cévní zásobení nádorů

Různá rychlost růstu nádorů souvisí s různým krevním zásobením, imunologickým dozorem, růstovými faktory a dalšími činiteli. Bohatá kapilární síť velkých nádorů může zatěžovat krevní oběh a vést ke zvýšení minutového srdečního výdeje.

Nádorová tkáň je charakteristická zvýšenou spotřebou glukosy vedoucí k hypoglykémii s následným vyplavením katecholaminů a kortizolu. V konečném důsledku dojde k odbourávání tuků a bílkovin. Anaerobní glykolýza nádorových buněk může vyvolat laktátovou acidózu.¹⁸

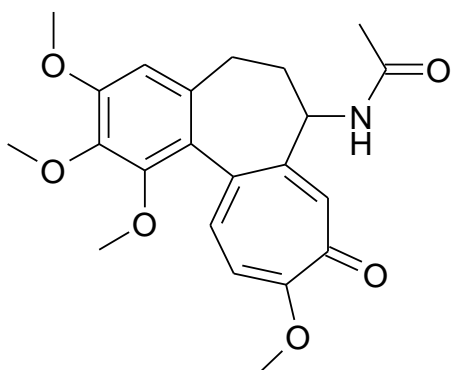
Proces tvorby nových kapilár se nazývá angiogeneze a její inhibice v nádorové tkáni je atraktivním cílem při hledání nových účinných látek pro terapii rakoviny.⁵

2.3.3.1 Kolchicin a kombretastatin A-4

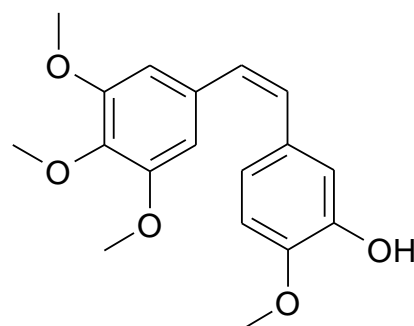
Kombretastatiny jsou skupinou látek izolovaných z jihoafrické rostliny *Combretum caffrum*. Jako nejúčinnější se ukázal kombretastatin A-4 (**15**), který se váže na tubulin, resp. na kolchicinové vazebné místo tubulinu a tím narušuje buněčný cyklus. Kromě toho se ukázalo, že jak kolchicin (**14**), tak kombretastatin A-4 (**15**) jsou schopny přerušit cévní zásobení v solidním nádoru bez ovlivnění normálních cév, a to opět vazbou na tubulin.

Mikrotubuly jsou nezbytně důležité pro zachování tvaru buňky, např. podlouhlého tvaru endoteliálních buněk cév. Při působení výše zmíněných látek dojde k narušení funkce mikrotubulů a endoteliální buňky se zaoblují a zatahují a v poměrně krátké době zablokují průtok krve do cév zásobujících nádor. Ten „vyhladoví“, neboť nemá přísun kyslíku a živin a jeho jednotlivé buňky začnou odumírat.

Při hledání a syntéze látek s podobným účinkem se vycházelo z toho, že jak kolchicin (**14**), tak kombretastatin A-4 (**15**) obsahují trimethoxyfenylový kruh.

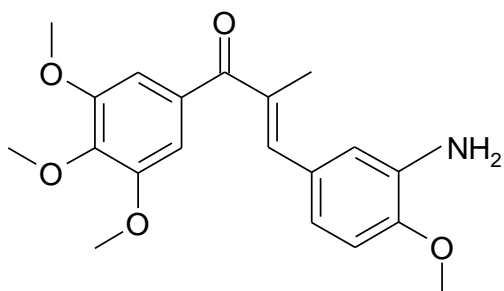


14 kolchicin

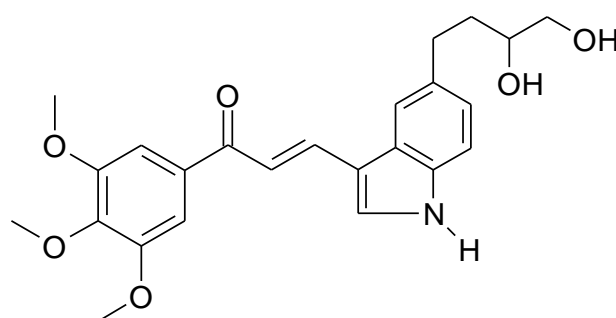


15 kombretastatin

Z řady připravených derivátů chalkonu s trimethoxyfenylovým kruhem se jako potenciální inhibitory angiogeneze ukázaly následující látky (**16** a **17**). Sloučenina (**16**) má dokonce několikanásobně větší potenciál ovlivnění mikrotubulů než kolchicin(**14**).¹⁹



16



17

2.3.3.2 Xanthoangelol a 4-hydroxyderricin

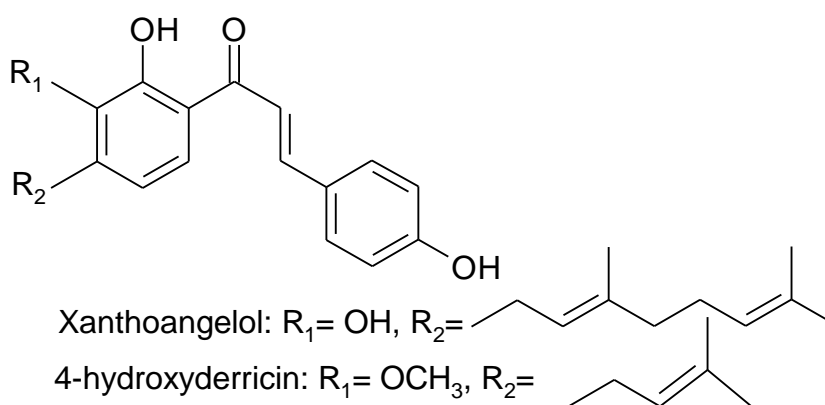
Japonská rostlina *Angelica keiskei* je využívána pro své diuretické a laxativní účinky a dále jako analeptikum a galaktagogum. Zda je také účinným profylaktikem proti koronárním onemocněním, hypertenzi a rakovině není zatím dokázáno.

Z kořene této rostliny byly izolovány jako hlavní komponenty dva deriváty chalkonu, xanthoangelol a 4-hydroxyderricin (**18**). Svým mechanismem účinku patří do této kapitoly jen xanthoangelol, který by díky své schopnosti bránit

neovaskularizaci mohl být využit nejen k terapii nádorového onemocnění, ale také jako látka bránící vzniku metastáz.

4-Hydroxyderricin působí také protinádorově a antimetastaticky, ale tím, že brání redukcii počtu lymfocytů a NK buněk v okolí nádoru.

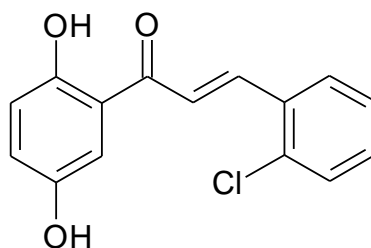
Rozdíl v mechanismu působení těchto dvou látek je připisován rozdílnému postrannímu řetězci. Tato skutečnost však zatím prokázána nebyla a k jejímu objasnění jsou třeba další studie.¹⁰



18

2.3.3.3 Další deriváty chalconu inhibující angiogenezi

Selektivní cytotoxicita proti buněčným liniím endoteliálních buněk byla prokázána i u některých zástupců 1-(2,5-dihydroxyfenyl)-3-fenylpropenonů. Nejaktivnější byla tato sloučenina: 1-(2,5-dihydroxyfenyl)-3-(2-chlorfenyl)propenon (**19**).⁶



19

2.3.4 Inhibitory tyrosinkinasy

Tyrosinkinasy jsou velkou rodinou enzymů hrající významnou roli v regulaci mnoha důležitých buněčných procesů, jako jsou buněčný růst, diferenciaci a smrt buněk. Neregulovaná tyrosinkinasová aktivita je často přítomna u nádorů, diabetu, aterosklerosy, psoriasy a zánětlivých reakcí organismu. Všechny tyto enzymy katalyzují přenos fosfátu z ATP na hydroxylovou funkční skupinu tyrosinového zbytku proteinového substrátu.²⁰

Poté, co se potvrdilo, že hyperaktivita tyrosinkinasy provází řadu onemocnění, staly se látky inhibující její činnost předmětem zájmu. Některé sloučeniny izolované z přírodních zdrojů mají schopnost inhibovat tyrosinkinasovou aktivitu. Tyto sloučeniny samotné, stejně jako mnohé jejich prekurzory mohou být předlohou pro přípravu daleko selektivnějších inhibitorů.

2.3.4.1 Struktura tyrosinkinasy

Proteintyrosinokinas existuje ve dvou hlavních formách, jako receptorová kinasa a cytoplasmatická, nebo-li nereceptorová kinasa.

Receptor obsahuje tři domény, extracelulární, která váže růstový faktor, transmembránovou, jejíž úlohou je ukotvit receptor v membráně a intracelulární kinasovou.

Na rozdíl od receptorové tyrosinkinasy je cytoplasmatická tyrosinokinas lokalizována v cytoplasmě nebo v jádře buňky, popřípadě je ukotvena na vnitřní vrstvu plazmatické membrány.

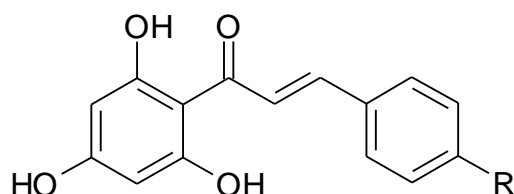
2.3.4.2 Potenciální inhibitory ze skupiny chalkonů

Inhibitory tyrosinkinasy mohou být zaměřeny dvěma způsoby. Jako substráty vazebného místa pro ATP nebo proteinu. Přičemž pro selektivitu k jednotlivým kinasám je samozřejmě výhodnější druhá možnost, neboť vazebné místo pro ATP je stejné pro všechny kinasy.

Chalkony se ukázaly jako účinné inhibitory EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor), především butein (**13**), marein a floretin (**20**). Butein (**13**), zmíněný již jako induktor apoptózy, je specifickým inhibitorem EGFR

v buňkách jaterního karcinomu, marein a floretin (**20**) byly vůči těmto buňkám neaktivní.

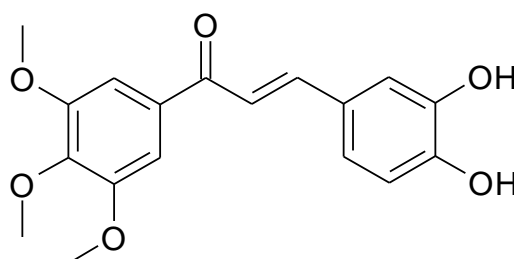
Po bližším prozkoumání vztahu mezi strukturou a účinkem těchto sloučenin se jako důležitá ukázala hydroxylace na obou kruzích v poloze 4.²⁰



Floretin: R=H
Marein: R= OH

20

DMU-135 (1-(3,4,5-trimethoxyfenyl)-3-(3,4-methylenedioxyfenyl)propenon) je proléčivem, které se v organismu, resp. v nádorové tkáni rozkládá působením enzymu CYP1B1 na aktivní metabolit DMU-117 (**21**). Tento derivát chalkonu inhibuje až 30 % celkové buněčné tyrosinkinasové aktivity.²¹

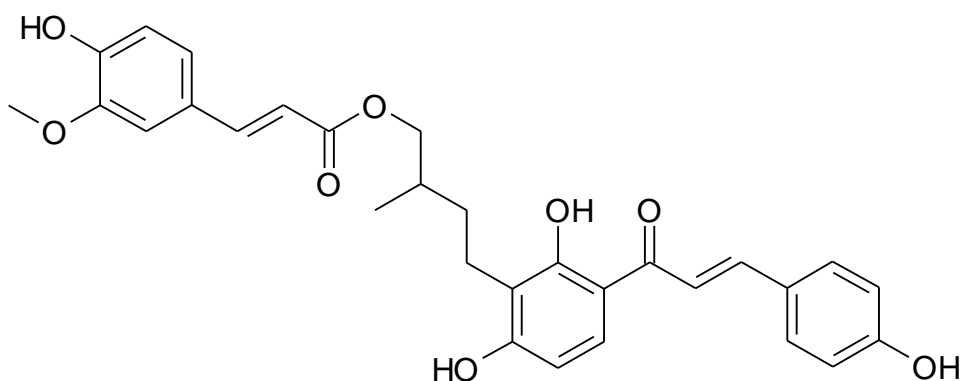


21

2.3.5 Hormon dependentní nádory

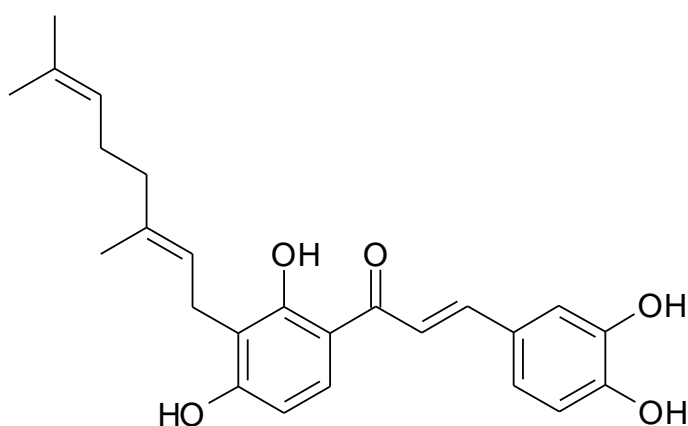
Je dokázáno, že růst některých nádorů je podporován endogenními hormony. Použití látek, které působí na receptory příslušných hormonů nebo ovlivňují enzymy nezbytné k jejich syntéze, je jednou z možností terapie těchto typů nádoru. I v této oblasti jsou předmětem zkoumání chalkony.

Některé deriváty chalkonu vykazují vysokou afinitu k estrogenímu receptoru typu II a antiproliferativní účinky. Isogemichalkon (**21**), jeho demethoxylovaný derivát a chalkon substituovaný na jádře A prenylem inhibují aromatasu, enzym katalyzující poslední krok syntézy estrogenu. Tyto látky by mohly hrát velmi významnou roli v terapii rakoviny prsu.



21 isogemichalkon

U benigní hyperplazie prostaty je obvykle zvýšené množství dihydrotestosteronu. Ten vzniká přeměnou testosteronu za účasti steroid-5 α -reduktasy. Jako potencionální inhibitor tohoto enzymu se ukázal chalkon **22** izolovaný z rostliny *Artocarpus incisus*. K aktivitě této látky zřejmě přispívá i geranylový substituent, neboť nesubstituovaný derivát vykazoval o polovinu nižší aktivitu.⁵



22

Xanthohumol, chalkon izolovaný z chmele (*Humulus lupulus*), byl předmětem zájmu v mnoha studiích. Ukázalo se, že má poměrně široké spektrum mechanismu účinku na ranná i pokročilá stádia karcinogeneze.

Při zkoumání jeho vlivu na karcinom štítné žlázy se zjistilo, že xanthohumol zvyšuje vstřebávání jodu, resp. jodidového aniontu, což by mohlo mít značný přínos pro radioterapii jodem u karcinomu štítné žlázy nebo prsu.

Jod je důležitým prvkem pro biosyntézu hormonů štítné žlázy, tyroxinu a trijodtyroninu. Do folikulárních buněk je transportován pomocí sodno-jodidového přenašeče. Tento přenašeč zprostředkovává symport jednoho jodidového aniontu s dvěma sodnými kationty.²²

2.4 Chalkon jako inhibitor proliferace

Nejen deriváty chalkonu, ale také jejich výchozí struktura (1,3-difenyprop-2-en-1-on, **1**) je předmětem zájmu při hledání účinných antiproliferativních látek k terapii rakoviny prsu, která je po rakovině kůže nejrozšířenějším typem rakoviny mezi ženami.“

Při zkoumání mechanismu účinku se zjistilo, že chalkon inhiboval růst nádorových buněk dvou testovaných buněčných linií, a to MCF-7 a MDA-MB-231 přerušením buněčného cyklu.

Jeho další schopností je vyvolat apoptózu. Nebyl zjištěn významný vliv chalkonu na expresi p53, ale ukázalo se, že aktivuje kaspasy a tím spouští proces programované smrti buňky.²³

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Syntéza chalkonů

3.1.1 Charakteristika použitých metod

Jako výchozí surovina pro syntézy byl používán komerčně dostupný pyrazin-2-karbonitril (Aldrich) a 4-brombenzaldehyd (Fluka). Diethylether pro Grignardovu reakci byl sušen 24hodinovým stáním nad hydroxidem draselným, následně 24hodinovým stáním nad sodíkem a poté byl predestilován. Bezvodý ethanol byl získán vysušením nad molekulovými síty a predestilováním. Ostatní rozpouštědla byla použita v kvalitě dodané výrobcem.

Tenkvrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Charakter stacionární a složení mobilní fáze u sloupcových chromatografií je vždy uvedeno u jednotlivých látek.

Vzorky pevných látek byly pro měření teploty tání, elementární analýzy, IČ a NMR sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku podle Bötia a nejsou korigovány.

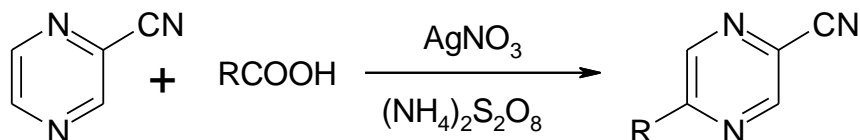
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400 a vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-Vx BB 300. Chemické posuny jsou uváděny jako hodnoty δ v ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu přes signál rozpouštědla (7,26 pro ^1H a 77,0 pro ^{13}C v CDCl_3).

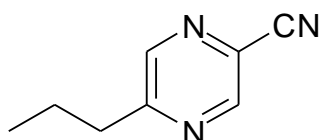
3.1.2 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

Obecný postup:



Pyrazin-2-karbonitril (0,1 mol) byl rozpuštěn v 300 ml vody zahřáté na 80°C. K tomuto roztoku byl přidán dusičnan stříbrný (0,01 mol) a příslušná kyselina (0,1 mol). Za míchání byl přikapán roztok peroxidisíranu amonného (0,08 mol) ve vodě (70 ml). Teplota byla udržována v rozmezí 75 – 80°C a směs byla hodinu míchána. Zchladlá směs byla poté zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného na pH 9 – 10 a kontinuálně extrahována diethyletherem. Etherový výtřepek byl vysušen bezvodým síranem sodným, naadsorbován na silikagel a podroben dělení na sloupci (Silikagel 60 Fluka (0,063 – 0,2 mm), 500 g) za použití soustavy lékařský benzin – ethyl-acetát v poměru 8:2.

5-propylpyrazin-2-karbonitril



Při syntéze bylo použito 8,81 g kyseliny máselné.

Sumární vzorec: C₈H₉N₃

Molekulová hmotnost: 147,18

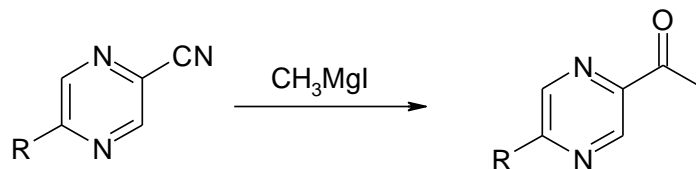
Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek: 7,4 g (50 %)

Identita látky byla ověřena pomocí TLC podle dříve připraveného standardu.²⁴

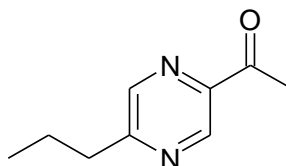
3.1.3 Příprava acetylpyrazinů

Obecný postup:



K methylmagnesiumjodidu (0,3 mol) v 200 ml absolutního diethyletheru byl za míchání při teplotě -10 až $+10^{\circ}\text{C}$ přikapán roztok nitrilu (0,128 mol) v 50 ml absolutního diethyletheru. Směs byla při této teplotě míchána 1 hodinu a pak byla rozložena opatrným vylitím na led. Vyloučená sraženina byla částečně rozpuštěna přidáním 50 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné objemově 1:1 a směs byla kontinuálně extrahována diethyletherem. Etherový extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a ether byl vakuově oddestilován na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn destilací za sníženého tlaku.

5-propyl-2-acetylpyrazin



Sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$

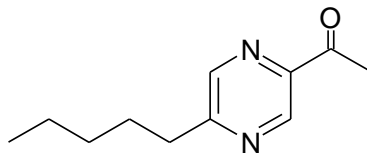
Molekulová hmotnost: 164,21

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Teplota varu: $109 - 114^{\circ}\text{C} / 1,47 \text{ kPa}$ ($118 - 122^{\circ}\text{C} / 1,99 \text{ kPa}$ ²⁴)

Výtěžek: 7,11 g (68 %)

5-pentyl-2-acetylpyrazin



Sumární vzorec: C₁₁H₁₆N₂O

Molekulová hmotnost: 192,26

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

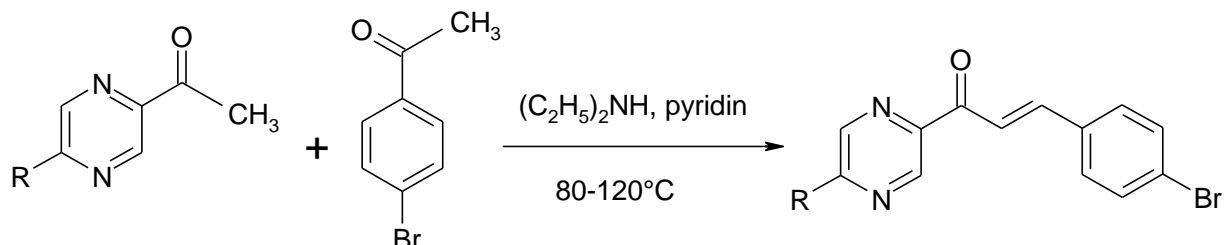
Teplota varu: 100 – 125 °C / 1,33 kPa (120 – 125 °C/1,33 kPa)

Výtěžek: 0,85 g (14 %)

Identita obou látek byla ověřena pomocí TLC pomocí dříve připraveného standardu.²⁵

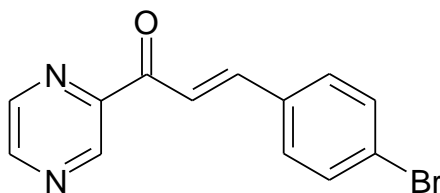
3.1.4 Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(4-bromfenyl)prop-2-en-1-onů Claisen-Schmidtovou kondenzací

Obecný postup přípravy v prostředí pyridinu za katalýzy diethylaminem:



Acetylpyrazin (0,015 mol) a 4-brombenzaldehyd (0,015 mol) byly rozpuštěny v 6,6 ml pyridinu. Po přidání diethylaminu (0,015mol) byla směs zahřívána 1 hodinu na glycerinové lázni při teplotě 80 – 120°C. Po zchlazení byla směs nalita do 300 ml ledové vody okyselené kyselinou octovou na pH 3 a uložena na 24 hodin do lednice. Podle charakteru vyloučené látky (olej, pevná látka) byl zvolen způsob čištění finálního produktu

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-on (CH-0/2r)



Reakční směs byla z vody vytřepána do diethyletheru a etherová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Směs byla naadsorbována na silikagel a podrobena sloupcové chromatografii. Čisté frakce byly poté překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Podmínky chromatografie:

stacionární fáze: 125 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, deaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 8 : 2 (v/v)

Sumární vzorec: C₁₃H₉BrN₂O

Molekulová hmotnost: 289,13

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 163 – 168 °C

Výtěžek: 0,37 g (9 %)

Elementární analýza:

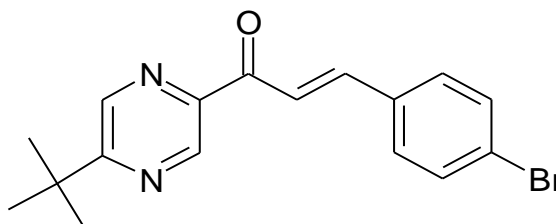
	% C	% H	% N
Vypočteno	54,00	3,14	9,69
Nalezeno	53,19	3,58	9,21

IČ spektrum (KBr): 2963, 2923 (C-H alif., valenční), 1671 (C=O, valenční),
1605 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,37 (1H; d; *J*=1,5 Hz; H3'); 8,78 (1H; d; *J*=2,5 Hz; H6'); 8,69 (1H; dd; *J*=2,5 Hz; *J*=1,5 Hz; H5'); 8,17 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H3); 7,89 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H2); 7,61-7,52 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6'')

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 148,2; 147,6; 144,9; 144,2; 143,3; 133,6;
132,2; 130,2; 125,3; 120,5

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-1r)



Z vody vypadly krystaly, které byly 2× překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇BrN₂O

Molekulová hmotnost: 345,24

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 139 – 142 °C

Výtěžek: 0,10 g (2 %)

Elementární analýza:

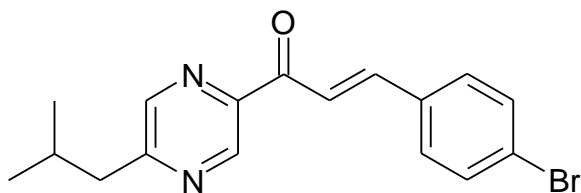
	% C	% H	% N
Vypočteno	59,14	4,96	8,11
Nalezeno	59,34	5,14	8,24

IČ spektrum (KBr): 2959, 2903 (C-H alif., valenční), 1669 (C=O, valenční), 1603 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,28 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H3'); 8,73 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H6'); 8,17 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H2); 7,62-7,51 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 1,45 (9H; s; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,5; 167,8; 145,6; 143,6; 143,3; 139,9; 133,8; 132,2; 130,2; 125,1; 120,9; 37,1; 29,7

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-2r)



Látka byla připravena z 0,014 mol výchozích sloučenin. Z vody vypadly krystaly, které byly 2× překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇BrN₂O

Molekulová hmotnost: 345,24

Vzhled: žluté jehlicovité krystaly

Teplota tání: 109 – 111 °C

Výtěžek: 0,14 g (3 %)

Elementární analýza:

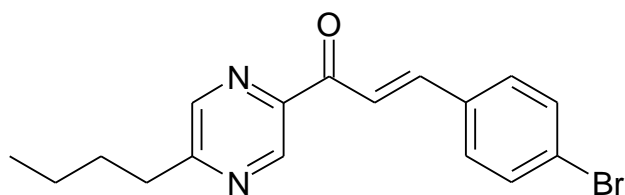
	% C	% H	% N
Vypočteno	59,14	4,96	8,11
Nalezeno	58,96	5,12	8,21

IČ spektrum (KBr): 2956, 2929, 2895, 2866 (C-H alif., valenční), 1668 (C=O, valenční), 1602 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,28 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H3'); 8,49 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H6'); 8,17 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=16,1 Hz; H2); 7,61-7,51 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 2,79 (2H; d; *J*=6,9 Hz; CH₂); 2,27-2,08 (1H; m; CH); 0,97 (6H; d; *J*=6,9 Hz; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 160,6; 146,0; 144,0; 143,8; 143,3; 133,7; 132,2; 130,2; 125,2; 120,8; 44,7; 29,2; 22,3

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-3r)



Látka byla připravena z 0,0125 mol výchozích sloučenin. Reakční směs byla z vody vytřepána do diethyletheru a etherová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Směs byla naadsorbována na silikagel a podrobena sloupcové chromatografii. Čisté frakce byly poté překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Podmínky chromatografie:

stacionární fáze: 125 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, deaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 9 : 1 (v/v)

Sumární vzorec: $C_{17}H_{17}BrN_2O$

Molekulová hmotnost: 345,24

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 115 – 116 °C

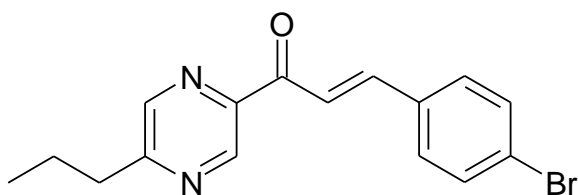
Výtěžek: 0,12 g (3 %).

Elementární analýza :

	% C	% H	% N
Vypočteno	59,14	4,96	8,11
Nalezeno	59,05	5,33	8,40

IČ spektrum (KBr): 3050, 3007,3005 (C-H arom., valenční), 2956, 2930, 2871, 2858 (C-H alif., valenční), 1669 (C=O, valenční), 1606, 1600 (C=C, valenční.)
¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,27 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H3'); 8,52 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H6'); 8,16 (1H; d; *J*=16,2 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=16,2 Hz; H2); 7,62-7,51 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 2,92 (2H; t; *J*=7,5 Hz; CH₂); 1,85-1,70 (2H; m; CH₂); 1,50-1,34 (2H; m; CH₂); 0,96 (3H; t; *J*=7,5 Hz; CH₃)
¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 161,5; 145,9; 144,1; 143,7; 142,8; 133,8; 132,2; 130,2; 125,1; 120,9; 35,5; 31,4; 22,4; 138,8

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-4r)



Reakční směs byla z vody vytřepána do diethyletheru a etherová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Směs byla naadsorbována na silikagel a podrobena sloupcové chromatografii. Čisté frakce byly poté překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Podmínky chromatografie:

stacionární fáze: 125 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, deaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 8 : 2 (v/v)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₅BrN₂O

Molekulová hmotnost: 331,21

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 95 – 98 °C

Výtěžek: 0,19 g (4 %)

Elementární analýza:

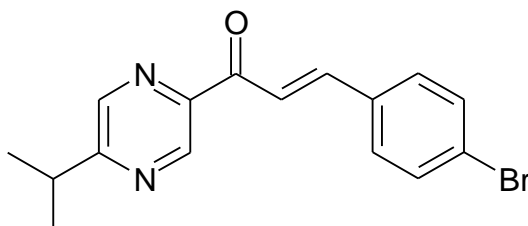
	% C	% H	% N
Vypočteno	58,02	4,56	8,46
Nalezeno	57,63	4,80	8,57

IČ spektrum (KBr): 3077, 3050, 3007 (C-H arom., valenční), 2958, 2933, 2872 (C-H alif., valenční), 1670 (C=O, valenční), 1606, 1600 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,7 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H3'); 8,52 (1H; d; *J*=1,4 Hz; H6'); 8,16 (1H; d; *J*=15,9 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=15,9 Hz; H2); 7,61-7,51 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 2,90 (2H; d; *J*=7,6 Hz; CH₂); 1,91-1,75 (1H; m; CH₂); 1,01 (3H; t; *J*=7,6 Hz; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 161,2; 146,0; 144,0; 143,7; 142,9; 133,8; 132,2; 130,2; 125,1; 120,8; 37,7; 22,6; 13,8

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-10r)



Reakční směs byla z vody vytřepána do diethyletheru a etherová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Směs byla naadsorbována na silikagel a opakovaně podrobena sloupcové chromatografii. Čisté frakce byly poté překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 125 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, desaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 8 : 2 (v/v)

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 30 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, desaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 9 : 1 (v/v)

Sumární vzorec: C₁₆H₁₅BrN₂O

Molekulová hmotnost: 331,21

Vzhled: žluté jehlicovité krystaly

Teplota tání: 106 – 108 °C

Výtěžek: 0,19 g (4 %)

Elementární analýza:

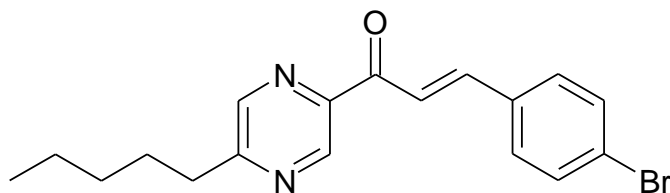
	% C	% H	% N
Vypočteno	58,02	4,56	8,46
Nalezeno	57,92	4,75	8,52

IČ spektrum (KBr): 3069, 3038 (C-H arom., valenční), 2972,2930, 2867 (C-H alif., valenční), 1667 (C=O, valenční), 1600 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,27 (1H; d; *J*=1,5 Hz; H3'); 8,56 (1H; d; *J*=1,5 Hz; H6'); 8,16 (1H; d; *J*=15,8 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=15,8 Hz; H2); 7,61-7,52 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 3,31-3,15 (1H; m; CH); 1,38 (6H; d; *J*=7,0 Hz; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 165,8; 146,2; 143,9; 143,7; 141,5; 133,8; 132,2; 130,2; 125,1; 120,9; 34,3; 22,0

(E)-3-(4-Bromfenyl)-1-(5-pentylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (CH-13r)



Látka byla připravena z 0,0043 mol výchozích sloučenin. Reakční směs byla z vody vytřepána do diethyletheru a etherová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným. Směs byla naadsorbována na silikagel a podrobena sloupcové chromatografii. Čisté frakce byly poté překrystalovány z bezvodého ethanolu.

Podmínky chromatografie:

stacionární fáze: 75 g Silpearlu pro TLC (regenerovaný, deaktivovaný 5 % vody)

mobilní fáze: lékařský benzin + ethyl-acetát 9 : 1 (v/v)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{19}BrN_2O$

Molekulová hmotnost: 359,27

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 98 – 100 °C

Výtěžek: 0,089 g (6 %)

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	60,18	5,33	7,80
Nalezeno	59,72	5,58	7,88

IČ spektrum (KBr): 2955, 2924, 2892, 2868, 2858 (C-H alif., valenční), 1669 (C=O, valenční), 1603 (C=C, valenční)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃) δ 9,27 (1H; d; *J*=1,1 Hz; H3'); 8,52 (1H; d; *J*=1,1 Hz; H6'); 8,16 (1H; d; *J*=16,2 Hz; H3); 7,87 (1H; d; *J*=16,2 Hz; H2); 7,62-7,51 (4H; m; H2''; H3''; H5''; H6''); 2,91 (2H; t; *J*=7,4 Hz; CH₂); 1,87-1,71 (2H; m; CH₂); 1,46-1,28 (4H; m; CH₂); 0,90 (3H; t; *J*=7,4 Hz; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃) δ 188,4; 161,5; 145,9; 144,1; 143,7; 142,8; 133,8; 132,2; 130,2; 125,1; 120,9; 35,8; 31,4; 29,0; 22,4; 13,9

3.2 Biologické hodnocení

3.2.1 Testování antifungální aktivity

Antifungální hodnocení chalkonů bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd Mgr. Marcelou Vejsovou.

In vitro antifungální aktivita připravených sloučenin byla testována mikrodiluční bujónovou metodou na těchto 8 kmenech: *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/l (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM). Všechny kmeny byly kultivovány na Sabouraudově půdě (SDA, Difco) a v tomto médiu byly dále udržovány při teplotě 4 °C. Před testováním byl každý kmen naočkován na SDA a houbové inokulum bylo připraveno suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospór ve sterilním 0,85% roztoku NaCl. Hustota buněk byla určena pomocí Bürkerovy komůrky a byly tak připraveny zásobní suspence o $1,0 \pm 2,0 \times 10^5$ CFU \times ml⁻¹. Použité inokulum bylo získáno zředěním zásobního roztoku testovacím médiem v poměru 1 : 20.

Vzorky látek byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a antifungální aktivita byla určena v médiu RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) pufovaném na pH 7,0 pomocí 0,165 M kyseliny 3-(*N*-morfolino)propansulfonové. Se vzorky látek byl připraven zároveň kontrolní vzorek. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) jsou definovány jako 80% inhibice růstu hub v porovnání s kontrolním vzorkem. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách statické inkubace při 35 °C. V případě *T. mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Ketokonazol (Janssen Pharmaceutica) a flukonazol (Pfizer) byly použity jako porovnávací antimykotika..

Antifungální aktivita 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(4-bromfenyl)prop-2-en-1-onů vyjádřená jako MIC/MIC₈₀ ($\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$):

Kmen	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM
Doba inkubace	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h
ketokonazol	0,061	1,95	1,95	0,49	0,061	7,81	15,63	0,49
	0,122	3,91	3,91	1,95	0,122	7,81	31,25	1,95
flukonazol	0,82	1,63	52,24	13,06	3,26	>417,9	>417,9	26,12
	1,63	>417,9	104,47	52,24	6,53	>417,9	>417,9	52,24
CH-0/2-r	15,62	31,25	32,6	>125	>125	125	>125	3,9
	31,25	125	>125	>125	>125	>125	>125	7,8
CH-1r	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
CH-2r	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CH-3r	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
CH-4r	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	62,5
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125
CH-10r	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	62,5
CH-13r	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

4. DISKUSE

Cílem této diplomové práce, která navazuje na přechozí práce vypracované na katedře^{26,27}, bylo připravit sérii potenciálních léčiv ze skupiny chalkonů. Jednalo se o bromované deriváty pyrazinových analogů chalkonů různě alkylované na kruhu A v poloze 5. Dříve připravené chlorované deriváty byly špatně rozpustné v DMSO, což ztěžovalo hodnocení antifungální aktivity.²⁸

Pro syntézu některých finálních látek bylo nutno připravit také meziprodukty, a to alkylovaný karbonitril a acetylpyraziny, jejichž identita byla ověřena porovnáním se standardem připraveným dříve. Ostatní meziprodukty byly na katedře k dispozici.^{24,25}

Deriváty chalkonů byly připraveny Claisen-Schmidtovou kondenzací, metodou, která je na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv používaná již dlouhodobě. Výtěžky některých surových látek se pohybovaly okolo 50 % teoretického výtěžku, po krystalizaci byly v rozmezí 2 – 9 % teoretického výtěžku, což mohlo být způsobeno také opakovaným chromatografickým dělením. Jejich čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou s odchylkou do 0,5 % vypočteného procentuálního zastoupení prvků. Charakterizovány byly teplotou tání, IČ a NMR spektry. Ve všech případech se jednalo o *E*-isomery. Tyto deriváty nebyly dosud v literatuře popsány.

Větší odchylka v čistotě se objevila u nealkylovaného derivátu, proto byla syntéza opakována, ale ani poté nevyhovovala ve všech parametrech elementární analýzy. Odchylka v procentuálním zastoupení uhlíku činila 0,81% od vypočtené hodnoty.

Všechny připravené deriváty chalkonu byly hodnoceny na antifungální aktivitu. Většina derivátů vykazovala jen velmi slabou aktivitu. Proti *Trichophyton mentagrophytes* se jako středně účinný ukázal derivát s propylem a isopropylem. Paradoxně nejúčinnější látkou celé série pyrazinových analogů byl právě nealkylovaný derivát, který vykazoval střední účinnost proti kmenům *Candida albicans*, *Candida krusei* a *Candida tropicalis* a účinně inhiboval také růst *Trichophyton mentagrophytes*. Je možné, že na těchto inhibičních schopnostech se podílejí právě nečistoty, které zde zůstaly po syntéze.

5. ZÁVĚR

Jako meziprodukty pro Claisen-Schmidtovu kondenzaci byly připraveny tyto látky:

- ✓ 5-propylpyrazin-2-karbonitril
- ✓ 5-propyl-2-acetylpyrazin
- ✓ 5-pentyl-2-acetylpyrazin

Claisen-Schmidtovou kondensací byly připraveny tyto bromované deriváty pyrazinových analogů chalkonů různě alkylované na kruhu A:

- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- ✓ (*E*)-3-(4-bromfenyl)-1-(5-pentylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on

Výše uvedené deriváty chalkonů nebyly dosud v literatuře popsány. Všechny chalkony byly otestovány na antifungální aktivitu a některé byly zaslány na antimykobakteriální hodnocení do programu TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility), který je součástí National Institute of Health (USA).

6.PŘÍLOHY

6.1 Příloha 1 *Abstrakt diplomové práce*

CHALKONY A JEJICH ANALOGY JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA VIII.

Veronika Tyllová

Katedra farmaceutické chemie a kontory léčiv, Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty antineoplastické účinky chalkonů. Jsou zde popsány možné mechanismy působení přírodních i syntetických derivátů chalkonu. Některé zasahují do buněčného cyklu, jiné spouštějí proces apoptózy, ovlivňují činnost enzymů nebo funkci membrán.

V rámci experimentální části byly syntetizovány Claisen-Schmidtovou kondenzací pyrazinové analogy chalkonů substituované bromem. Byly připraveny také některé meziprodukty ke kondenzaci. Celkem bylo připraveno 7 finálních sloučenin, které dosud nebyly popsány v literatuře. Všechny produkty byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry. Čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou.

Látky byly testovány na vybrané druhy hub a některé byly zaslány na antimykobakteriální hodnocení.

6.2 Příloha 2 *Abstract of the diploma thesis*

CHALCONES AND THEIR ANALOGUES AS POTENTIAL DRUGS VIII.

Veronika Tyllová

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University
in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové, Czech Republic

In the theoretical part of this diploma thesis there are resumed antineoplastic activities of chalcones. Possible mechanisms of effect of the naturally occurring or synthetic chalcone derivatives are described there. Some chalcones interfere with the cell cycle, other derivatives start up the apoptotic process, influence the activity of enzymes or the function of membranes.

In the frame of the experimental part bromine substituted pyrazine analogues of chalcone were synthesized by Claisen-Schmidt condensation. There were prepared some of the intermediate products needed for the condensation. Seven final compounds, that have not been described yet in literature, were prepared. All the products were characterized by melting points, IR and NMR spectra. Their purity was checked by thin-layer chromatography and elemental analysis.

Compounds were tested on selected strains of fungi and some of them have been sent to antimycobacterial evaluation.

7. LITERATURA

- ¹ Opletalová, V. *et al.*: Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71 (2006) 44 – 58
- ² Opletalová, V. *et al.*: Conformational analysis of 2-hydroxy-2',5'-diazachalcones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 55 – 59
- ³ Opletalová, V. *et al.*: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 57 (2002) 135-144
- ⁴ Modzelewska, A. *et al.*: Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3491 – 3495
- ⁵ Ni, L. *et al.*: Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin. Ther. Patents* 14 (2004) 1669-1691
- ⁶ Go, M. L. *et al.*: Chalcones: An update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 483 – 499
- ⁷ Liu, X. *et al.*: Antiproliferative properties of piperidinylchalcones. *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 153-163
- ⁸ Chlupáčová, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva. *Disertační práce*: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006, 182 s.
- ⁹ Rao, Y. K. *et al.*: Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 2679 – 2686
- ¹⁰ Kimura, Y. *et al.*: New anticancer agents: *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo* 19 (2005) 37 – 60
- ¹¹ Nečas, O. *et al.*: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vydání. (2000) 265 – 278, ISBN 80-860022-46-3, H & H Vyšehradská, s.r.o., Jinočany
- ¹² Bhat, B.A. *et al.*: Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3177 – 3180

-
- ¹³ Kim, D. Y. *et al.*: Design and biological evaluation of novel tubulin inhibitors as antimetabolic agents using a pharmacophore binding model with tubulin. *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5664 – 5670
- ¹⁴ Ducki, S. *et al.*: Potent antimetabolic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 1051 – 1056
- ¹⁵ Achanta, G. *et al.*: A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome. *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 426 – 433
- ¹⁶ Buolamwini, J. K. *et al.*: Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr. Cancer Drug Target* 5 (2005) 57 – 68
- ¹⁷ Samoszuk, M. *et al.*: The chalcone butein from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured with fibroblasts. *BMC Comp. Alter. Med.* 5 (2005) 1 – 5
- ¹⁸ Hulín, *et al.*: Patofyziologie. 6. přepracované a doplněné vydání. (2002) 220 – 221, SAP – Slovak Academic Press, s.r.o., Bratislava
- ¹⁹ Lawrence, N. J. *et al.*: The chemistry and biology of antimetabolic chalcones and related enone systems. *Curr. Pharm. Design* 11 (2005) 1679 – 1693
- ²⁰ Hollósy, F. *et al.*: Plant – derived protein tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* 4 (2004) 173 – 197
- ²¹ Sale, S. *et al.*: Effects of the potential chemopreventive agent DMU-135 on adenoma development in the Apc^{Min+} mouse. *Invest. New Drugs* 24 (2006) 459-464
- ²² Radovič, R. *et al.*: Xanthohumol stimulates iodide uptake in rat thyroid-derived FRTL-5 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (2005) 832 – 836
- ²³ Hsu, Y.L. *et al.*: Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 704 – 713
- ²⁴ Opletalová, V. *et al.*: 5-alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61 (1996) 1093 – 1101

²⁵ Kučerová-Chlupáčová, M *et al.*: New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine rings derived from RP-HPLC study. *Collect. Czech. Chem. Commun* 73 (2008) 1 – 18

²⁶ Doseděl, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VI. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005, 48 s.

²⁷ Švédová, L.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VII. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2007, 51 s.

²⁸ Chlupáčová, M. *et al.*: Synthesis and biological evaluation of some ring substituted (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Farm. Univ. Carol.* 33 (2005) 31 – 43