

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza a hodnocení potenciálních biologicky aktivních derivátů a analog rhodaninu

Bc. Adéla Šimková

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto textem poděkovat všem, díky kterým tato diplomová práce mohla vzniknout, a to zejména mému vedoucímu práce, panu doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za trpělivé a pečlivé vedení mé práce, paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., za testování enzymatické aktivity a za skvělý přístup s možností si testování vyzkoušet, dále bych chtěla poděkovat paní Idě Dufkové za testování antibakteriální a antifungální aktivity, panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D., za otestování antimykobakteriální aktivity a v neposlední řadě kolektivu KOBCH za NMR a IR analýzu všech sloučenin.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Teoretická část	3
2.1 Mechanismus účinku inhibitorů cholinesteráz	3
2.2 Onemocnění související s poruchou cholinergního systému	5
2.2.1 Alzheimerova choroba	5
2.2.2 Myasthenia gravis	7
2.3 Významné skupiny inhibitorů cholinesteráz	9
2.3.1 Tradiční inhibitory	9
2.3.1.1 Rivastigmin	9
2.3.1.2 Donepezil.....	9
2.3.1.3 Takrin.....	10
2.3.2 Inhibitory přírodního původu.....	10
2.3.2.1 Fyzostigmin	10
2.3.2.2 Galantamin.....	11
2.3.2.3 Huperzin	12
2.3.3 Nová generace inhibitorů.....	12
2.3.3.1 Fenserin.....	12
2.3.3.2 Tolserin.....	13
2.3.4 Inhibitory využívané v terapii myasthenia gravis.....	14
2.4 Design cílových molekul.....	16
2.4.1 Rhodaniny	16
3. Cíl práce.....	17
4. Experimentální část.....	18
4.1 Chemie	18
4.1.1 Obecné metody.....	18
4.1.2 Příprava cílových sloučenin.....	19
4.1.2.1 Obecný postup přípravy.....	19
4.1.2.2 Přípravy a charakterizace jednotlivých cílových sloučenin	21
4.2 Biochemie.....	38
4.2.1 Stanovení inhibiční aktivity AChE a BChE.....	38

4.3	Biologie.....	40
4.3.1	Antibakteriální aktivita.....	40
4.3.2	Antimykobakteriální aktivita.....	41
4.3.3	Antifungální aktivita.....	42
5.	Výsledky a diskuze.....	44
5.1	Syntéza.....	44
5.2	Biochemické hodnocení.....	45
5.3	Biologické hodnocení.....	49
8.	Seznam obrázků, schémat, tabulek a grafů.....	56
9.	Použitá literatura.....	57
	PŘÍLOHA – VYBRANÁ IR SPEKTRA.....	63

ABSTRAKT

Tématem této diplomové práce je syntéza derivátů rhodaninu a studium jejich biologické aktivity, zejména jako potenciálních inhibitorů cholinesteráz. Tato skupina látek se uplatňuje v terapii různých onemocnění, např. Alzheimerovy choroby nebo myasthenia gravis.

Všechny syntetizované sloučeniny vycházejí ze struktury rhodaninu (2-thioxothiazolidin-4-on), což je významná heterocyklická sloučenina se širokým spektrem biologických aktivit. Tuto strukturu lze různě modifikovat, čehož lze využít při vývoji nových léčiv. U sloučenin vycházejících ze struktury rhodaninu byl prokázán kromě protizánětlivého nebo protirakovinového účinku také antibakteriální a antifungální účinek, ale také inhibiční aktivita vůči různým enzymům, např. cholinesterázám.

Bylo nasyntetizováno sedmnáct sloučenin v dostatečném množství pro charakterizaci a hodnocení biologické aktivity (7-93 %). Ve většině případů se jedná o amidy, které vychází ze struktury 2-thioxothiazolidin-4-onu nebo thiazolidin-2,4-dionu, a byly připraveny karbodiimidovým couplingem, ostatní deriváty vychází ze struktury 2-thioxothiazolidin-4-onu a 2,4-dioxothiazolidin-3-octové kyseliny a jedná se o nenasycené sloučeniny připravené Knoevenagelovou kondenzací v ledové kyselině octové.

U všech sloučenin byla otestována jejich inhibiční aktivita vůči cholinesterázám, tj. acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BChE) pomocí Ellmanovy metody (výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty IC_{50}), u nejúčinnější sloučeniny byl stanoven i typ inhibice. Dále byla testována jejich antibakteriální (vůči G⁺ a G⁻ bakteriím), antifungální a antimykobakteriální aktivita pomocí mikrodiluční bujónové metody (výsledky byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace, MIC). Nejnižší hodnota IC_{50} byla naměřena u 2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-N-(3,4,5-trichlorfenyl)acetamidu, a to konkrétně 34,42 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 2,91 $\mu\text{mol/l}$ pro BChE a jednalo se o reverzibilní kompetitivní typ inhibice. Nejnižší hodnoty MIC byly stanoveny u (Z)-5-(5-brom-2-hydroxybenzyliden)-3-methyl-2-thioxothiazolidin-4-onu, (Z)-2-[5-(5-brom-2-hydroxybenzyliden)-2,4-dioxothiazolidin-3-yl]octové kyseliny a (Z)-5-(5-brom-2-

hydroxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-onu: 125 $\mu\text{mol/l}$ pro bakterie, 62,5 $\mu\text{mol/l}$ pro houby a 15,625 $\mu\text{g/ml}$ pro mykobakterie.

Klíčová slova

Acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, antimikrobní aktivita, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, myasthenia gravis, rhodanin

ABSTRACT

The topic of this thesis is the synthesis of rhodanine derivatives and evaluation of their biological activity, particularly as potential cholinesterases inhibitors. This group of compounds is important for treatment of many diseases, e.g., Alzheimer's disease or myasthenia gravis.

All synthesized compounds are based on structure of rhodanine (2-thioxothiazolidine-4-one), which is an important heterocyclic compound with a wide spectrum of biological properties. Its structure can be modified in many ways, which can be used in the development of new drugs. Its derivatives have been shown to have, for example, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial and antifungal activities, as well as inhibitory activity against several enzymes, e.g., cholinesterases.

Seventeen compounds were synthesized in sufficient amount for characterisation and assessment of biological activity (7-93 %). Most of them are amides based on the structure of 2-thioxothiazolidine-4-one and thiazolidine-2,4-dione, that were prepared by carbodiimide-mediated coupling, other derivatives are based on the structure of 2-thioxothiazolidine-4-one and from 2,4-dioxothiazolidine-3-acetic acid. These compounds were prepared by Knoevenagel condensation in glacial acetic acid.

All compounds were tested for their inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) using the Ellman's method (results are expressed as IC_{50} values); for the most active compound, the type of inhibition was also determined. Furthermore, antibacterial (G+ and G- strains), antifungal and antimycobacterial activities were evaluated by microdilution broth method (results are expressed as minimum inhibitory concentration, MIC, values). The lowest values of IC_{50} were found for 2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-N-(3,4,5-trichlorophenyl)acetamide with IC_{50} values of 34.42 $\mu\text{mol/L}$ for AChE and 2.91 $\mu\text{mol/L}$ for BChE; type of inhibition was found as a reversible competitive. The lowest MIC values against bacteria, fungi as well as mycobacteria were found for (Z)-5-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)-3-methyl-2-thioxothiazolidine-4-one, (Z)-2-[5-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)-2,4-dioxothiazolidine-3-yl]acetic acid and (Z)-5-(5-bromo-2-

hydroxybenzylidene)-2-thioxothiazolidine-4-one: 125 $\mu\text{mol/L}$ for bacteria, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ for fungi and 15.625 $\mu\text{g/mL}$ for mycobacteria.

Keywords

Acetylcholin esterase, Alzheimer disease, myasthenia gravis, butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors, rhodanine

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AD	Alzheimerova choroba
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
AChE	acetylcholinesteráza
AChR	acetylcholinový receptor
ATCC	American Type Culture Collection
ATCh	acetylthiocholin
ATR	zeslabená úplná reflektance (attenuated total reflectance)
BTCh	butyrylcholin
BChE	butyrylcholinesteráza
CA	<i>Candida albicans</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CK	<i>Candida krusei</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CPX	ciprofloxacín
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EA	elementární analýza
EC	<i>Escherichia coli</i>

EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EtOAc	ethyl-acetát
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
INH	isoniazid
IR	infračervená spektroskopie
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RIF	rifampicin
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1. ÚVOD

V medicíně představuje rhodanin (2-thioxothiazolidin-4-on) významnou heterocyklickou sloučeninu díky svému spektru biologických aktivit zprostředkovaných různými mechanismy účinku. Díky různorodým možnostem modifikace byly sloučeniny odvozené od rhodaninu považovány za významné struktury při vývoji nových léčiv. U těchto sloučenin byla objevena potenciální antibakteriální, antifungální, antivirová, protizánětlivá nebo antitumorová aktivita. Dále mohou být použity k léčbě a prevenci diabetu, léčbě obezity, cystické fibrózy nebo dalších neurologických a psychiatrických poruch. Kromě všech těchto aktivit bylo prokázáno, že mohou mít inhibiční účinek vůči některým skupinám enzymů, např. cholinesterázám. [1]

Cholinesterázy jsou enzymy, které patří do rodiny esteráz. Lze obecně říci, že tato skupina enzymů si ponechává značnou míru sekvenčních podobností i u proteinů, které pochází z evolučně vzdálených organismů. V současné době známe cholinesterázy dvě, jsou jimi acetylcholinesteráza (AChE) (Obr. 1) a butyrylcholinesteráza (BChE) (Obr. 2). [2]

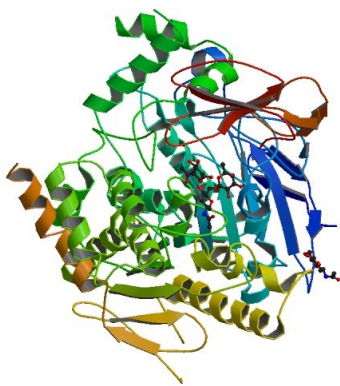
AChE je jedním z klíčových enzymů pro přenos nervového signálu. Nachází se v erythrocytech, plicích, slezině, nervových zakončeních a všech částech mozku. Tento enzym katalyzuje hydrolýzu acetylcholinových esterů s relativní specifitou pro acetylcholin, který je běžným neurotransmiterem centrální a periferní nervové soustavy. Acetylcholin se po uvolnění z axonového zakončení pohybuje přes synaptickou štěrbinu a váže se na receptor na druhé straně synapse. V periferním nervovém systému se AChE nachází v neuromuskulárních spojích a kontroluje zde svalové kontrakce. Intracelulární působení acetylcholinu je zprostředkováno aktivací nikotinového a muskarinového acetylcholinového receptoru (AChR). Přenos nervových vzruchů je ukončen rychlou hydrolýzou acetylcholinu právě pomocí AChE. Porucha AChE může mít v organismu fatální následky. [2][3][4]

Oproti tomu BChE je enzym, který se tvoří v játrech a dále je šířen do krevního oběhu. Nachází se v krevní plazmě, játrech, pankreatu, střevní sliznici a bílé hmotě centrálního nervového systému. V lidském mozku najdeme tento enzym v neuronech, gliích, nicméně také v senilních placích a neurofibrilárních klucích typických pro Alzheimerovu chorobu (AD). Někdy je BChE označována také jako sérová

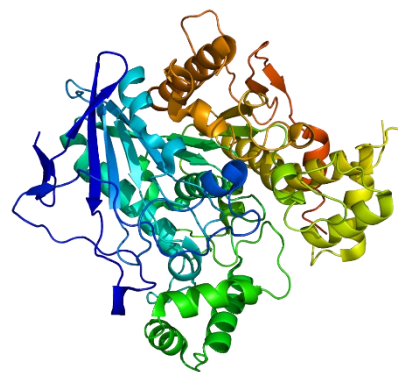
cholinesteráza. Oproti AChE nedokáže hydrolyzovat D- β -methylacetylcholin a vykazuje daleko vyšší aktivitu vůči butyrylcholinu a propionylcholinu, což ale nejsou látky tělu vlastní. Fyziologická funkce toho enzymu nebyla po dlouhou dobu objasněna, jelikož není znám jeho endogenní substrát, nicméně dnes se předpokládá, že sehrává roli v metabolismu lipoproteinů, adhezi buněk, neurogenezi, zpracování prekurzorů amyloidu a také jako „scavenger“ toxických molekul. BChE hydrolyzuje „non-cholinové“ exogenní estery jako jsou prokain, tetrakain, suxamethonium nebo kokain. Právě hydrolýza kokainu by mohla být velice podstatná, díky této schopnosti by mohla být BChE využívána v terapii závislostí. Dále ji lze využít jako marker funkčnosti jater. [2]

Postupem času byla prokázána souvislost mezi poruchou v cholinergním systému a etiopatogenezi u různých onemocnění. Například poklesem koncentrace acetylcholinu a počtu cholinergních neuronů v nervové tkáni dochází k rozvoji Alzheimerovy choroby nebo jiných typů demence. U onemocnění myasthenia gravis dochází k autoimunní reakci spojenou s tvorbou protilátek blokuji acetylcholinové receptory spjaté se sodíkovým kanálem na neuromuskulární ploténce, což znemožňuje následný svalový stah. [2][3][4][5]

V terapii nejen těchto onemocnění se využívají inhibitory cholinesteráz, které mají různé mechanismy účinku a bude jim věnován text následujících kapitol. [5]



Obr. 1 Acetylcholinesteráza



Obr. 2 Butyrylcholinesteráza

Obrázek dostupný z:

https://en.wikipedia.org/wiki/File:PB_BB_Protein_AChE_image.jpg#file

Obrázek dostupný z:

https://en.wikipedia.org/wiki/Butyrylcholinesterase#/media/File:Protein_BCHE_PDB_1

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Mechanismus účinku inhibitorů cholinesteráz*

Jak již bylo zmíněno v úvodu, v lidském těle se nachází dva typy cholinesteráz s velice podobnou strukturou. Pro následné působení inhibitorů jsou ve struktuře těchto enzymů klíčová zejména tato místa: β -anionické (periferní) místo, aromatické hrdlo a aktivní centrum. β -anionické místo je oblast enzymu, se kterou se inhibitor, resp. substrát, setkává jako první. U BChE není příliš vyvinuté a nesehrává příliš významnou roli, u AChE je tomu jinak. β -anionické místo u AChE představuje oblast tvořenou zbytky aminokyselin Tyr27, Asp74, Tyr124, Trp286 a Tyr341, toto uspořádání je platné pro AChE savců. Do tohoto místa se vážou inhibitory, které jsou schopny interagovat π -kation a π - π interakcemi a následně měnit uspořádání molekuly AChE. Mezi tyto inhibitory patří například aflatoxin B1 nebo ethidium. Kromě β -anionického místa existuje i místo α -anionické, které je ale součástí aktivního centra a rovněž je cílem působení některých inhibitorů, například galantaminu, takrinu a donepezilu. Inhibitor přírodního původu huperzin A je dokonce schopen vázat se na obě zmíněná anionická místa. Další významnou oblastí v molekule cholinesteráz je aromatické hrdlo, které je tvořeno zbytky od aromatických aminokyselin. U AChE tuto oblast tvoří čtrnáct reziduí aminokyselin, u BChE osm. Toto místo má za úkol bránit průchodu hydrofilních a také velkých sloučenin. Inhibice skrze aromatické hrdlo je poměrně vzácná, nicméně mezi inhibitory fungující na tomto principu patří například myorelaxancium dekamethonium. Posledním klíčovým místem je aktivní centrum, které je u obou enzymů velice podobné. Součástí aktivního centra je tzv. esterové místo, tvoří jej trojice katalytických aminokyselin – serin, kyselina glutamová a histidin. Serin je podstatný pro navázání organofosforových inhibitorů, kam patří např. nervově paralytické vojenské látky, a karbamátových inhibitorů, mezi které patří rivastigmin nebo pyridostigmin. Uvnitř esterového místa je hydrolyticky štěpena esterová vazba substrátu, a to právě nukleofilním atakem serinového hydroxyly. Další součástí aktivního centra je α -anionické místo umožňující správnou orientaci v esterovém místě pomocí interakcí π -vazeb s kationtem ve struktuře substrátu. Kromě vazby na cílové místo můžeme dále inhibice rozdělit podle mechanismu na ireverzibilní, pseudoireverzibilní, reverzibilní a z jiného úhlu pohledu

na kompetitivní a nekompetitivní. Například rivastigmin s pyridostigminem se na AChE i BChE vážou pseudoireverzibilně, galantamin se váže reverzibilně kompetitivním mechanismem na AChE a donepezil se váže na AChE také reverzibilně, ale nekompetitivním způsobem. [1][2]

2.2 Onemocnění související s poruchou cholinergního systému

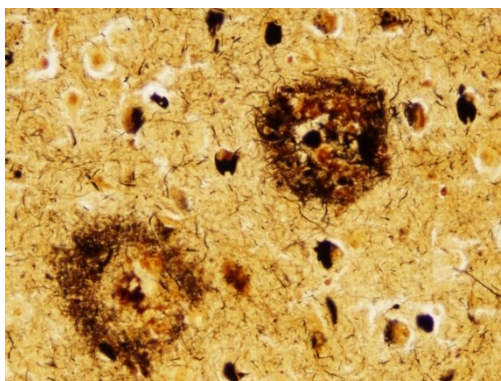
2.2.1 Alzheimerova choroba

AD je fatální neurodegenerativní onemocnění vedoucí skrz degradaci všech psychických funkcí až k hluboké demenci. Je pojmenována po německém psychiatrovi Aloisovi Alzheimerovi, který v roce 1907 popsal charakteristické příznaky degenerativního onemocnění mozku. Jedná se o čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí v západních zemích a představuje významnou socioekonomickou zátěž pro populaci. Mezi rizikové faktory pro vznik tohoto onemocnění patří vyšší věk, genetické předpoklady, prodělané úrazy hlavy, ženské pohlaví, ale také nízká duševní aktivita nebo nízká úroveň vzdělání, naopak mezi protektivní faktory vyšší vzdělání, psychická aktivita i v pokročilém věku, výskyt alel ApoE₂, ApoE₃, užívání antioxidantů nebo hormonální substituce u žen. [6]

Onemocnění můžeme rozdělit podle závažnosti symptomů do třech forem. Pro mírnou formu onemocnění, první stádium, jsou typické často přehlédnutelné příznaky jako zhoršení paměti, přechodná časová dezorientace, prostorová dezorientace, ztráta iniciativy a průbojnosti a obtížné hledání slov. Toto stádium trvá většinou dva až čtyři roky. Následuje druhé stádium onemocnění, středně těžká forma, pro kterou jsou typické významné výpadky paměti (např. jmen členů domácnosti), zhoršování komunikačních schopností, prohlubování dezorientace (ztrácení se na známých místech) nebo halucinace. Tato forma přetrvává standardně dva roky až deset let. Třetím a zároveň posledním stádiem je těžká forma, která trvá jeden až dva roky. Pacient je zcela závislý na okolí, dochází zde k obtížnému přijímání stravy, nepoznávání blízkých osob, ale i třeba nerozpoznání sebe sama v zrcadle, také dochází k problémům s pohybem, inkontinenci a poruchám chování. [6]

Jedním z typických znaků AD jsou histopatologické projevy v mozkové tkáni, které definitivně potvrzují diagnózu. Jedná se zejména o přítomnost senilních plaků a neurofibrilárních klubek (konvolutů) (Obr. 3). Senilní plaky se nachází extracelulárně zejména v kůře a hipokampu, jsou tvořeny nerozpustným β -amyloidem. Neurofibrilární klubka se nachází intracelulárně v neuronech a jsou tvořena párovými spirálními vlákny

obsahující τ -proteiny. Tyto vysoce fosforylované fibrilární proteiny mají ve fyziologické tkáni funkci udržování struktury a tvaru buněk. Denzita klubek úzce souvisí se závažností poškození kognitivních funkcí. [5][6]



Obr. 3 Senilní plaky a neurofibrilární klubka

Obrázek dostupný z: <https://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html>

Kromě přítomnosti histopatologických změn je pro AD typická postupující ztráta cholinergních neuronů. V 70. letech minulého století byla vytvořena cholinergní hypotéza, která představuje první a dodnes akceptovanou teorii, která vysvětluje podstatu vzniku AD. Vychází z pozorování ztráty cholinergní aktivity u osob trpících AD a také ze studií pozorujících lidi a primáty. Byla zde objevena úzká souvislost mezi rolí acetylcholinu coby neuromediátoru a kognitivními funkcemi. Cholinergní deficit významně napomáhá k rozvoji kognitivních poruch, poklesu pozornosti, rychlosti zpracovávání informací, ale také k poruchám chování. U pacientů s AD jsou postiženy všechny složky cholinergního systému, dochází zde ke snižování celkového množství acetylcholinu jako neuromediátoru, deficitu cholinacetyltransferázy, což je enzym podílející se na syntéze acetylcholinu, a dále v pokročilých stádiích i chybění AChE, jejíž funkcí je acetylcholin odbourávat. Nicméně paradoxně hladina a aktivita BChE v mozku při AD zásadně a progresivně roste. Zatím nejúčinnější terapií se ukázala být terapie inhibitory AChE, které přímo zvyšují funkčnost cholinergního systému a zmírňují jeho deficit, jenž je považován za hlavní mechanismus patogeneze u tohoto onemocnění. [5][6]

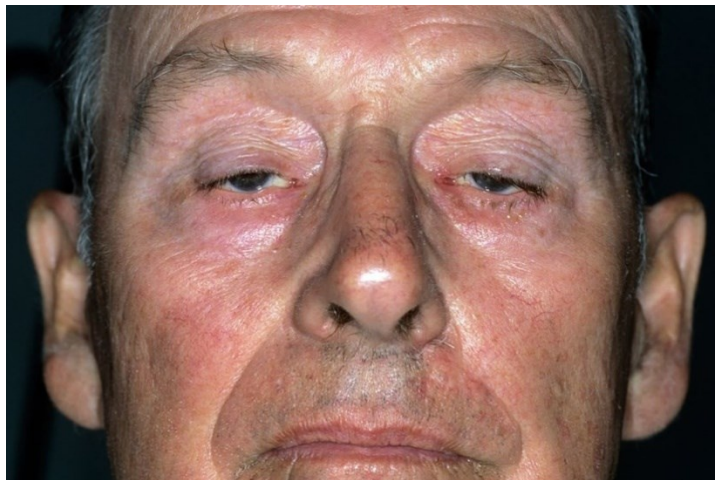
2.2.2 Myasthenia gravis

Myasthenia gravis spadá do skupiny autoimunitních onemocnění, mezi jejíž projevy patří svalová únava a slabost kosterních svalů. Prevalence tohoto onemocnění je deset až patnáct případů na sto tisíc obyvatel a konkrétně Česká republika se řadí k zemím se středním až vyšším výskytem tohoto onemocnění. Myasthenia gravis se projevuje u žen v mladém věku a u mužů starších padesáti let, nicméně není to typickým pravidlem. Pro myasthenii je charakteristické kolísání klinických příznaků během dne, kdy jsou obtíže ráno nebo po odpočinku nejmírnější a přes den, ve spojení se svalovou zátěží, dochází ke zhoršení. Dále zhoršení příznaků mohou způsobovat některá antibiotika, sedativa, antihypertenziva, ale také např. zvýšená tělesná teplota, koupel v horké vodě, infekční onemocnění, operace nebo vystavení stresové situaci. Mezi prvními příznaky se objevuje postižení okohybného svalstva projevující se často asymetrickou ptózou víček a zpravidla diplopií. Dále zprvu bývají také postiženy orofaryngeální svaly, slabost žvýkacích svalů může vyvolat obtíže při konzumaci tužší stravy, také se někdy objevuje pokles brady, kdy si ji pacient přidržuje rukou. Může docházet také k celkovému poklesu hlavy v důsledku slabosti šíjového svalstva. Pacientovo vzezření může působit na okolí smutně či ospale, což je právě způsobeno již zmíněným postižením mimického svalstva a ptózou (Obr. 4). Dalším znakem onemocnění může být huhňavá řeč s prvky nazolálie, která se při delším hovoru může stát až nesrozumitelnou. Myasthenia má progresivní charakter se snahou generalizovat, což vede k oslabení svalů pletence horních i dolních končetin. Může dojít i k postižení dýchacích svalů, kdy se objevuje dechová nedostatečnost až dechová myastenická krize, jedná se o závažný stav požadující řízenou ventilaci a hospitalizaci. [5][7][8][9]

Příčinou onemocnění je autoimunitní reakce spojená s tvorbou specifických protilátek blokujících postsynaptické acetylcholinové receptory skrze sodíkový kanál. Ke tvorbě těchto protilátek dochází zejména v thymu. Thymus hraje významnou roli v rozvoji myasthenie, u vysokého počtu pacientů, zejména mladšího věku, se vyskytuje hyperplázie thymu nebo případně se může objevit i thymom. Myasthenia gravis není genetické onemocnění v pravém slova smyslu, nicméně rozsáhlé epidemiologické výzkumy prokázaly dědičnost genetických predispozic na základě zvýšeného rodového

výskytu onemocnění i přítomnosti protilátek proti acetylcholinovým receptorům. [5][7][8][9]

Diagnostika tohoto onemocnění zahrnuje vyšetření cirkulujících protilátek proti acetylcholinovým receptorům, nicméně ani negativní nález nemůže onemocnění zcela vyloučit. Definitivní diagnózu určuje elektromyografické vyšetření. Dále se při podezření na toto onemocnění u každého pacienta nutně provádí CT s případným MR vyšetřením mediastina, což dává informaci o přítomnosti zvětšeného thymu nebo thymomu. Myasthenia gravis je v současné době poměrně dobře léčitelné onemocnění, k úspěšné léčbě přispívá včasná diagnostika. Léčena bývá chirurgicky i medikamentózně. Chirurgická léčba zahrnuje thymektomii, u mladých pacientů je indikována vždy, u pacientů starších šedesáti let zejména při výskytu thymomu. U medikamentózní léčby se mohou volit různé léčebné postupy, mohou se podávat léčiva ovlivňující imunitní systém, kortikosteroidy v kombinaci s cytostatiky, ale zejména léčiva zlepšující nervosvalový přenos, inhibitory cholinesteráz. Jako první se využíval k léčbě fyzostigmin, v současné době se využívá spíše neostigmin, distigmin a pyridostigmin. [5][7][8][9]



Obr. 4 Pacient trpící onemocněním myasthenia gravis

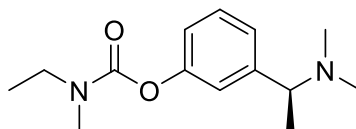
Obrázek dostupný z: <https://healthjade.net/myasthenia-gravis/>

2.3 Významné skupiny inhibitorů cholinesteráz

2.3.1 Tradiční inhibitory

2.3.1.1 Rivastigmin

Rivastigmin (Obr. 5) byl v roce 2000 schválený pro léčbu mírné až střední Alzheimerovy choroby, dále je také využíván v terapii demence spojené s Parkinsonovou chorobou. Rivastigmin (používaný jako tartarát) je karbamát cílící na AChE i BChE. Po navázání rivastigminu na AChE je tímto enzymem štěpen na fenolické deriváty, které jsou z těla rychle odbourávány. Tento inhibitor má neobvykle pomalou aktivační kinetiku, která by mohla být vysvětlena skutečností, že karbamátová část se váže na esterové místo AChE s větší afinitou než acetátová část acetylcholinu během jeho hydrolýzy, proto je enzym určitou dobu inaktivován. Naneštěstí má rivastigmin řadu nežádoucích účinků včetně bolesti žaludku nebo úbytku hmotnosti, při předávkování způsobuje např. bolest na hrudi nebo nepravidelnost srdečního tepu. [4]

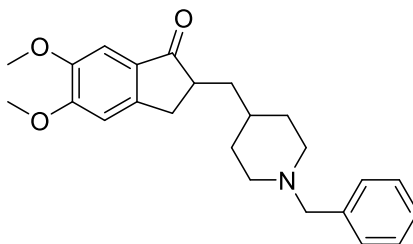


Obr. 5 Vzorec rivastigminu

2.3.1.2 Donepezil

Donepezil (Obr. 6) byl v roce 1996 schválen, stejně jako rivastigmin, pro léčbu mírné až střední Alzheimerovy choroby. Nicméně tento inhibitor s sebou nese řadu vedlejších účinků, jako např. nespavost, nevolnost nebo svalovou slabost. Kromě inhibice ChE může mít i jiné mechanismy účinku. Dokáže působit nejen na úrovni neurotransmiterů, ale také na molekulární a buněčné úrovni téměř ve všech fázích účastnících se patogeneze Alzheimerovy choroby. Do těchto mechanismů patří inhibice různých aspektů excitotoxicity vyvolané glutamátem, snížení časně exprese zánětlivých cytokinů i snížení účinků vyvolaných oxidačním stresem. Díky jedinečné molekulární struktuře donepezil způsobuje současnou inhibici aktivních a periferních aniontových míst AChE z *Torpedo californica*, jejíž aktivní místo charakteristicky obsahuje vysoký

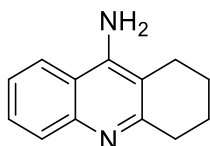
počet aromatických zbytků, nicméně přímo neinteraguje s katalytickou triádou nebo oxyaniontovou „dírou“. [4]



Obr. 6 Vzorec donepezilu

2.3.1.3 Takrin

Takrin (Obr. 7) byl původně využíván jako antagonist svalové relaxace a stimulant dýchání a od osmdesátých let dvacátého století se využíval u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. Efektivně inhibuje nejen AChE, kde interaguje s aminokyselinovými zbytky Phe330 a Trp84, které jsou součástí aniontového místa, ale také je schopen inhibovat BChE. Další výhodnou biologickou vlastností této sloučeniny je snadný přestup přes hematoencefalickou bariéru. [10] Naneštěstí bylo jeho využití omezeno, jelikož způsobuje řadu nežádoucích účinků, zejména hepatotoxicitu. V roce 2013 bylo jeho použití právě kvůli těmto účinkům ukončeno. [4]



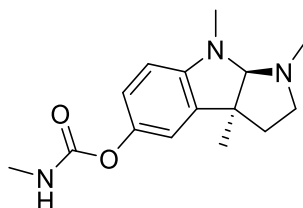
Obr. 7 Vzorec takrinu

2.3.2 Inhibitory přírodního původu

2.3.2.1 Fyzostigmin

Fyzostigmin (Obr. 8), známý též pod názvem eserin, je toxický parasympatomimetický alkaloid, který byl poprvé izolován z kalabarských bobů, semen puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*). Jedná se o kovalentní reverzibilní inhibitor AChE, který se využívá v terapii glaukomu, jelikož zvyšuje odtok komorové vody v oku, nebo, díky schopnosti zužovat zornice, se využívá i pro léčbu mydriázy. Pro léčbu

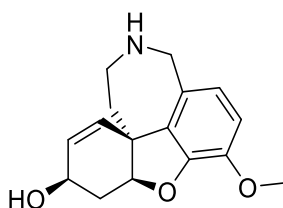
Alzheimerovy choroby používán není, jelikož během klinických studií nedosahoval přesvědčivých výsledků a přinášel více negativních vedlejších účinků. Nicméně byl prokázán jeho efekt na zlepšení dlouhodobé paměti. Díky ochotnému přestupu přes hematoencefalickou bariéru a schopnosti zvyšování acetylcholinové transmise v mozku se fyzostigmin, konkrétně fyzostigmin-salicylát, využívá jako antidotum při otravě atropinem a skopolaminem. [4]



Obr. 8 Vzorec fyzostigminu

2.3.2.2 Galantamin

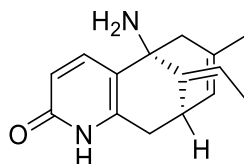
Galantamin (Obr. 9) je alkaloid, který je obsažen v mnoha rostlinách, například ho lze izolovat ze sněženky podsněžníku (*Galanthus nivalis*) nebo jiných rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Jeho inhibiční aktivita vůči ChE byla objevena v 50. letech 20. století a následně byl uveden na trh pod obchodním názvem Nivalin. Byl využíván ve východoevropských zemích k léčbě myopatie, myastenie nebo sensorických a motorických deficitů centrální nervové soustavy. Pro léčbu Alzheimerovy choroby byl schválen v roce 2001 a ukázal se být účinným v léčbě kognitivních symptomů. Galantamin je také schopen odstraňovat svalovou paralýzu způsobenou tubokurarinem, působit proti dechovému útlumu navozenému opiáty nebo potlačovat některé účinky droperidolu a diazepamu. Výhodou tohoto inhibitoru, oproti ostatním inhibitorům AChE, je schopnost alostericky modulovat nikotinové receptory a zvyšovat tím produkci acetylcholinu, nicméně inhibiční aktivita vůči BChE je klinicky velmi nízká. Galantamin je také využíván jako standard pro stanovení inhibiční aktivity AChE. [4][11]



Obr. 9 Vzorec galantaminu

2.3.2.3 Huperzin

Huperzin (Obr. 10) je rostlinný alkaloid, který byl poprvé vyizolován z plavuně *Huperzia serrata*, v nízkých koncentracích je obsažen i ve vranci jedlovém (*Huperzia selago*), který lze vzácně nalézt i na území ČR. Existují dva typy huperzinu, huperzin A a huperzin B. Huperzin A je vysoce selektivní silný inhibitor AChE, vykazuje silnější účinek než rivastigmin, galantamin a takrin. Huperzin B je jeho přirozeným homologem. Jeho aktivita proti BChE ve srovnání s AChE není tak silná. Huperzin A také ochotněji přechází přes hematoencefalickou bariéru a má lepší biologickou dostupnost při podání *per os*, nicméně jeho periferní cholinergní účinky jsou nižší. Dále disponuje neuroprotektivními vlastnostmi, snižuje úzkost, zlepšuje paměť a také proces učení. [4][11]

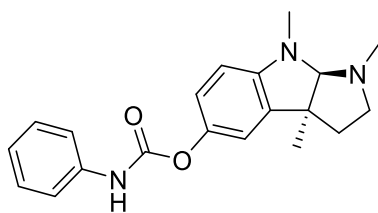


Obr. 10 Vzorec huperzinu A

2.3.3 Nová generace inhibitorů

2.3.3.1 Fenserin

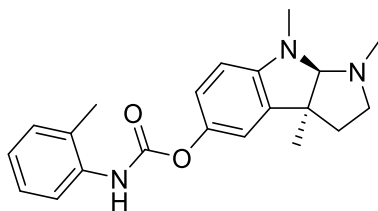
Fenserin (Obr. 11) je selektivní nekompetitivní inhibitor AChE, který kromě inhibice AChE redukuje i produkci amyloidového prekurzorového proteinu. β -amyloid tvoří hlavní složku senilních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku pacientů trpících AD. Ve srovnání s takrinem a fyzostigminem vykazuje nižší toxicitu. Díky dvojitmu účinku představuje fenserin poměrně slibnou terapii, v roce 2010 bylo v rámci studie [12] prokázáno, že vyšší dávky fenserinu mohou zlepšit symptomy u pacientů trpících mírnou až středně těžkou AD, dále v roce 2016 došlo k průkazu jeho necholinergních účinků s klinickým potenciálem. [13] V současné době probíhají další klinické studie za účelem zkoumání mechanismů účinku tohoto inhibitoru. [4]



Obr. 11 Vzorec fenserinu

2.3.3.2 Tolserin

Tolserin (Obr. 12) je strukturním analogem fyzostigminu a fenserinu, kterému je ale podobnější. Od jeho struktury se liší pouze přítomností methyl skupiny ve fenylylkarbamoylové části. Tato část molekuly zajišťuje specifickou interakci a karbamoylaci AChE, a tím inhibuje schopnost enzymu štěpit a vázat substráty. Experimentálně bylo stanoveno, že funguje jako účinný inhibitor lidské erythrocytární AChE a vykazuje vyšší efekt než jeho dvě zmíněná strukturní analoga. [14] Dále byl v předběžných studiích u tolserinu prokázán neobvykle vysoký potenciál zlepšit paměť a kognitivní funkce u hlodavců. Podobně jako fenserin je i tolserin rychle vylučován z těla a zároveň má dlouhotrvající účinek. [4]



Obr. 12 Vzorec tolserinu

2.3.4 Inhibitory využívané v terapii myasthenia gravis

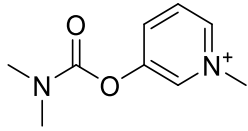
Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.2, v terapii onemocnění myasthenia gravis se využívají inhibitory ChE, zejména pyridostigmin, neostigmin, distigmin a ambenonium. Skupina těchto inhibitorů nemůže kvůli svému náboji přecházet přes hematoencefalickou bariéru, tudíž se uplatňuje právě v periferním nervovém systému. Jejich společným mechanismem účinku je inhibice AChE a následné zvýšení extracelulární hladiny acetylcholinu, čímž dochází ke zlepšení nervosvalového přenosu. [8]

Lékem první volby v terapii myasthenia gravis je pyridostigmin (Obr. 13). Tento syntetický reverzibilní inhibitor AChE se kromě terapie tohoto onemocnění využívá k odvrácení neuromuskulárních blokády, zmírnění symptomů u myasthenických syndromů a jako ochrana proti některým nervově-paralytickým agens ve vojenství. Oproti jeho příbuznému léčivu neostigminu, které funguje na obdobném principu, disponuje lepšími farmakokinetickými vlastnostmi a menším množstvím vedlejších účinků. [15]

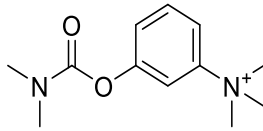
Neostigmin (Obr. 14) se kromě terapie myasthenia gravis uplatňuje v terapii Ogilvieho syndromu, což je onemocnění, při kterém dochází k nedokonalé inervaci střeva a jeho následné neprůchodnosti, dále je využíván v anesteziologii k ukončení účinků nedepolarizujících myorelaxancií (např. rukuronium nebo vekuronium) po skončení operace. [16][17]

Dalším inhibitorem je distigmin (Obr. 15). Toto parasymptomimetikum je kromě léčby myasthenia gravis využíváno v terapii atonie močového měchýře. Nicméně, jelikož u něj dochází ke zvýšené akumulaci, představuje zvýšené riziko rozvoje myasthenické krize, tudíž se v porovnání s pyridostigminem a neostigminem využívá jen zřídka. [18][19]

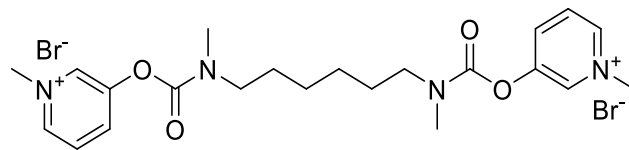
Posledním zmíněným inhibitorem využívaným v terapii myasthenia gravis je ambenonium (Obr. 16). Jedná se také o inhibitor AChE, tento inhibitor se ale využívá méně často než předchozí zmíněné inhibitory, jeho využití je preferováno u pacientů přecitlivělých na bromidové ionty. [20][21]



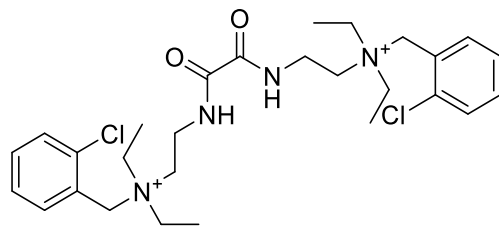
Obr. 13 Vzorec pyridostigminu



Obr. 14 Vzorec neostigminu



Obr. 15 Vzorec distigminu



Obr. 16 Vzorec ambenonia

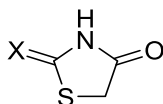
2.4 Design cílových molekul

2.4.1 Rhodaniny

Rhodanin (2-thioxothiazolidin-4-on) je pětičlenná heterocyklická sloučenina obsahující thiazolidinové jádro substituované karbonylovou a thiokarbonylovou skupinou (Obr. 17). Sloučeniny obsahující tento fragment vykazují široké spektrum biologických aktivit. Rhodanin, respektive rhodanin-3-octová kyselina, byl syntetizován již v roce 1908 a ve stejném roce byly připraveny pomocí Knoevenagelovy kondenzace s různými aldehydy jeho deriváty. Tuto sloučeninu lze různě modifikovat, díky čemuž se stala velice významnou při vývoji nových léčiv. Lze také obecně říci, že rhodaniny nejsou mutagenní. [1][22]

Od šedesátých let minulého století proběhlo mnoho studií, které odhalily, že tento typ molekuly vykazuje antibakteriální, antimykobakteriální, antifungální, ale i antivirotické účinky. Dále byla prokázána jeho aktivita vůči diabetu, také působí antiapoptoticky, protizánětlivě, dokonce byla popsána aktivita vůči *Trypanosoma brucei*, čehož se může potenciálně využít v terapii spavé nemoci. Kromě těchto aktivit jsou schopny rhodaniny působit inhibičním účinkem vůči různým enzymům, např. 15-lipooxygenáze, aldóza reduktáze, dolicholfosfát-mannosa syntáze, gyráze B a také vůči cholinesterázám. [23][24][25][26][27]

Široké spektrum biologických aktivit má i jeho příbuzná sloučenina, thiazolidin-2,4-dion (Obr. 17), jehož analoga pioglitazon a rosiglitazon se využívají v klinické praxi v terapii diabetu mellitu. Dále struktury odvozené od thiazolidin-2,4-dionu vykazují protizánětlivý, antioxidantní, protinádorový účinek, dále by se mohly uplatnit v terapii obezity nebo jako antagonisté receptoru pro hormony štítné žlázy. [24]



X = S: rhodanin

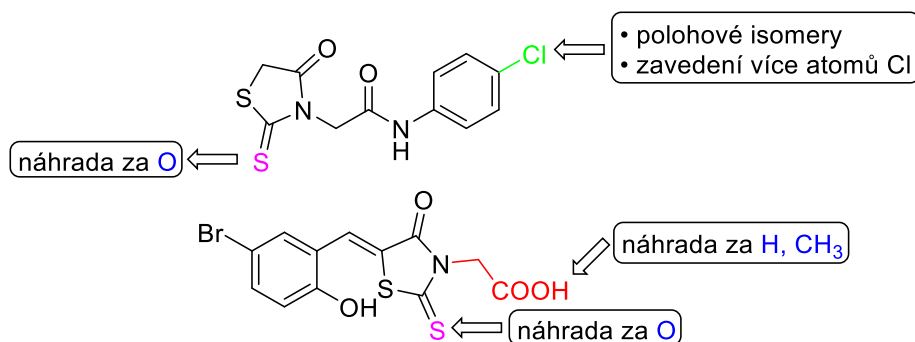
X = O: thiazolidin-2,4-dion

Obr. 17 Vzorec rhodaninu a thiazolidin-2,4-dionu

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je teoretické shrnutí současných využívaných inhibitorů cholinesteráz a onemocnění, v jejichž terapii se uplatňují, a také biologické aktivity rhodaninových a thiazolidin-2,4-dionových derivátů.

Cílem experimentální části je syntéza celkem sedmnácti nových sloučenin odvozených od rhodaninu (2-thioxothiazolidin-4-onu), potažmo od thiazolidin-2,4-dionu. Tyto výchozí struktury byly vybrány cíleně na základě přechozích poznatků o jejich širokém spektru biologicky aktivních vlastností a vztazích mezi strukturou a aktivitou (Obr. 18). [1] Všechny sloučeniny budou charakterizovány a u všech je sledována jejich inhibiční aktivita vůči AChE a BChE, u nejúčinnějšího inhibitoru bude stanoven i typ inhibice. Dále je studována antibakteriální (vůči G+ i G- bakteriálním kmenům, mykobakterie) a antifungální aktivita. Všechna stanovení jsou porovnávána s dostupnými standardy. Předpokládáme vyvození vztahů mezi strukturou a příslušným účinkem.



Obr. 18 Přehled odvození cílových struktur

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemie

4.1.1 Obecné metody

Během syntéz byly využity komerčně dostupné chemické látky a rozpouštědla od firem Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Německo), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále využity bez dalšího přečištění, vyjma hexanu, ten byl čištěn destilací.

Průběh všech reakcí byl monitorován tenkovrstvou chromatografií (TLC). Stacionární fází byly destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo), mobilní fází byla směs hexanu a ethyl-acetátu v poměru 4:1 (v/v), detekce byla provedena pod UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání byly měřeny v otevřené kapiláře pomocí přístroje Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawii, Švýcarsko) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla měřena technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

NMR spektra byla měřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Všechna měření probíhala při laboratorní teplotě pomocí přístrojů Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$) a aceton ($\text{aceton-}d_6$). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla ($\text{DMSO-}d_6$ při $\delta = 39.5$ ppm, $\text{aceton-}d_6$ při $\delta = 29.8$ a 206.3 ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena

pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Vypočtené i změřené hodnoty jsou udány v procentech.

Všechny chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly ověřeny pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí tenkovrstvé chromatografie, NMR, spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

4.1.2 Příprava cílových sloučenin

4.1.2.1 Obecný postup přípravy

Amidy vzniklé na základě modifikace karboxylové skupiny byly nasyntetizovány karbodiimidovým couplingem (Schéma 1) dle následujícího obecného postupu přípravy:

1 mmol 2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny, respektive 2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny, 1,1 ekvivalentního množství 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBt; 0,1536 g) a 1 ekvivalent příslušného anilinu (1 mmol) bylo vneseno do 8ml směsi rozpouštědel dichlormethan/ethyl-acetát (1/1, v/v). Po kompletním rozpuštění bylo přidáno 1,2 ekvivalentu (1,2 mmol; 0,2338 g) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu hydrochloridu (EDC.HCl) a tato směs byla míchána minimálně 8 hodin za laboratorní teploty. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno dosucha a bylo přidáno malé množství ethyl-acetátu. Výsledná suspenze byla promyta v dělicí nálevce dvakrát 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou, 5 % vodným hydrogenuhličitanem sodným a solankou. Organická vrstva byla následně sušena síranem sodným a zfiltrována. Filtrát byl zahuštěn za sníženého tlaku, poté byl přidán *n*-hexan pro zahájení precipitace. Směs byla ponechána krystalizovat po dobu 24 hodin při +4 °C. Nakonec byly vzniklé krystaly odfiltrovány, čímž byl získán čistý produkt. Všechny reakce byly monitorovány pomocí TLC.

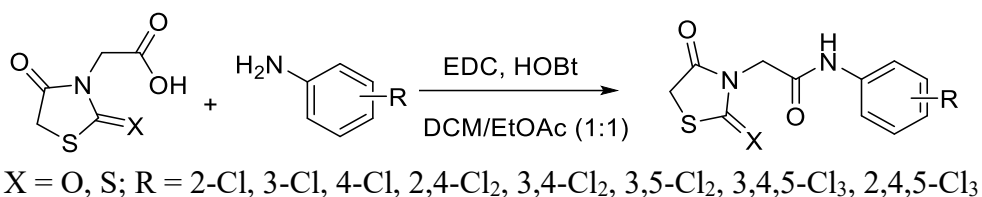
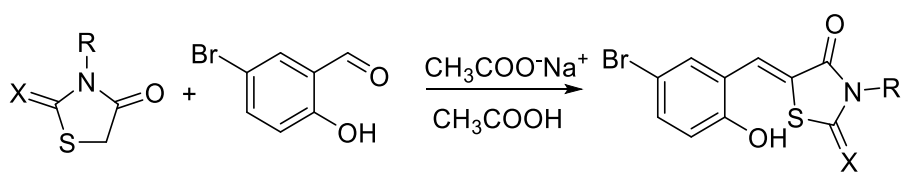


Schéma 1 Karbodiimidový coupling

Zbylé sloučeniny, kondenzáty, byly syntetizované pomocí Knoevenagelovy kondenzace (Schéma 2) následujícím obecným způsobem:

1 mmol derivátu rhodaninu/thiazolidin-2,4-dionu, 1,1 ekvivalentu 5-bromsalicylaldehydu (1,1 mmol; 0,2010 g) a ekvivalentní množství bezvodého octanu sodného (1 mmol; 0,0877 g) bylo zahříváno za varu pod zpětným chladičem 3-4 hodiny v ledové kyselině octové (8 ml). Následně byla směs ponechána míchat 24 hodin při laboratorní teplotě. Po ochlazení byl výsledný produkt odfiltrován, promyt vodou a rekrystalizován z ethanolu. Všechny reakce byly monitorovány pomocí TLC.

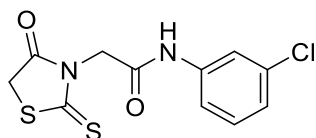


X = O, S; R = H, CH₃, CH₂COOH

Schéma 2 Knoevenagelova kondenzace

4.1.2.2 Přípravy a charakterizace jednotlivých cílových sloučenin

N-(3-Chlorfenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 1]



Sumární vzorec:	C ₁₁ H ₉ ClN ₂ O ₂ S ₂
Relativní molekulová hmotnost:	300,77
Popis:	oranžové krystaly
Výtěžek:	39 %
Teplota tání:	165 °C
R _f :	0,125

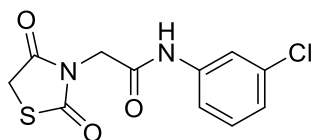
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.52 (s, 1H, NH), 7.69 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H2), 7.36 (dt, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, H6), 7.31 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 7.11 – 7.09 (m, 1H, H4), 4.68 (s, 2H, NCH₂CO), 4.38 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.64, 174.48, 164.27, 140.39, 133.72, 131.16, 123.93, 119.18, 118.07, 47.06, 36.63.

IR: 3237, 3188, 3079, 2974, 2928, 1739, 1667, 1594, 1547, 1481, 1431, 1400, 1357, 1335, 1316, 1274, 1216, 1166, 1162, 1043, 975, 900, 885, 777, 703, 676, 632 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 43.93; H, 3.02; N, 9.31, nalezeno: C, 43.90; H, 3.06; N, 9.40.

N-(3-Chlorfenyl)-2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 2]



Sumární vzorec: $C_{11}H_9ClN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 284,71

Popis: bílé krystaly

Výtěžek: 44 %

Teplota tání: 140,5 °C

R_f: 0,1

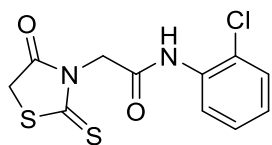
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.49 (s, 1H, NH), 7.70 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H2), 7.38 – 7.36 (m, 1H, H6), 7.31 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H5), 7.11 – 7.09 (m, 1H, H4), 4.31 (s, 2H, NCH₂CO), 4.29 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.52, 172.14, 164.88, 140.37, 133.72, 131.15, 123.95, 119.19, 118.07, 44.28, 34.52.

IR: 3614, 3248, 3075, 1748, 1682, 1594, 1551, 1484, 1410, 1382, 1324, 1299, 1248, 1206, 1152, 1099, 1042, 988, 935, 898, 879, 789, 745, 707, 686, 666, 657, 642, 628, 616, 603 cm^{-1} .

EA: vypočteno: C, 46.40; H, 3.19; N, 9.84, nalezeno: C, 46.34; H, 3.16; N, 9.89.

N-(2-Chlorfenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 3]



Sumární vzorec: $C_{11}H_9ClN_2O_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 300,77

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 9 %

Teplota tání: 191 °C

R_f: 0,23

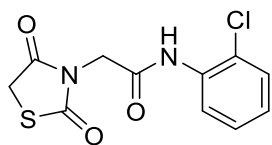
1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 9.94 (s, 1H, NH), 7.61 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, H6), 7.47 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H, H3), 7.28 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, H5), 7.17 (td, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H, H4), 4.75 (s, 2H, NCH₂CO), 4.36 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.59, 174.50, 164.50, 134.81, 130.15, 128.05, 127.20, 126.97, 126.54, 46.88, 36.66.

IR: 3281, 1736, 1669, 1589, 1533, 1471, 1443, 1406, 1359, 1336, 1288, 1240, 1217, 1200, 1180, 1157, 1115, 1043, 976, 953, 887, 831, 785, 764, 747, 712, 694, 660, 640 cm^{-1} .

EA: vypočteno: C, 43.93; H, 3.02; N, 9.31, nalezeno: C, 43.96; H, 3.00; N, 9.35.

N-(2-Chlorfenyl)-2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 4]



Sumární vzorec: $C_{11}H_9ClN_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 284,71

Popis: světle žluté až bílé krystaly

Výtěžek: 41 %

Teplota tání: 207,3 °C

R_f: 0,04

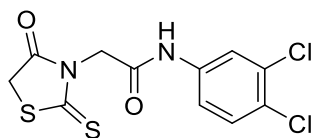
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.42 (s, 1H, NH), 7.71 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H2), 7.38 – 7.36 (m, 1H, H6), 7.30 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H5), 7.11 – 7.09 (m, 1H, H4), 4.30 (s, 2H, NCH₂CO), 4.29 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.53, 172.15, 164.70, 140.30, 133.70, 131.19, 123.97, 119.20, 118.06, 44.26, 34.52.

IR: 3325, 2947, 1750, 1676, 1600, 1543, 1491, 1401, 1377, 1328, 1302, 1287, 1251, 1229, 1211, 1162, 1133, 1092, 1011, 984, 962, 892, 843, 825, 788, 767, 711, 696, 665, 649, 634, 619 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 46.40; H, 3.19; N, 9.84, nalezeno: C, 46.37; H, 3.23; N, 9.87.

N-(3,4-Dichlorfenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 5]



Sumární vzorec: $C_{11}H_8Cl_2N_2O_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 335,22

Popis: světle žluté až bílé krystaly

Výtěžek: 16 %

Teplota tání: 178,3 °C

R_f: 0

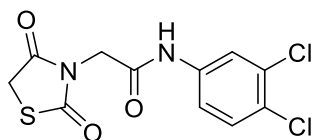
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.63 (s, 1H, NH), 7.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H2), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H5), 7.39 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H6), 4.68 (s, 2H, NCH₂CO), 4.38 (2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.62, 174.45, 164.44, 139.01, 131.67, 131.39, 125.71, 120.92, 119.74, 47.07, 36.63.

IR: 2983, 2939, 1738, 1597, 1490, 1460, 1430, 1400, 1386, 1365, 1352, 1326, 1300, 1256, 1217, 1191, 1139, 1110, 1089, 1040, 1000, 976, 956, 936, 882, 858, 841, 768, 759, 746, 667, 638, 617 cm⁻¹.

EA: vypočteno: vypočteno: C, 39.41; H, 2.41; N, 8.36, nalezeno: C, 39.47; H, 2.38; N, 8.40.

N-(3,4-Dichlorofenyl)-2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 6]



Sumární vzorec: $C_{11}H_8Cl_2N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 319,16

Popis: pískově žluté krystaly

Výtěžek: 46 %

Teplota tání: 195 °C

R_f: 0

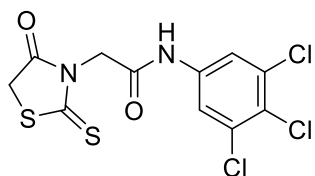
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.60 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H2), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H5), 7.40 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H6), 4.32 (s, 2H, NCH₂CO), 4.29 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.50, 172.13, 165.06, 138.99, 131.66, 131.39, 125.73, 120.94, 119.76, 44.29, 34.53.

IR: 3321, 2841, 1748, 1731, 1704, 1681, 1647, 1587, 1526, 1508, 1489, 1472, 1456, 1398, 1362, 1339, 1325, 1288, 1237, 1207, 1161, 1134, 1028, 982, 895, 864, 824, 789, 764, 745, 720, 681, 663, 653, 644, 636, 623, 611 cm⁻¹.

EA: vypočteno: vypočteno: C, 41.40; H, 2.53; N, 8.78, nalezeno: C, 41.44; H, 2.60; N, 8.82.

2-(4-Oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-N-(3,4,5-trichlorfenyl)acetamid [A 7]



Sumární vzorec: $C_{11}H_7Cl_3N_2O_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 369,67

Popis: světle hnědé krystaly

Výtěžek: 16 %

Teplota tání: 197 °C

R_f: 0,11

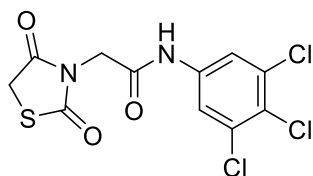
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.76 (s, 1H, NH), 7.75 (s, 2H, H₂, H₆), 4.69 (s, 2H, NCH₂CO), 4.39 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.59, 174.43, 164.83, 138.91, 133.56, 124.43, 119.73, 47.12, 36.66.

IR: 3332, 3170, 3105, 2962, 1726, 1701, 1587, 1526, 1490, 1458, 1438, 1407, 1382, 1366, 1350, 1298, 1288, 1221, 1191, 1151, 1113, 1088, 1043, 975, 946, 936, 880, 852, 812, 782, 769, 759, 745, 711, 688, 670, 658, 648, 633, 618 cm⁻¹.

EA: vypočteno: vypočteno: C, 35.74; H, 1.91; N, 7.58, nalezeno: C, 35.79; H, 2.01; N, 7.55.

2-(2,4-Dioxothiazolidin-3-yl)-*N*-(3,4,5-trichlorfenyl)acetamid [A 8]



Sumární vzorec: $C_{11}H_7Cl_3N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 353,60

Popis: světle hnědé krystaly

Výtěžek: 36 %

Teplota tání: 221,5 °C

R_f: 0,09

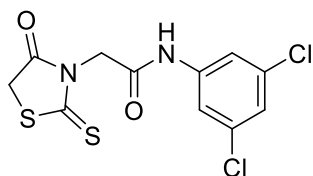
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.72 (s, 1H, NH), 7.75 (s, 2H, H₂, H₆), 4.32 (s, 2H, NCH₂CO), 4.30 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.47, 172.09, 165.44, 138.90, 133.56, 124.45, 119.77, 44.34, 34.54.

IR: 3285, 3172, 3094, 2982, 2953, 1741, 1709, 1672, 1584, 1525, 1489, 1436, 1419, 1402, 1385, 1323, 1287, 1228, 1196, 1156, 1089, 992, 942, 889, 853, 815, 793, 714, 689, 658, 650 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 37.36; H, 2.00; N, 7.92, nalezeno: C, 37.29; H, 2.07; N, 8.00.

N-(3,5-Dichlorofenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 9]



Sumární vzorec: $C_{11}H_8Cl_2N_2O_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 335,22

Popis: světle hnědé krystaly

Výtěžek: 58 %

Teplota tání: 218,5 °C

R_f: 0,08

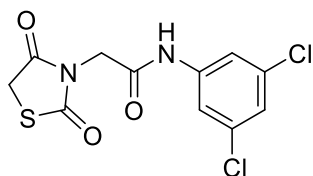
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.68 (s, 1H, NH), 7.55 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H2, H6), 7.27 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H4), 4.68 (s, 2H, NCH₂CO), 4.38 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.60, 174.43, 164.70, 141.21, 134.78, 123.51, 117.85, 47.12, 36.65.

IR: 3071, 1770, 1737, 1673, 1647, 1622, 1589, 1543, 1525, 1489, 1472, 1455, 1442, 1417, 1398, 1359, 1338, 1322, 1270, 1214, 1192, 1115, 1045, 977, 934, 881, 856, 807, 778, 751, 686, 671, 629, 620 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 39.41; H, 2.41; N, 8.36, nalezeno: C, 39.35; H, 2.45; N, 8.42.

N-(3,5-Dichlorfenyl)-2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 10]



Sumární vzorec:	C ₁₁ H ₈ Cl ₂ N ₂ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	319,16
Popis:	hnědošedé krystaly
Výtěžek:	29 %
Teplota tání:	192,5 °C
R _f :	0,35

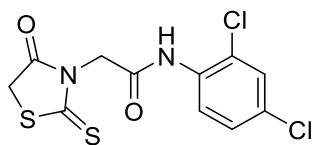
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.64 (s, 1H, NH), 7.56 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.27 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₄), 4.32 (s, 2H, NCH₂CO), 4.30 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.48, 172.11, 165.31, 141.19, 134.77, 123.52, 117.88, 44.33, 34.54.

IR: 3262, 3084, 1751, 1676, 1588, 1551, 1489, 1442, 1415, 1400, 1381, 1329, 1299, 1268, 1226, 1212, 1161, 1135, 1112, 1102, 983, 931, 886, 899, 857, 806, 789, 699, 666, 653, 644, 634, 627 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 41.40; H, 2.53; N, 8.78, nalezeno: C, 41.32; H, 2.55; N, 8.70.

N-(2,4-Dichlorofenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 11]



Sumární vzorec: $C_{11}H_8Cl_2N_2O_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 335,22

Popis: světle žluté až bílé krystaly

Výtěžek: 7 %

Teplota tání: 165 °C

R_f: 0,49

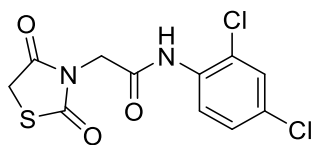
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.60 (s, 1H, NH), 8.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H3), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H6), 7.40 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.62 (s, 2H, NCH₂CO), 4.38 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.39, 174.30, 164.87, 133.82, 129.43, 128.36, 127.81, 125.05, 124.70, 45.34, 36.51.

IR: 3245, 2794, 1740, 1669, 1596, 1538, 1490, 1461, 1431, 1402, 1365, 1327, 1300, 1256, 1219, 1193, 1141, 1088, 1040, 1000, 977, 936, 883, 842, 823, 769, 759, 745, 670, 638, 628, 616 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 39.41; H, 2.41; N, 8.36, nalezeno: C, 39.32; H, 2.36; N, 8.33.

N-(2,4-Dichlorfenyl)-2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)acetamid [A 12]



Sumární vzorec: C₁₁H₈Cl₂N₂O₃S

Relativní molekulová hmotnost: 319,16

Popis: bílé krystaly

Výtěžek: 27 %

Teplota tání: >400 °C

R_f: 0,49

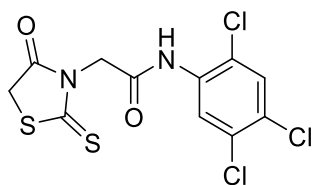
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.13 (s, 1H NH), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H₆), 7.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₃), 7.35 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H₅), 4.56 (s, 2H, NCH₂CO), 4.23 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 171.62, 171.26, 164.59, 133.90, 129.52, 128.99, 127.66, 125.43, 124.80, 43.91, 33.66.

IR: 3133, 1748, 1732, 1716, 1704, 1697, 1681, 1647, 1575, 1542, 1522, 1508, 1489, 1473, 1456, 1386, 1339, 1162, 836, 818, 800, 766, 743, 664, 630, 614 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 41.40; H, 2.53; N, 8.78, nalezeno: C, 41.49; H, 2.49; N, 8.83.

2-(4-Oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-N-(2,4,5-trichlorfenyl)acetamid [A 13]



Sumární vzorec:	C ₁₁ H ₇ Cl ₃ N ₂ O ₂ S ₂
Relativní molekulová hmotnost:	369,66
Popis:	nažloutlé krystaly
Výtěžek:	21 %
Teplota tání:	210 °C
R _f :	0,09

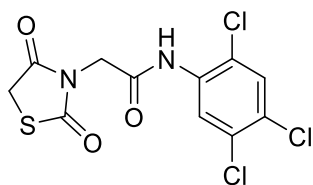
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.23 (s, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, H3), 7.93 (s, 1H, H6), 4.82 (s, 2H, NCH₂CO), 4.41 (s, 2H, CH₂S).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 203.50, 174.38, 165.01, 134.91, 131.18, 130.35, 128.03, 126.17, 125.50, 46.85, 36.60.

IR: 2983, 2939, 1740, 1597, 1490, 1461, 1430, 1402, 1386, 1366, 1352, 1325, 1300, 1278, 1256, 1218, 1191, 1140, 1110, 1088, 1040, 1001, 977, 936, 883, 858, 841, 769, 759, 745, 666, 639 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 35.74; H, 1.91; N, 7.58, nalezeno: C, 35.81; H, 1.95; N, 7.56.

2-(2,4-Dioxothiazolidin-3-yl)-N-(2,4,5-trichlorfenyl)acetamid [A 14]



Sumární vzorec: $C_{11}H_7Cl_3N_2O_3S$

Relativní molekulová hmotnost: 353,60

Popis: bílé krystaly

Výtěžek: 15 %

Teplota tání: $> 400\text{ }^{\circ}\text{C}$

R_f: 0,1

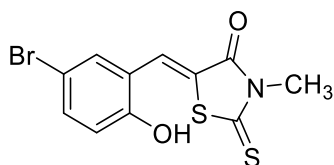
^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.19 (s, 1H, NH, NH), 8.05 (s, 1H, H3), 7.93 (s, 1H, H6), 4.46 (s, 2H, NCH₂CO), 4.32 (s, 2H, CH₂S).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 172.14, 171.75, 165.34, 134.62, 130.89, 130.09, 127.74, 125.89, 125.15, 43.76, 34.20.

IR: 3317, 3099, 3003, 2946, 1732, 1681, 1558, 1520, 1394, 1361, 1319, 1224, 1162, 992, 902, 851, 841, 820, 796, 763, 740, 727, 720, 710, 679, 642, 635, 627, 621, 611, 604 cm^{-1} .

EA: vypočteno: C, 37.36; H, 2.00; N, 7.92, nalezeno: C, 37.33; H, 1.97; N, 7.96.

(Z)-5-(5-Brom-2-hydroxybenzyliden)-3-methyl-2-thioxothiazolidin-4-on [K 1]



Sumární vzorec:	C ₁₁ H ₈ BrNO ₂ S ₂
Relativní molekulová hmotnost:	330,21
Popis:	oranžové krystaly
Výtěžek:	70 %
Teplota tání:	234,5 °C
R _f :	0,26

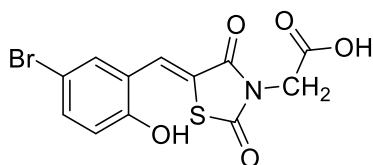
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.08 (s, 1H, OH), 7.81 (s, 1H, =CH), 7.46 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H, H4), 7.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3), 3.36 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO): δ 194.23, 167.60, 157.21, 135.68, 132.13, 127.64, 123.40, 122.73, 119.04, 111.22, 31.73.

IR: 3216, 3058, 2940, 1686, 1585, 1488, 1417, 1353, 1294, 1249, 1184, 1125, 1095, 1000, 961, 916, 887, 854, 819, 753, 743, 678, 647, 622 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 40.01; H, 2.44; N, 4.24, nalezeno: C, 39.91; H, 2.39; N, 4.21.

(Z)-2-[5-(5-Brom-2-hydroxybenzyliden)-2,4-dioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina [K 2]



Sumární vzorec: $C_{12}H_8BrNO_5S$

Relativní molekulová hmotnost: 358,16

Popis: bílé krystaly

Výtěžek: 43 %

Teplota tání: 103,7 °C

R_f: 0.83

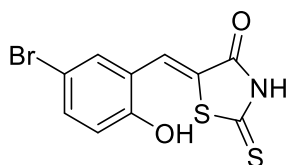
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.26 (s, 1H, COOH), 7.93 (s, 1H, =CH), 7.45 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H4), 7.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H3), 4.29 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 168.34, 167.51, 165.24, 157.03, 135.72, 132.32, 127.64, 123.32, 122.71, 119.07, 111.24, 42.53.

IR: 3566, 3243, 2885, 1748, 1704, 1672, 1654, 1612, 1567, 1542, 1468, 1429, 1375, 1339, 1305, 1274, 1205, 1157, 1115, 1072, 1017, 990, 958, 894, 830, 768, 701, 628 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 40.24; H, 2.25; N, 3.91, nalezeno: C, 40.30; H, 2.29; N, 4.00.

(Z)-5-(5-Brom-2-hydroxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on [K 3]



Sumární vzorec: $C_{10}H_6BrNO_2S_2$

Relativní molekulová hmotnost: 316,19

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 93 %

Teplota tání: 189 °C

R_f: 0,09

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.90 (s, 1H, OH), 10.95 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, =CH), 7.44 (dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H, H4), 7.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H6), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 196.31, 172.53, 170.16, 157.04, 135.37, 131.77, 126.15, 122.79, 118.92, 111.27.

IR: 3240, 3034, 2863, 1696, 1672, 1652, 1639, 1612, 1584, 1567, 1466, 1370, 1307, 1275, 1258, 1222, 1210, 1178, 1168, 1115, 1107, 1086, 1070, 1017, 987, 961, 894, 830, 768, 703, 653, 642, 628, 606 cm^{-1} .

EA: vypočteno: C, 37.99; H, 1.91; N, 4.43, nalezeno: C, 38.11; H, 1.94; N, 4.49.

Pozn.: Tato sloučenina byla již dříve popsána. [26]

4.2 Biochemie

4.2.1 Stanovení inhibiční aktivity AChE a BChE

Inhibiční aktivita sloučenin byla vyjádřena jako hodnota IC_{50} a byla stanovena spektrofotometricky pomocí modifikované Ellmanovy metody. Enzymatická aktivita byla měřena nepřímo stanovením iontu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny vzniklého reakcí thiolového činidla 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB) a thiocholinu – produktu štěpení acetylthiocholinu (ATCh) a butyrylthiocholinu (BTCh) jakožto substrátů pro hydrolyzu pomocí AChE a BChE. [28]

Finální reakční směs o objemu 2000 μ l pro stanovení enzymatické aktivity obsahovala koncentraci 40 μ mol/l ATCh, respektive BTCh, s aktivitou 0,2 U/ml a DTNB v koncentraci 100 μ mol/l pro všechny reakce, všechny složky byly ředěny v demineralizované vodě (vodivost 3 μ S, dodavatel zařízení BKG Water Treatment, Hradec Králové, Česká republika). Pro všechny testované sloučeniny a standardy bylo ve finální reakční směsi použito pět různých koncentrací inhibitoru. Jako standardy byly použity galantamin, takrin a donepezil. Finální koncentrace DMSO, ve kterém byly rozpuštěny testované látky, byla 0,2 %. Všechna měření byla provedena v triplicátech. Průměrné hodnoty měření reakčních rychlostí (v_0 – neinhibovaná reakce, v_i – inhibovaná reakce) byly použity ke sestrojení grafu závislosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru. Ze získané rovnice regresní přímky byly vypočteny hodnoty IC_{50} . [28]

Dále byla hodnocena reverzibilita inhibice BChE nejúčinnějším inhibitorem (**A 7**). Byly vybrány tři koncentrace inhibitoru (0; 1; 2,5; 3,5 μ mol/l), cílem bylo pozorovat účinek inhibitoru na aktivitu enzymu v průběhu času. Postup byl analogický ke stanovení enzymatické aktivity. Připravená reakční směs obsahující fosfátový pufr, BChE a nejúčinnější sloučeninu v jedné ze zvolených koncentrací byla intenzivně míchána a v daných časech byly ke vzorku odebranému z reakční směsi přidány DNTB a BTCh, rychle promíchány a byla změřena absorbance k určení aktivity enzymu. Na základě znalosti enzymatické aktivity při absenci inhibitoru (tj. 100% aktivita) byla kvantifikována procenta zbytkové aktivity v přítomnosti inhibitoru. Následně byla sestrojena závislost zbytkové aktivity v čase. Na základě těchto dat je možné odlišit reverzibilní a ireverzibilní inhibici a její typ. Pro stanovení typu inhibice byl použit Lineweaver-Burkeův graf, postup

byl analogický ke stanovení IC_{50} . Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech. Ze získaných rovnic regresních křivek v tomto grafu byla vypočtena Michaelisova konstanta (K_M) a maximální rychlost (V_m), na jejichž základě byl určen typ inhibice. [28] Typ inhibice byl stanoven pouze pro BChE.

Pro všechna měření byla použita AChE z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus* L.), BChE pocházela z koňského séra. Všechny enzymy, substráty a standardy byly zakoupeny od firmy Merck (Praha, Česká republika).

Všechna popsaná stanovení byla provedena na Katedře biologických a biochemických věd na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice, pod vedením Mgr. Šárky Štěpánkové, Ph.D. Autorka práce se na těchto měřeních osobně podílela.

4.3 Biologie

4.3.1 Antibakteriální aktivita

Hodnocení antibakteriální aktivity probíhalo vůči čtyřem G+ a čtyřem G- klinicky významným bakteriálním kmenům. Jednalo se o kmeny *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, CCM (Czech Collection of Microorganisms) 4223, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, CCM 4224, *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, DSM 30007, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955. Tyto kmeny byly získány z CCM (Brno, Česká republika) nebo se jednalo o klinické izoláty z Ústavu klinické mikrobiologie (Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Česká republika). Testovalo se pomocí mikrodiluční bujónové metody, která byla provedena dle EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) instrukcí (2006). [29]

Kultivace probíhala v Mueller-Hintonově bujónu s upravenou koncentrací kationtů (CAMHB, M-H 2 broth, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) při 35 ± 2 °C. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), čímž byly připraveny zásobní roztoky. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila růst bakterií. Při každém testu byly zahrnuty pozitivní kontroly obsahující pouze mikroby, negativní kontroly obsahující pouze kultivační médium s DMSO a vnitřní standardy.

Antibakteriální aktivitu vyjadřuje hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC, udávaná v $\mu\text{mol/l}$) odečítaná po 24 a 48 hodinách statické inkubace při teplotě 35 ± 2 °C. Všechny experimenty byly provedeny duplicitně a pro platnost výsledku nesmí být rozdíl MIC mezi dvěma paralelními stanoveními větší než jeden díl na stupnici měření. Stupnice měření pro stanovení MIC začínala od 0,49 $\mu\text{mol/l}$. Výsledky byly odečítány vizuálně. Jako standard byl použit piperacilin. [29][30]

4.3.2 Antimykobakteriální aktivita

Testování prokazující antimykobakteriální aktivity bylo provedeno vůči rychle rostoucím druhům mykobakterií: *Mycobacterium (Mycolicibacterium) smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607), *Mycobacterium (Mycolicibacterium) aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z Německé kolekce mikroorganismů a buněčných kultur (DSM, Braunschweig, Německo) a s avirulentním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) z Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms. Pro testování byla zvolena mikrodiluční bujónová metoda v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Bylo použito kultivační médium Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie). Kultivace probíhala na agaru Middlebrook 7H9 a suspenze byly připraveny v bujónu Middlebrook 7H9. Finální hustota byla upravena na 1,0 dle McFarlandovy stupnice a zředěna bujónem v poměru 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie) nebo 1:10 (pro *M. tuberculosis*). Všechny sloučeniny určené pro testování byly rozpuštěny v DMSO, dále byl přidán Middlebrook bujón pro získání koncentrace 2000 µg/ml. Jako standardy byly pro testování aktivity využity isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX; Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Konečných koncentrací bylo docíleno binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze. Koncentrace byly nastaveny na 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91 µg/ml podle konečné MIC. Finální koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst testovaných kmenů. Do testování byly zahrnuty pozitivní (bujón, DMSO a bakterie) a negativní kontroly (pouze bujón a DMSO). Destičky byly uzavřeny polyesterovým přilnavým filmem a staticky inkubovány při 37 °C. Po 48 hodinách inkubace pro *M. smegmatis*, po 72 h pro *M. aurum* a po 120 h inkubace v případě *M. tuberculosis*, byl přidán 0,01% roztok sodné soli resazurinu. Barvivo bylo zhotoveno rozpuštěním resazurinu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v deionizované vodě, čímž vznikl 0,02% roztok. Dále byl zhotoven 10% vodný roztok Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Oba roztoky byly smíchány ve stejných objemech a přefiltrovány skrz membránový filtr. Inkubace mikrotitračních destiček pro stanovení aktivity probíhala další 2,5 hodiny u *M. smegmatis*, 4 h u *M. aurum* a 24 hodin u *M. tuberculosis*. Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako hodnota

minimální inhibiční koncentrace (MIC) a byla odečtena na základně barevné změny roztoku v jamkách (modrá barva – aktivní sloučenina; růžová barva – neaktivní sloučenina, resp. koncentrace). Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech. [31][32][33]

4.3.3 Antifungální aktivita

Stanovení antifungální aktivity probíhalo vůči čtyřem kvasinkovým kmenům *Candida albicans* ATCC 24433, CCM 8320, *Candida krusei* ATCC 6258, CCM 8271, *Candida parapsilosis* ATCC22019, CCM 8260, *Candida tropicalis* ATCC 750, CCM 8264, a čtyřem kmenům vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Absidia (Lichtheimia) corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, CCM 8377. Byla využita mikrodiluční bujónová metoda, která byla provedena dle modifikovaných EUCAST instrukcí. [32][33]

Všechny testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny binárním ředěním RPMI-1640 médiem s L-glutaminem doplněným 2 % roztokem glukózy (w/v) a pufovány na finální pH 7 pomocí 3-(N-morfolin)propan-1-sulfonové kyseliny (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cílová koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a nebyl jí inhibován růst hub.

Inkubace probíhala při 35 ± 2 °C po dobu 24 a 48 hodin (72 a 120 hodin pro *Trichophyton interdigitale*). Během testování byly použity pozitivní kontroly tvořené pouze testovanými kmeny hub a negativní kontroly tvořeny kultivačním médiem s DMSO. Dále byla zahrnuta interní kontrola kvality. Stanovení MIC byla prováděna vizuálně a v duplikátech. Aby vyhodnocené výsledky byly platné, nesmí být rozdíl stanovené hodnoty MIC ze dvou paralelních měření větší než jeden díl stupnice měření, tato stupnice začínala hodnotou 0,49 $\mu\text{mol/l}$.

Referenčními sloučeninou pro porovnání stanovení byl flukonazol. Výsledná MIC flukonazolu představuje hodnotu IC_{50} , tj. nejnižší koncentraci léčiva, která způsobuje 50% inhibici růstu oproti kontrole bez léčiva. Výsledné hodnoty byly odečteny po 24 hodinách v případě kvasinek nebo 48 hodinách v případě plísni statické kultivace mikrodilučních destiček při 35 ± 2 °C. Cílové hodnoty byly stanoveny pomocí čtečky

určené pro tyto destičky (Synergy™ HTX, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)
při vlnové délce 530 nm. [30][32][33]

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Syntéza

Všechny nově nasyntetizované sloučeniny vychází ze struktury rhodaninu, resp. thiazolidin-2,4-dionu. Tyto výchozí sloučeniny byly zvoleny na základě předešlých studií, ve kterých bylo prokázáno jejich široké biologické využití, zejména schopnost inhibice cholinesteráz, antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivity.

Bylo připraveno celkem 17 nových sloučenin v různých výtěžcích (7-93 %). Nejnižší výtěžek byl zaznamenán u sloučeniny **A 11** (7 %), naopak nejvyšší výtěžek byl zaznamenán u sloučeniny **K 3** (93 %).

Čtrnáct sloučenin (**A 1-A 14**) vzniklo reakcí rhodanin-3-octové kyseliny, resp. 2,4-dioxothiazolidin-3-octové kyseliny, s ekvivalentním množstvím příslušného anilinu a mírným nadbytkem HOBt a EDC podle dříve publikované metodiky. [1] Všechny komponenty byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel dichlormethan/ethyl-acetát, po uplynutí reakční doby bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku a k získanému olejovitému odparku bylo přidáno malé množství ethyl-acetátu. Vzniklá suspenze byla přenesena a vytřepána v dělicí nálevce zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou. Organická fáze byla nakonec vysušena síranem sodným, sušidlo bylo odfiltrováno a po přidání *n*-hexanu k iniciaci krystalizace byla reakční směs ponechána při teplotě +4 °C po dobu 24 hodin. Vzniklé krystaly následně byly zfiltrány. Reakčním mechanismem této syntézy je karbodiimidový coupling. Všechny vzniklé deriváty jsou z funkčního hlediska amidy. Sloučeniny **A 7** a **A 11** musely být dodatečně přečišťovány krystalizací z ethyl-acetátu.

Zbývající tři sloučeniny (**K 1 – K 3**) vznikly reakcí halogenového salicylaldehydu (5-bromsalicylaldehyd) s rhodaninem (resp. 3-methylrhodaninem a 2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octovou kyselinou) a octanem sodným pomocí Knoevenagelovy kondenzace v ledové kyselině octové za teploty varu rozpouštědla. Následně bylo odpařeno rozpouštědlo za sníženého tlaku, což vedlo k iniciaci krystalizace. Výsledný produkt byl, po promytí vodou, získán filtrací. Všechny tyto sloučeniny jsou ze strukturního hlediska kondenzáty.

Všechny nově připravené sloučeniny byly dále charakterizovány spektrálními a fyzikálními metodami. Dále byla ověřena jejich čistota, která byla dostatečná pro jejich následující biologické hodnocení.

5.2 Biochemické hodnocení

U všech sloučenin byla otestována enzymatická inhibiční aktivita vůči AChE a BChE, u neúčinnějšího inhibitoru byl stanoven i typ inhibice.

Výsledky enzymatického testování jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 1). Stanovení probíhalo pomocí modifikované Ellmanovy metody a bylo provedeno na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Tato metoda spočívá v nepřímém stanovení iontu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny. Na testování připravených látek se autorka práce sama podílela. Výsledky testování jsou vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} , tato hodnota odpovídá takové koncentraci inhibitoru, která sníží aktivitu daného enzymu na polovinu. Tyto hodnoty jsme získaly na základě měření rychlostí inhibovaných a neinhibovaných reakcí, ze kterých byla sestrojena závislost a z rovnice regresní přímky byly vypočteny hodnoty IC_{50} (Graf 1). Výsledky byly porovnány se standardy galantaminem, takrinem, donepezilem a také s výchozími molekulami pro design této série sloučenin. [1]

V tabulce (Tabulka 1) jsou zaznamenány hodnoty IC_{50} pro všechny nově syntetizované struktury a použité standardy, dále jsou v tabulce zaznamenány výsledky výchozích hitů, které jsou označeny jako „**výchozí amid**“ (*N*-(4-chlorfenyl)-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetamid) a „**výchozí kondenzát**“, strukturně (Z)-2-[5-(5-brom-2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]octová kyselina.

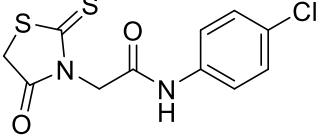
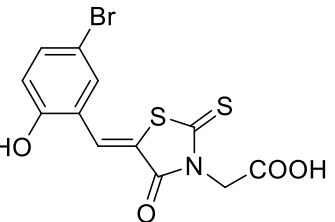
Vyšší enzymatickou inhibiční aktivitu vykazovaly amidy, které byly aktivnější spíše vůči BChE.

Nejnižší hodnoty IC_{50} vykazovala sloučenina **A 7** (34,42 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 2,91 $\mu\text{mol/l}$ vůči BChE). Jedná se o amid, který ve své struktuře obsahuje tři atomy chloru v poloze 3,4,5 a thio skupinu, přičemž jeho strukturní analog, který obsahuje taktéž tři atomy chloru ve stejných polohách, ale dále dvě oxo skupiny, měl aktivitu podstatně nižší (**A 8**). V inhibici cholinesteráz bylo dosaženo poměrně nízké hodnoty IC_{50} i

u sloučeniny **A 14** (32,18 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 9,35 $\mu\text{mol/l}$ pro BChE), jedná se o derivát obsahující také tři atomy chloru, ale v tomto případě v polohách 2, 4 a 5, a dvě oxo skupiny. Jeho strukturním analogem obsahujícím thioskupinu je **A 13**, u které byla inhibiční aktivita podstatně nižší (130,33 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 384,66 $\mu\text{mol/l}$ pro BChE). Dále byla prokázána významná inhibiční aktivita u sloučenin **A 9** (59,51 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 4,7 $\mu\text{mol/l}$ pro BChE) a **A 10** (83,47 $\mu\text{mol/l}$ pro AChE, 4,93 $\mu\text{mol/l}$ pro BChE), tyto obě sloučeniny ve své struktuře obsahují dva chlory v polohách 2,4. Všechny sloučeniny byly porovnány se standardy. Sloučenina **A 7**, která byla vyhodnocena jako nejúčinnější, a dále pro ni byl stanoven i typ inhibice, měla srovnatelnou aktivitu pro BChE jako použitý standard galantamin (2,77 $\mu\text{mol/l}$). V porovnání s výchozím amidem mají ve většině případů nově připravené amidy vyšší (nebo srovnatelnou) inhibiční aktivitu, zejména vůči BChE. Z dosažených výsledků je dále patrné, že sloučeniny **A 1**, **A 7**, **A 8**, **A 9** a **A 10** selektivně inhibují BChE, což dokazuje index selektivity, který byl vypočten z poměru hodnot IC_{50} pro AChE a BChE a dosahoval u těchto sloučenin hodnoty >10 , což značí právě selektivní účinek.

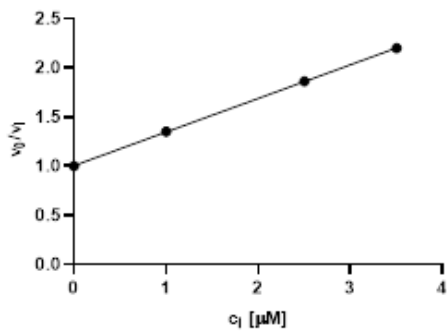
Oproti tomu tři C5 kondenzáty měly obecně nižší inhibiční aktivitu než použité standardy. Nicméně v porovnání s výchozím kondenzátem dosahovaly dvě sloučeniny (**K1** a **K3**) mírně nižších hodnot IC_{50} pro BChE, což značí jejich vyšší inhibiční aktivitu. Nejvyšší aktivita vůči AChE byla zjištěna u sloučeniny **K2** (57,87 $\mu\text{mol/l}$), jedná se o kondenzát 2-(2,4-dioxothiazolidin-3-yl)octové kyseliny. Nejnižší hodnota IC_{50} pro BChE byla stanovena pro **K3** (104,35 $\mu\text{mol/l}$), což je derivát bez substituce na dusíku. Tato hodnota IC_{50} je v porovnání s aktivitou výchozího kondenzátu vůči BChE nižší. Obecně si lze všimnout, že nově připravené kondenzáty jsou aktivnější vůči AChE než BChE.

V rámci porovnání nově připravených amidů a kondenzátů se jako lepší inhibitory cholinesteráz jeví amidy.

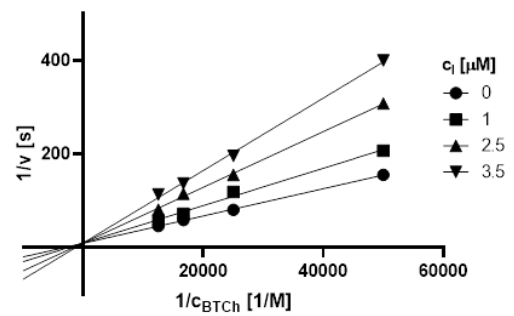
sloučenina	AChE IC ₅₀ (μmol/l)	BChE IC ₅₀ (μmol/l)
A 1	146,63±0,33	14,80±0,70
A 2	56,20±1,06	21,83±0,04
A 3	93,67±0,50	90,62±3,14
A 4	123,56±5,84	57,80±3,05
A 5	58,29±2,05	7,83±0,14
A 6	40,67±1,31	12,69±0,12
A 7	34,42±0,01	2,91±0,05
A 8	172,98±5,50	10,70±0,63
A 9	59,51±2,32	4,70±0,08
A 10	83,47±2,87	4,93±0,21
A 11	44,84±1,75	108,72±4,66
A 12	131,16±7,63	>500
A 13	130,33±4,35	384,66±5,97
A 14	32,18±0,65	9,35±0,32
K 1	98,80±2,42	112,83±2,77
K 2	57,87±1,97	356,89±36,51
K 3	75,31±0,75	104,35±0,78
galantamin	1,54±0,02	2,77±0,15
takrin	0,038±0,002	0,004±0,00006
donepezil	0,015±0,0001	0,0314±0,001
Výchozí amid 	56,76±1,47	26,57±0,29
Výchozí kondenzát 	48,35±0,11	121,26±1,54

Tabulka 1 Výsledky stanovení enzymatické inhibiční aktivity

Typ inhibice byl stanoven obdobně jako inhibiční aktivita s tím rozdílem, že byla měněna koncentrace enzymu v průběhu času a následně na základě podílů rychlostí inhibované a neinhibované reakce byla sestavena lineární závislost dle Lineveawer-Burka. Jak již bylo zmíněno, typ inhibice byl stanoven u amidu **A 7**, jelikož vykazoval vyšší inhibiční aktivitu vůči BChE, byl pro toto stanovení použit právě tento enzym. Z grafu (Graf 2) je patrné, že se jedná o reverzibilní kompetitivní inhibici.



Graf 1 – Stanovení IC_{50} pro **A 7**



Graf 2 – Stanovení typu inhibice **A 7**

5.3 Biologické hodnocení

V následující tabulce (Tabulka 2) jsou shrnuty výsledky stanovení antibakteriální aktivity. Toto stanovení bylo provedeno vůči čtyřem G+ a G- bakteriálním kmenům pomocí mikrodiluční bujónové metody. Konkrétně se jednalo o bakterie *Staphylococcus aureus* (SA), methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Acinetobacter baumannii* (ACI) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je taková koncentrace sloučeniny, která již inhibuje růst daného mikroba. Standardem pro toto stanovení bylo antibiotikum piperacilin.

Je třeba podotknout, že všechny sloučeniny byly připraveny primárně za účelem inhibice cholinesteráz a co se týče antibakteriální aktivity, nebyla příliš vysoká.

U většiny připravených amidů přesahovala naměřená hodnota MIC nejvyšší testovanou koncentrací. Nejnižších hodnot MIC bylo dosaženo u **K 1** (125 $\mu\text{mol/l}$ pro SE) a **K 3** (125 $\mu\text{mol/l}$ pro SA). Obě tyto sloučeniny jsou strukturně kondenzáty a celkově lze z dosažených výsledků vyvodit, že obecně byly hodnoty MIC nižší spíše u kondenzátů než u amidů. Nicméně všechny dosažené hodnoty MIC jsou výrazně vyšší než použitý standard, tudíž lze tvrdit, že antibakteriální aktivita těchto sloučenin je nízká.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol/l)								
		A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9
SA	24 h	>500	>500	>500	>500	250	500	250	>500	250
	48 h	>500	>500	>500	>500	500	>500	500	>500	500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	500	500	250	>500	500
	48 h	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
		A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	K 1	K 2	K 3	piperacilin
SA	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	250	500	125	3,7
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	250	3,7
MRSA	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	250	29,6
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	500	29,6
SE	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	125	500	500	0,23
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	500	0,23
EF	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	250	>500	500	3,7
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	>500	>500	3,7
EC	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	250	500	7,41
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	250	>500	7,41
KP	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	250	500	>59,31
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	250	500	>59,31
ACI	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	500	59,31
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	500	>500	59,31
PA	24 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	>500	500	29,66
	48 h	>500	>250	>125	>125	>125	>250	>500	>500	29,66

Tabulka 2 Výsledky stanovení antibakteriální aktivity

V následující tabulce (Tabulka 3) jsou zaznamenány výsledky antifungální aktivity, která byla stanovena vůči čtyřem kmenům kvasinek a čtyřem kmenům vláknitých hub. Konkrétně se jednalo kmeny *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CT), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Aspergillus flavus* (AFla), *Absidia corymbifera* (AC), *Trichophyton interdigitale* (TI). Stanovení probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody a výsledky testování jsou opět vyjádřeny hodnotami MIC, jako standard byl použit flukonazol.

U všech testovaných amidů přesahovala hodnota MIC nejvyšší možnou hodnocenou koncentraci sloučeniny, je tudíž patrné, že antifungální aktivita u těchto sloučenin není významná. Opět je nutno podotknout, že primárně byly sloučeniny syntetizovány za účelem inhibice AChE a BChE.

U připravených kondenzátů bylo dosaženo lepších výsledků. Nejnižších hodnot MIC bylo dosaženo u sloučenin **K 2** (125 $\mu\text{mol/l}$ pro všechny kmeny kvasinek), což je kondenzát thiazolidinu, dále u rhodaninu bez *N*-substituce **K 3** (62,5 $\mu\text{mol/l}$ pro CK). Stejně jako u antibakteriální aktivity se zde potvrzuje, že aktivnějšími sloučeninami jsou kondenzáty, nicméně i tak je antifungální aktivita obecně nižší. Všechny sloučeniny dosahovaly vyšších hodnot MIC než použitý standard.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)								
		A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
CP	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
TI	5 dní	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
	7 dní	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125
		A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	K 1	K 2	K 3	flukonazol
CA	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	125	3,3
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	125	-
CK	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	62,5	>104,5
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	125	-
CP	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	125	6,5
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	250	-
CT	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	125	13,1
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	125	250	-
AF	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	500	250	>104,5
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	500	>500	>104,5
AFla	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	500	250	>104,5
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	500	>500	>104,5
AC	24 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	>500	500	>104,5
	48 h	>125	>250	>125	>125	>125	>250	>500	>500	>104,5
TI	5 dní	>125	>250	>125	>125	>125	>250	250	125	52,2
	7 dní	>125	>250	>125	>125	>125	>250	500	250	52,2

Tabulka 3 Výsledky stanovení antifungální aktivity

V poslední tabulce (Tabulka 4) je zaznamenána antimykobakteriální aktivita, jejíž stanovení probíhalo opět mikrodiluční bujónovou metodou, a výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty MIC. Aktivita byla stanovena vůči kmenům *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a avirulentnímu kmenu *Mycobacterium tuberculosis*. Jako standardy byly použity rifampicin, isoniazid a ciprofloxacín, jejichž hodnoty MIC jsou také zahrnuty v tabulce.

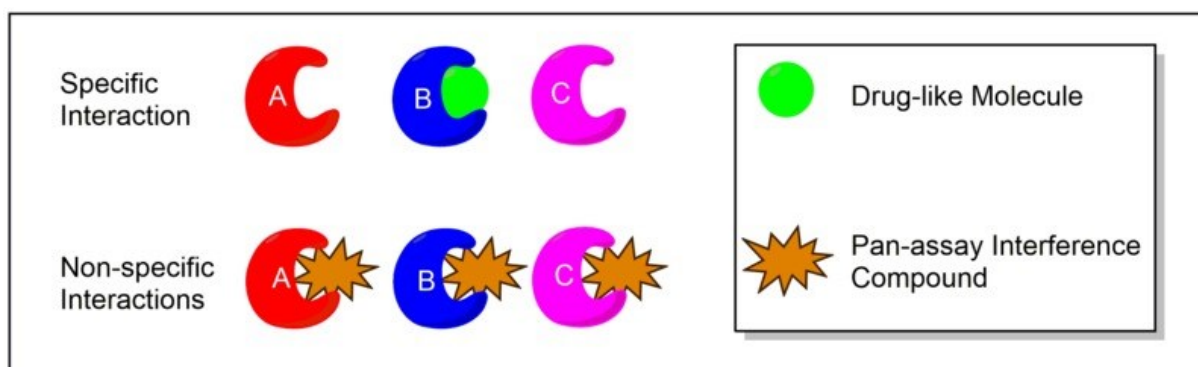
Z nově připravených amidů nejnižší hodnoty MIC vykazovaly sloučeniny **A 8** (62,5 µg/ml pro *M. kansasii*), což je amid obsahující tři atomy chloru v poloze 3,4 a 5 a dvě oxo skupiny. Velice podobných výsledků dosáhl i derivát **A 9**, nejnižší hodnota MIC byla zaznamenána také u *M. kansasii* (62,5 µg/ml). Tento rhodaninový derivát obsahuje dva atomy chloru v polohách 3 a 5 anilidové části. Ostatní amidy nevykazují příliš výrazné antimykobakteriální aktivity.

V případě kondenzátů vykazovaly aktivitu všechny připravené sloučeniny. Nejnižší hodnoty MIC pro jednotlivé sloučeniny byly pro *N*-methylovaný rhodaninový kondenzát **K 1** 15,625 µg/ml (*M. kansasii*), pro kyselinu **K 2** 31,25 µg/ml (*M. aurum*, *M. kansasii*) a rhodaninový kondenzát **K 3** 15,625 µg/ml (*M. kansasii*). Nicméně u všech sloučenin byla i zde naměřená hodnota MIC vyšší než u použitých standardů.

Kmen/kód sloučeniny	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (µg/ml)									
	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10
<i>M. smegmatis</i>	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500
<i>M. aurum</i>	500	≥500	≥500	250	500	500	500	250	125	250
<i>M. avium</i>	≥500	≥500	≥500	≥500	250	500	250	125	250	250
<i>M. kansasii</i>	250	250	≥500	250	125	250	250	62,5	62,5	125
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	125	500	250	≥500	125	≥500	250	125	125	250
Kmen/kód sloučeniny	A 11	A 12	A 13	A 14	K 1	K 2	K 3	INH	RIF	CPX
<i>M. smegmatis</i>	≥125	≥125	≥125	≥125	≥500	62,5	125	31,25	25	0,125
<i>M. aurum</i>	≥125	≥125	≥125	≥125	62,5	31,25	62,5	3,91	0,39	0,016
<i>M. avium</i>	≥125	≥125	≥125	≥125	62,5	125	125	1000	0,25	0,78
<i>M. kansasii</i>	125	≥125	≥125	≥125	15,625	31,25	15,625	3,125	0,025	0,25
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	≥125	≥125	≥125	≥125	31,25	125	62,5	0,25	0,0031	0,25

Tabulka 4 Výsledky stanovení antimykobakteriální aktivity

Jelikož pokrývají rhodaniny a jejich deriváty velice široké spektrum biologických aktivit, což je patrné i z našich dosažených výsledků, jsou obecně jejich deriváty řazeny mezi tzv. PAINS (pan-assay interference compounds). [34][35][36] Tato skupina chemických sloučenin často poskytuje falešně pozitivní výsledky při screeningu biologické aktivity, zejména u enzymových esejí, jelikož mají tendenci nespecificky reagovat s mnoha biologickými cíli (Obr. 19). Mezi časté PAINS patří toxoflavin, kurkumin nebo chinony. Celkově je tato problematika velice obsáhlá a věnuje jí řada studií. Ani u rhodaninových derivátů není tato diskuse zcela uzavřena a situace není jednoznačná. [37][38] Pro další vývoj potenciálních léčiv na bázi rhodaninu a thiazolidin-2,4-dionu, zejména jejich C5-enových derivátů, je potřeba vždy potvrdit specifitu zjištěné aktivity. Zde prezentované sloučeniny, zejména amidy, mají velmi nízkou antimikrobní aktivitu, naopak jsou výrazně účinnější jako inhibitory cholinesteráz, což naznačuje specifický účinek.



Obr. 19 Mechanismus působení PAINS

Obrázek dostupný z: https://en.wikipedia.org/wiki/File:PAINS_Figure.tif

7. ZÁVĚR

Sloučeniny odvozené od struktury rhodaninů a thiazolidin-2,4-dionů vykazují široké spektrum biologických aktivit, mezi které patří např. antibakteriální, antifungální, antimykobakteriální aktivita nebo enzymatická inhibiční aktivita vůči různým skupinám enzymů, do kterých spadají i cholinesterázy.

Inhibitory cholinesteráz nacházejí hojné využití v terapii různých onemocnění, např. při Alzheimerově chorobě nebo myasthenii gravis.

V rámci této práce bylo připraveno celkem sedmnáct nových sloučenin, čtrnáct amidů a tři C5 kondenzáty. U všech sloučenin byla stanovena enzymatická inhibiční aktivita vůči AChE a BChE, u neúčinnějšího inhibitoru byl stanoven i typ inhibice BChE. Dále byla hodnocena antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivita.

Nejvyšší inhibiční účinek na oba enzymy byl jistěn u 2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)-*N*-(3,4,5-trichlorfenyl)acetamidu, dále bylo stanoveno, že se jedná o reverzibilní kompetitivní inhibitor. Obecně nově připravené amidy vykazovaly vyšší inhibiční aktivitu než kondenzáty, u kterých ale byla naopak zjištěna vyšší antimikrobní aktivita.

U všech sloučenin byla prokázána biologická aktivita, která má souvislost s jejich strukturou. Následující plánované testování bude zaměřeno na cytotoxicitu těchto sloučenin.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1 Acetylcholinesteráza.....	2
Obr. 2 Butyrylcholinesteráza	2
Obr. 3 Senilní plaky a neurofibrilární klubka.....	6
Obr. 4 Pacient trpící onemocněním myasthenia gravis	8
Obr. 5 Vzorec rivastigminu.....	9
Obr. 6 Vzorec donepezilu.....	10
Obr. 7 Vzorec takrinu	10
Obr. 8 Vzorec fyzostigminu	11
Obr. 9 Vzorec galantaminu	11
Obr. 10 Vzorec huperzinu A	12
Obr. 11 Vzorec fenserinu	13
Obr. 12 Vzorec tolserinu	13
Obr. 13 Vzorec pyridostigminu	15
Obr. 14 Vzorec neostigminu.....	15
Obr. 15 Vzorec distigminu.....	15
Obr. 16 Vzorec ambenonia	15
Obr. 17 Vzorec rhodaninu a thiazolidin-2,4-dionu.....	16
Obr. 18 Přehled odvození cílových struktur.....	17
Obr. 19 Mechanismus působení PAINS.....	54
Schéma 1 Karbodiimidový coupling.....	20
Schéma 2 Knoevenagelova kondenzace	20
Tabulka 1 Stanovení enzymatické inhibiční aktivity.....	47
Tabulka 2 Stanovení antibakteriální aktivity	50
Tabulka 3 Stanovení antifungální aktivity	52
Tabulka 4 Stanovení antimykobykteriální aktivity	53
Graf 1 - Stanovení IC ₅₀ pro A 7	48
Graf 2 - Stanovení typu inhibice.....	48

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KRÁTKÝ, Martin, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína VORČÁKOVÁ a Jarmila VINŠOVÁ. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel rhodanine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*. 2016, **68**, 23-29. ISSN 00452068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2016.07.004.
- [2] POHANKA, Miroslav. Stanovení aktivity cholinesteras a jejich využití pro diagnostiku patologických stavů. *Česká a slovenská farmacie*. 2017, **66**, 147-153.
- [3] PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica Hradec Králové*. 2004, **47**(4), 215-228.
- [4] SHARMA, Kamlesh. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2019, **20**(2), 1479-1487. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2019.10374.
- [5] NEVŠÍMALOVÁ, Soňa, Jiří TICHÝ a Evžen RŮŽIČKA. *Neurologie*. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-726-2160-2.
- [6] HOŘEJŠÍ, Jaroslav. Symposium 1: Alzheimerova choroba. Praha: Galén, 1999. ISBN 80-7262-025-8.
- [7] PIŤHA, Jiří a Michaela TÝBLOVÁ. *Myastenie – obávaná diagnóza?: vše, co byste měli vědět o své nemoci*. 2. aktualizované a přepracované vydání. Praha: Maxdorf, [2021]. ISBN 978-80-7345-689-4.
- [8] FARMAKIDIS, Constantine, Mamatha PASNOOR, Mazen M. DIMACHKIE a Richard J. BAROHN. Treatment of Myasthenia Gravis. *Neurologic Clinics*. 2018, **36**(2), 311-337. ISSN 07338619. Dostupné z: doi:10.1016/j.ncl.2018.01.011.
- [9] KATZ, Natalie K. a Richard J. BAROHN. The history of acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of myasthenia gravis. *Neuropharmacology*. 2021, **182**, 108303. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108303.

- [10] KORÁBEČNÝ, Jan, Katarína ŠPILOVSKÁ, Ondřej BENEK, Kamil MUSÍLEK, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská farmacie*. 2012, **61**, 210-221.
- [11] MARTIN, Jan, Zuzana KRŠKOVÁ a Jaroslav DUŠEK. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*. 2011, **7**(1), 39-41. Dostupné také z: www.praktickelekarenstvi.cz.
- [12] WINBLAD, Bengt, Ezio GIACOBINI, Lutz FRÖLICH, Lawrence T. FRIEDHOFF, Gosse BRUINSMA, Robert E. BECKER a Nigel H. GREIG. Phenserine Efficacy in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2011, **22**(4), 1201-1208 [cit. 2023-02-09]. ISSN 18758908. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-101311.
- [13] TWEEDIE, David, Koji FUKUI, Yazhou LI, et al. Cognitive Impairments Induced by Concussive Mild Traumatic Brain Injury in Mouse Are Ameliorated by Treatment with Phenserine via Multiple Non-Cholinergic and Cholinergic Mechanisms. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6), e0156493. [cit. 2023-02-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156493.
- [14] VECCHIO, Immacolata, Luca SORRENTINO, Annamaria PAOLETTI, Rosario MARRA a Mariamena ARBITRIO. The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Central Nervous System Disease* [online]. 2021, **13**(2021), 1-13 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1179-5735. Dostupné z: doi:10.1177/11795735211029113.
- [15] Pyridostigmine. *DrugBank online* [online]. Alberta, 2006, 13.6. 2005 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00545>
- [16] Neostigmine (Monograph). *Drugs.com: Know more. Be sure.* [online]. The American Society of Health-System Pharmacist, 2019, 2020 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/neostigmine.html#>
- [17] Neostigmine. *DrugBank online* [online]. Alberta, 2006, 8.7.2007 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01400>

- [18] MORO, Christian, Charlotte PHELPS, Vineesha VEER, Justin CLARK, Paul GLASZIOU, Kari A. O. TIKKINEN a Anna M. SCOTT. The effectiveness of parasympathomimetics for treating underactive bladder: A systematic review and meta-analysis. *Neurourology and Urodynamics* [online]. 2022, **41**(1), 127-139 [cit. 2023-04-30]. ISSN 0733-2467. Dostupné z: doi:10.1002/nau.24839.
- [19] Distigmine. *DrugBank online* [online]. Alberta, 23.6. 2017 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB13694>
- [20] BOLOGNESI, Maria Laura, Andrea CAVALLI, Vincenza ANDRISANO, Manuela BARTOLINI, Rita BANZI, Alessandra ANTONELLO, Michela ROSINI a Carlo MELCHIORRE. Design, synthesis and biological evaluation of ambenonium derivatives as AChE inhibitors. *Il Farmaco* [online]. 2003, **58**(9), 917-928 [cit. 2023-04-30]. ISSN 0014827X. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-827X(03)00150-2.
- [21] Ambenonium. *DrugBank online* [online]. Alberta, 2005, 13.5. 2005 [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01122>
- [22] KRÁTKÝ, Martin, Jarmila VINŠOVÁ a Jiřina STOLARŤIKOVÁ. Antimicrobial activity of rhodanine-3-acetic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017, **25**(6), 1839-1845. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2017.01.045.
- [23] XU, Jian-Fei, Tian-Tian WANG, Qing YUAN, et al. Discovery and development of novel rhodanine derivatives targeting enoyl-acyl carrier protein reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019, **27**(8), 1509-1516. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2019.02.043.
- [24] BHATTI, Ravinder Singh, Sakshi SHAH, SURESH, Pawan KRISHAN a Jagir S. SANDHU. Recent Pharmacological Developments on Rhodanines and 2,4-Thiazolidinediones. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, **2013**, 1-16. ISSN 2090-2069. Dostupné z: doi:10.1155/2013/793260.
- [25] MOUSAVI, Seyyed Mojtaba, Maryam ZAREI, Seyyed Alireza HASHEMI, Aziz BABAPOOR a Ali Mohammad AMANI. A conceptual review of rhodanine: current applications of antiviral drugs, anticancer and antimicrobial activities. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2019, **47**(1), 1132-

1148 [cit. 2023-05-10]. ISSN 2169-1401. Dostupné z:
doi:10.1080/21691401.2019.1573824

- [26] KAMINSKY, Danylo, Anna KRYSHCHYSHYN a Roman LESYK. Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2017, **12**(12), 1233-1252 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1080/17460441.2017.1388370.
- [27] AHN, Jin Hee, Seung Jun KIM, Woul Seong PARK, et al. Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2006, **16**(11), 2996-2999 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2006.02.060.
- [28] PFLÉGR, Václav, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína SVRČKOVÁ, Markéta ŠVARCOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ a Martin KRÁTKÝ. 5-Aryl-1,3,4-oxadiazol-2-amines Decorated with Long Alkyl and Their Analogues: Synthesis, Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition and Docking Study. *Pharmaceuticals*. 2022, **15**(4), 400. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph15040400.
- [29] KAHLMETER, G., D.F.J. BROWN, F.W. GOLDSTEIN, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2006, **12**(6), 501-503 [cit. 2021-5-3]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x.
- [30] KRÁTKÝ, Martin, Klára KONEČNÁ, Kateřina BROKEŠOVÁ, Jana MAIXNEROVÁ, František TREJTNAR a Jarmila VINŠOVÁ. Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **159**, 105732 [cit. 2021-03-15]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2021.105732.
- [31] KRÁTKÝ, Martin, Ondřej JANĎOUREK, Zsuzsa BARANYAI, Eva NOVOTNÁ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Szilvia BŐSZE a Jarmila VINŠOVÁ. Phenolic *N*-monosubstituted carbamates: Antitubercular and toxicity evaluation of multi-targeting compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019,

181, 11578 [cit. 2021-04-21]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2019.111578.

[32] EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing__definitive.pdf [cit. 2021-05-03]

[33] EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf [cit. 2021-05-03]

[34] KAMINSKY, Danylo, Anna KRYSHCHYSHYN a Roman LESYK. 5-Ene-4-thiazolidinones – An efficient tool in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2017, **140**, 542-594 [cit. 2023-05-05]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.031.

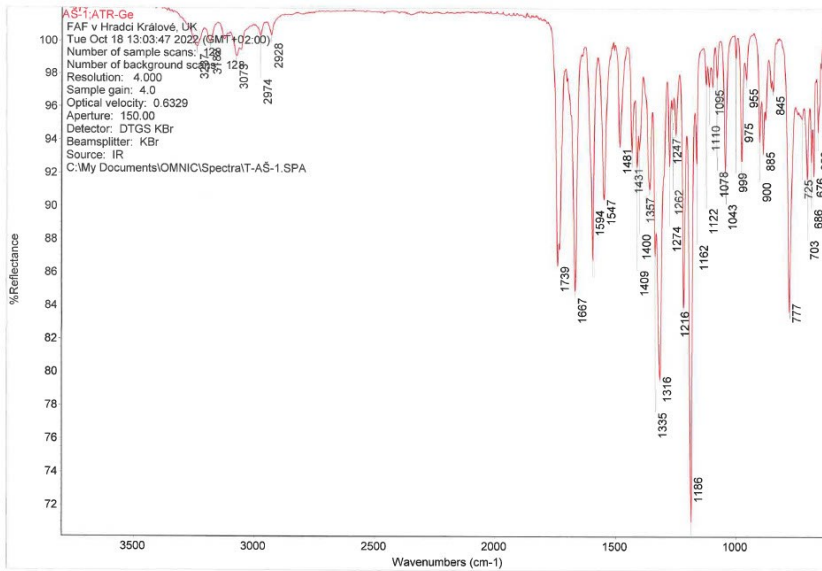
[35] MENDGEN, Thomas, Christian STEUER a Christian D. KLEIN. Privileged Scaffolds or Promiscuous Binders: A Comparative Study on Rhodanines and Related Heterocycles in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **55**(2), 743-753 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm201243p.

[36] TOMAŠIĆ, Tihomir a Lucija PETERLIN MAŠIČ. Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2012, **7**(7), 549-560 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2012.688743.

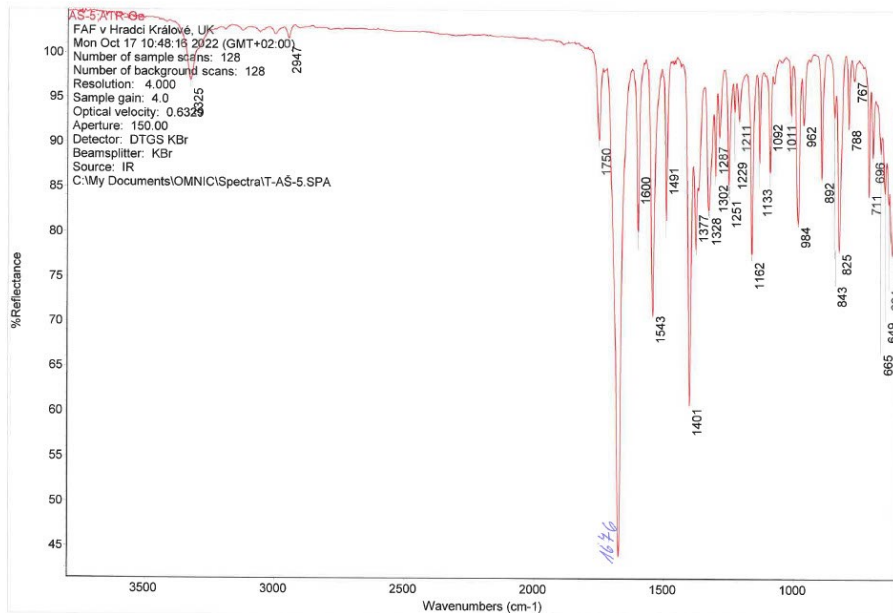
[37] BAELL, Jonathan B. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *Journal of Natural Products* [online]. 2016, **79**(3), 616-628 [cit. 2023-04-30]. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00947.

- [38]** BAELL, Jonathan a Michael A. WALTERS. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* [online]. 2014, **513**(7519), 481-483 [cit. 2023-04-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/513481a.

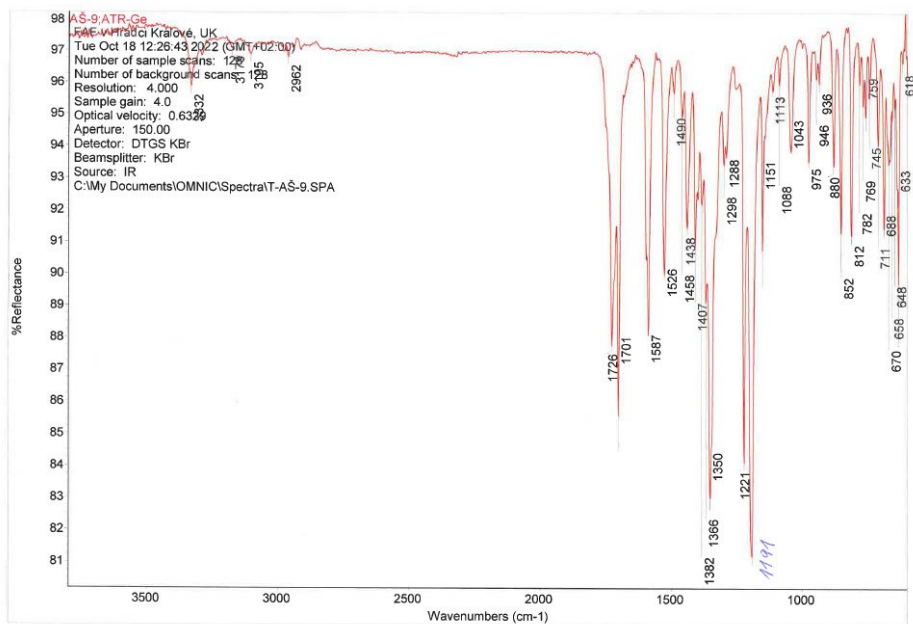
PŘÍLOHA – VYBRANÁ IR SPEKTRA



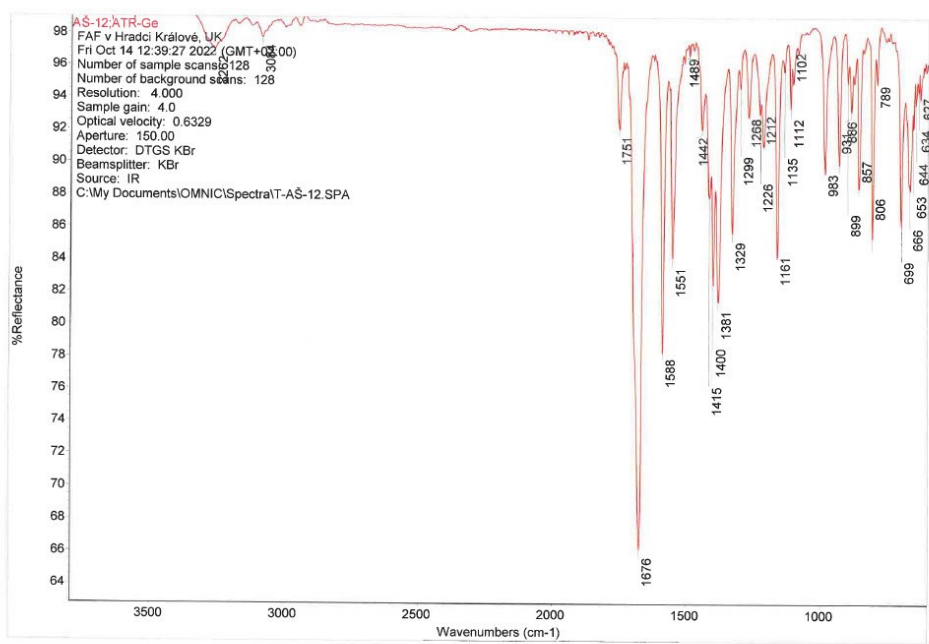
IR spektrum A 1



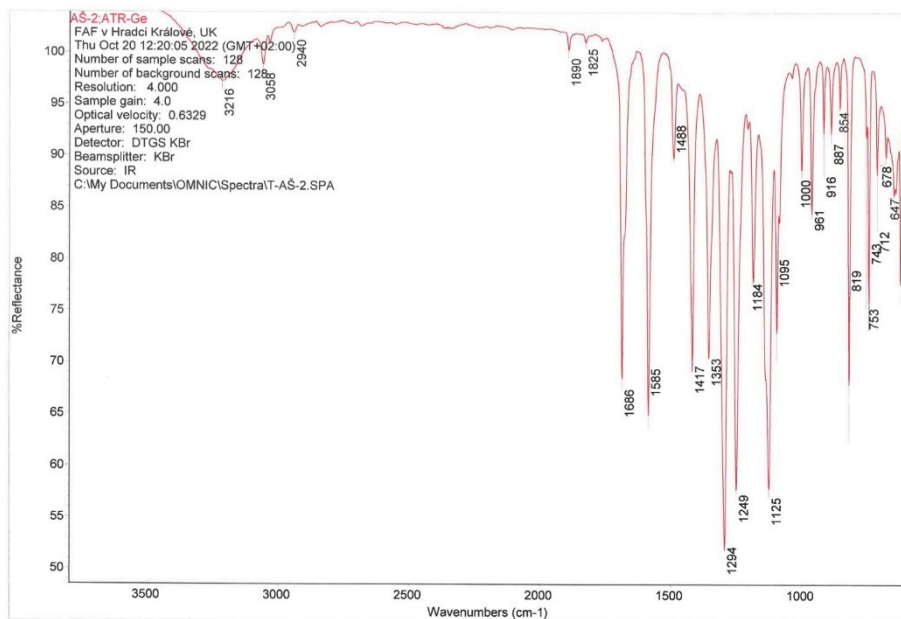
IR spektrum A 4



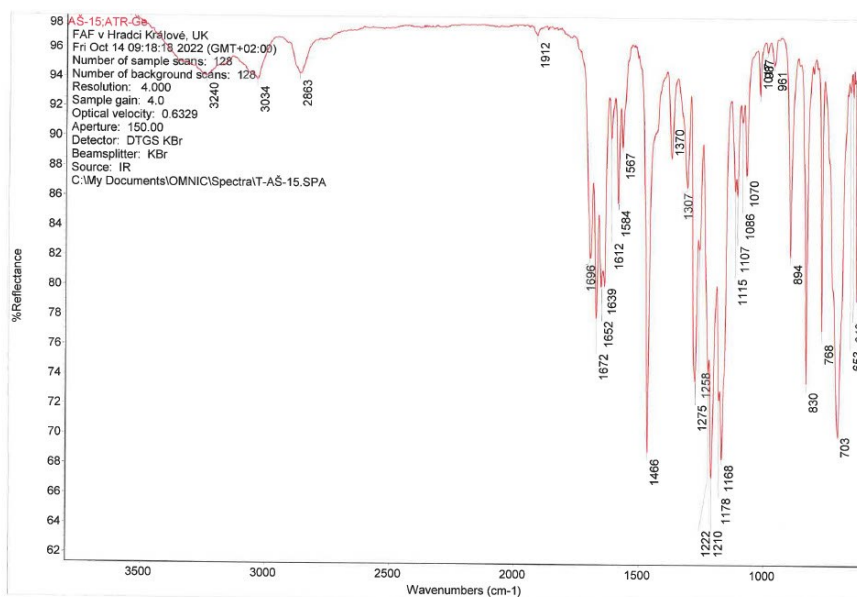
IR spektrum A 7



IR spektrum A 10



IR spektrum K 1



IR spektrum K 3