

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Příprava, zvýšení rozpustnosti a biologická aktivita  
purinových derivátů pro biotechnologické aplikace**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Dardan Klos**  
Studijní program: N1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 4. 8. 2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Dardan Klos
Název práce	Příprava, zvýšení rozpustnosti a biologická aktivita purinových derivátů pro biotechnologické aplikace
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Diplomová práce je zaměřena na syntézu aromatických cytokininů za účelem zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě. Teoretická část zahrnuje nejen zpracování literární rešerše o cytokininech, jejich klasifikaci a biosyntézu, ale také krátký úvod do krystalografie, protože se podařilo v rámci práce určit strukturu několika monokrystalů za pomoci monokrystalové difrakce. V experimentální části bylo připraveno 13 nových látek, které byly charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami a následně byla testována jejich biologická aktivita pomocí kalusového, senescenčního a receptorového biotestu CRE1/AHK4. Vybrané látky byly také podrobeny polnímu experimentu pro účinek na výnos ječmene. Zejména pak byla otestována zlepšená rozpustnost nových látek ve vodě.
Klíčová slova	Aromatické cytokininy, protonizace, rozpustnost
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Dardan Klos
Title of thesis	Synthesis, solubility increase and biological activity of purine derivatives for biotechnological application
Type of thesis	Master
Department	Department of Chemical Biology and Genetics
Supervisor	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Master thesis is focused on aromatic cytokinins for a purpose of increasing their solubility in water. Theoretical part summarizes current knowledge about cytokinins, their classification and biosynthesis but also a short introduction to crystallography because few of newly synthesized compounds were characterized with monocrystal diffraction. In experimental part 13 new compounds were synthesized, characterized with physico-chemical methods and then tested for their biological activity by callus, senescence and CRE1/AHK4 receptor bioassays. Selected substances underwent field experiment and monocrystal diffraction which revealed their structure. Finally water solubility of all newly synthesized compounds was tested.
Key words	Aromatic cytokinins, protonization, solubility
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Bc. Dardan Klos

V první řadě bych chtěl velmi poděkovat vedoucí své diplomové práce doc. Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D. za vysoce odborné vedení, pomoc se zpracováním dat, trpělivost a podporu, RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. za věcné připomínky a cenné rady, a také Mgr. Karlu Doležalovi, DSc. za odborné konzultace a doporučení. Mé poděkování patří také RNDr. Michalu Duškovi, CSc., z FZÚ AV ČR za změření a stanovení struktury dvou derivátů s použitím monokrystalové rtg difrakce a Janu Wallovi za pomoc s rentgenografií a měření metodou tzv. práškové rtg difrakce, Mgr. Haně Omámikové, Ing. J. Kočířové a Mgr. Martinu Hönigovi, Ph.D. za pomoc s hmotnostní spektrometrií, elementární analýzou a nukleární magnetickou rezonancí, a paní Jarmile Balonové a Mgr. Karolíně Wojewodové za vyhotovení cytokininových biotestů. Vřelé poděkování si zaslouží také Ing. R. Koprna, Ph.D. za otestování látek *in vivo* v polním pokusu. V neposlední řadě bych chtěl velice poděkovat své přítelkyni Veronice a rodině, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>Cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
2.1 Cytokininy .....	13
2.2 Biosyntéza a inaktivace cytokininů .....	14
2.3 Inaktivace cytokininů.....	15
2.4 Rozpustnost .....	15
2.4.2 Zvýšení rozpustnosti .....	16
2.5 Krystalografie .....	16
2.6 Krystal a krystalová mřížka .....	17
2.7 Rentgenové záření a princip rtg difrakce .....	19
2.8 Polymorfie.....	20
2.8.1 Krystalizace .....	21
2.9 Cytokininové testy biologické aktivity.....	21
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>22</b>
3.1 Použité chemikálie .....	22
3.2 Metody a přístrojová technika.....	22
3.3 Syntéza.....	23
3.3.1 Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (o-topolin mesylát).....	23
3.3.2 Příprava 6-(3-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (m-topolin mesylát).....	24

3.3.3	Příprava 6-(4-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (p-topolin mesylát).....	24
3.3.4	Příprava 6-(3-methoxy-benzylamino)purin methansulfonátu (m-MeOBAP mesylát).....	25
3.3.5	Příprava 6-benzylaminopurinia methansulfonátu (BAP mesylát) .....	25
3.3.6	Příprava 6-furfurylaminopurin methansulfonátu (kinetin mesylát).....	26
3.3.7	Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin chloridu (o-topolin chlorid) ....	26
3.3.8	Příprava 6-benzylaminopurin chloridu (BAP chlorid) .....	27
3.3.9	Příprava 6-(4-hydroxy-benzylamino)purin chloridu (p-topolin chlorid) ...	27
3.3.10	Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin nitrátu (o-topolin nitrát).....	28
3.3.11	Příprava 6-(3-hydroxy-benzylamino)purin nitrátu (m-topolin nitrát) .....	29
3.3.12	Příprava 6-(4-hydroxybenzylamino)purin nitrátu (p-topolin nitrát).....	29
3.3.13	Příprava 6-(3-methoxy-benzylamino)purin nitrátu (m-MeOBAP nitrát) ..	30
3.4	Postupy krystalizace .....	32
3.4.1	Krystalizace volným vypařováním rozpouštědla za snížené teploty.....	32
3.4.2	Krystalizace přidáním antisolventu .....	32
3.5	Test rozpustnosti výpočtem z kalibrační křivky získané pomocí HPLC .....	32
3.6	Biologické testování .....	33
3.6.1	Inhibice senescence .....	33
3.6.2	AHK4 receptorový test .....	34
3.6.3	Kalusový test.....	35
3.6.4	Polní testování na jarním ječmeni (var. Francin) .....	35
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>36</b>
4.1	Elementární analýza nově připravených látek.....	36
4.2	Porovnání bodů tání .....	37
4.3	Prášková rentgenová difrakce .....	37

4.4	Monokrystalová rentgenostrukturní analýza .....	44
4.4.1	Monokrystalová analýza m-topolin mesylátu .....	44
4.4.2	Monokrystalová struktura o-topolin mesylátu.....	48
4.5	Výsledky biologického testování.....	52
4.5.1	Kalusový test .....	52
4.5.2	Senescenční test .....	53
4.5.3	Receptorový test.....	54
4.6	Výsledky polního testu na jarním ječmeni var Francin .....	59
4.7	Test rozpustnosti pomocí výpočtu z kalibrační křivky .....	60
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>66</b>



## Cíle práce

- 1) Vypracování literární rešerše na téma aromatické cytokininy.
- 2) Syntéza několika aromatických cytokininů a příprava jejich protonizovaných derivátů.
- 3) Charakterizace nově připravených látek pomocí fyzikálně-chemických metod.
- 4) Vytvoření krystalických materiálů a monokrystalů připravených derivátů a jejich detailní charakterizace pomocí nástrojů rentgenové difrakce (monokrystalové a práškové XRPD difrakce).
- 5) Biologická aktivita připravených derivátů *in vitro* a *in vivo* a testy rozpustnosti nově připravených látek.

## Seznam použitých zkratek

cZ	<i>cis</i> -zeatin
tZ	<i>trans</i> -zeatin
iP	N6-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
K	6-furfurylaminopurin (Kinetin)
BAP	6-benzylaminopurin
mT	6-(3-hydroxybenzylamino)purin (meta-topolin)
m-topolin mesylát	6-(3-hydroxybenzylamino)purin methansulfonát
m-topolin nitrát	6-(3-hydroxy-benzylamino)purin nitrát
m-topolin chlorid	6-(3-hydroxy-benzylamino)purin chlorid
o-topolin mesylát	6-(2-hydroxybenzylamino)purin methansulfonát
o-topolin nitrát	6-(2-hydroxybenzylamino)purin nitrát
o-topolin chlorid	6-(2-hydroxybenzylamino)purin chlorid
p-topolin mesylát	6-(4-hydroxybenzylamino)purin methansulfonát
p-topolin nitrát	6-(4-hydroxybenzylamino)purin nitrát
p-topolin chlorid	6-(4-hydroxy-benzylamino)purin chlorid
m-MeOBAP chlorid	6-(3-methoxy-benzylamino)purin chlorid
m-MeOBAP mesylát	6-(3-methoxy-benzylamino)purin methansulfonát
m-MeOBAP nitrát	6-(3-methoxy-benzylamino)purin nitrát
Kinetin mesylát	6-furfurylaminopurin methansulfonát
BAP mesylát	6-benzylaminopurinia methansulfonát
BAP chlorid	6-benzylaminopurin chlorid
BAP nitrát	6-benzylaminopurin nitrát

DMADP	dimethylallyl difosfát
IPT	isopentenyl transferáza
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
LOG	enzymy skupiny LONELY GUY
CKX	cytokinin oxidáza
HK	histidin kináza
DMSO	dimethylsulfoxid
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
XRPD	rentgenová prášková difrakce (X-ray powder diffraction)
API	aktivní farmaceutická substance (active pharmaceutical ingredient)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
NMR	nukleární magnetická rezonance
FZU AV ČR	Fyzikální ústav Akademie věd ČR
RVO	rotační vakuová odparka
RPM	počet otáček za minutu
CRH	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
BBCH	mezinárodní stupnice vývojových a růstových stádií rostliny
GEP	Good Experimental Practise

## 1 Úvod

Většina biologických procesů rostlin je ovlivněna rostlinnými hormony. Mezi širokou škálu fytohormonů patří zejména auxiny, cytokininy, gibberelliny, kyselina salicylová, kyselina jasmonová, strigolaktony, kyselina abscisová, brassinosteroidy, kyselina salicylová a ethylen. Tyto látky se chovají jako signální molekuly, které mají vliv například na růst jednotlivých částí rostliny, buněčnou diferenciaci, odpověď rostliny na biotický a abiotický stres anebo oddálení senescence (O'Brien a Benková, 2013; Guo a Gan, 2005). Jsou to malé organické molekuly s nízkou specifitou účinku a působí ve velmi nízkých koncentracích (Davies, 2004; Harrison, 2012). Za další významný znak fytohormonů lze považovat jejich komplexnost, kdy jsou schopny zároveň působit na různé rostlinné procesy (Pospíšilová, 2003). Jsou známy jejich synergické a antagonistické účinky způsobené kombinací různých hladin odlišných fytohormonů (Macháčková, 1998). Například je velmi dobře znám antagonismus cytokininů a auxinů v růstovém vrcholu rostliny. Auxiny při této tzv. apikální dominanci potlačují v úžlabních pupenech syntézu lokálních cytokininů (Tanaka et al., 2006). Významným znakem rostlinných regulátorů je jejich účinnost ve velmi nízkých až stopových koncentracích, řádově  $10^{-6}$  až  $10^{-12}$  (Luštinec a Žárský, 2003). Nicméně, cytokininové báze nejsou ve vodě dobře rozpustné. Aromatické cytokininy se od svého objevení uplatňují často jako aktivní látky v médiích při mikropropagaci rostlin (Murashige a Skoog, 1962, McGaw a Burch, 1995 nebo Aremu et al., 2012). Pro tyto biotechnologické aplikace je zásadní vyšší rozpustnost daných látek ve vodě – usnadňuje to například manipulaci s látkami či jejich ředění. Navýšením rozpustnosti cytokininů může také samozřejmě dojít ke zvýšení tzv. biodostupnosti daných látek pro rostliny. Velmi významné je zvýšení rozpustnosti při plánovaném použití pro tzv. „chytrá hnojiva“, kde jsou ve směsi s dalšími látkami, například anorganické povahy. Diplomová práce se zabývá zvýšením rozpustnosti zejména aromatických cytokininů ve vodě, což může značně zlepšit jejich aplikaci v biotechnologiích (Plíhalová et al., 2016). Také byla provedena detailní charakterizace nově připravených protonizovaných aromatických cytokininů pomocí monokrystalové a práškové rentgenové difrakce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Cytokininy

Cytokininy patří mezi rostlinné hormony, které se vyznačují především vlivem na buněčnou diferenciaci, dělení buněk, oddálení senescence a tvorbu adventivních pupenů (Davies et al., 2010). Je známo, že cytokininy se vyskytují v rostlině v řádu ng/g rostlinné hmoty (Tarkowski et al., 2004). Působí tedy ve velmi nízkých koncentracích. Důležitým faktorem růstu a vývoje rostlin je vzájemný poměr množství cytokininů a dalších fytohormonů, auxinů v rostlině. Pokud se cytokininy vyskytují v rostlině ve vyšší koncentraci než auxiny, dochází k vyšší podpoře růstu nadzemní části rostliny. Pokud převyšují auxiny, dochází k vyššímu růstu kořenových systémů (Davies et al., 2010).

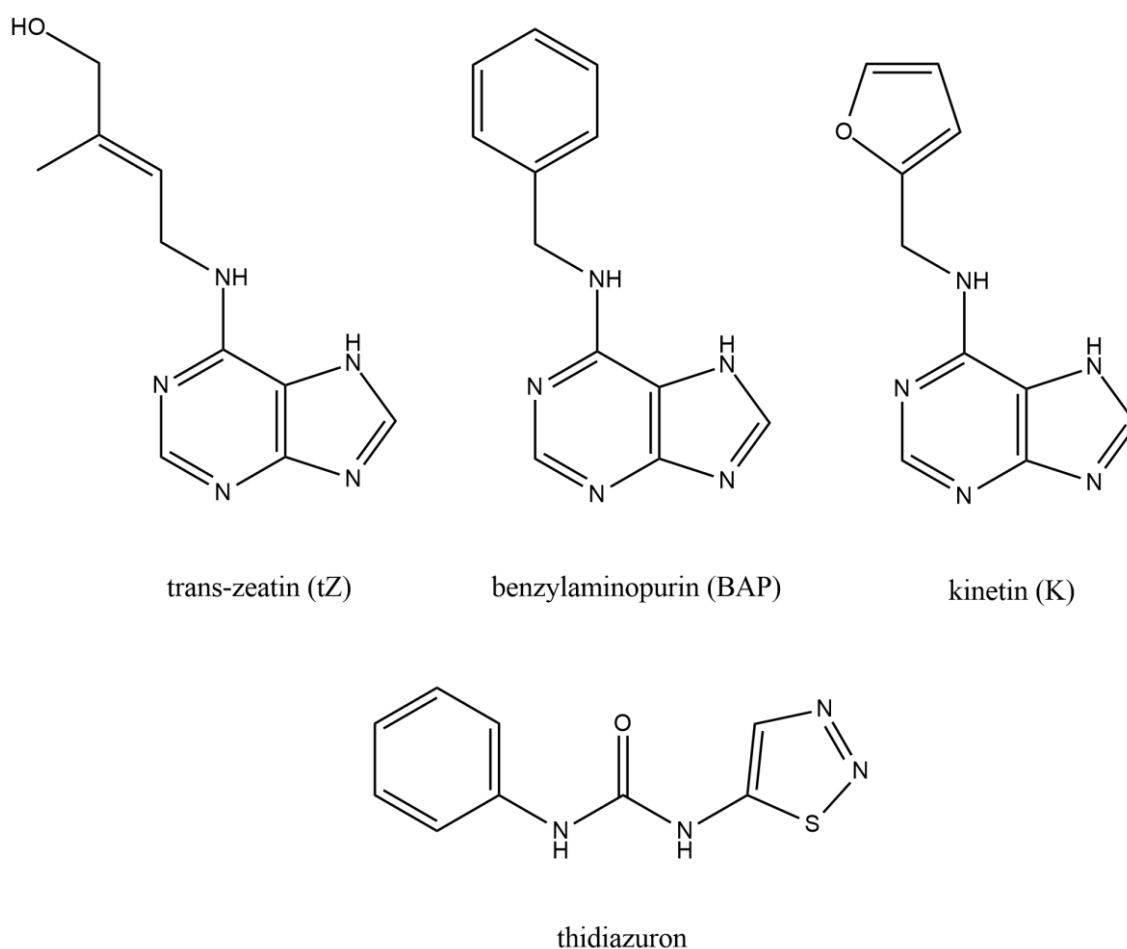
První objevený cytokinin, 6-furfurylaminopurin, nazvaný kinetin, byl popsán v roce 1955 v autoklávované sledí DNA (Miller et al., 1955, 1956). Až o mnoho let později následovala izolace prvního přirozeně se vyskytujícího cytokininu, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purinu (*trans*-zeatinu), z endospermu kukuřice *Zea mays*, a to v roce 1963 (Letham, 1963).

Cytokininy se z chemického hlediska dělí na purinové, kdy strukturním základem je aminopurin, na který je vždy na atomu N6 navázán aromatický či isoprenoidní substituent (Spíchal, 2012). Dále známe také cytokininy syntetické, které mají ve své struktuře jako základ močovinu. Cytokininy tedy rozdělujeme v zásadě na tři skupiny, viz obr. 1. První skupinou jsou cytokininy isoprenoidní, patří mezi ně například *trans*-zeatin, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-*cis*-2-enylamino)purinu *cis*-zeatin (cZ) či N6-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP). Zeatin se může vyskytovat v přírodě ve dvou geometrických izomerech díky přítomnosti dvojně vazby v postranním řetězci. *Cis*-zeatin byl objeven pouze u některých typů rostlin, například v semenech cizrny (*Cicer arietinum*), ale v těchto rostlinách je více abundantní než jeho druhá izomerní forma – *trans*-zeatin (tZ) (Emery et al., 1998; Gajdošová et al., 2011). Naopak tZ je aktivní izomer ve všech rostlinách a používá se také při biologickém testování jako srovnávací látka.

Druhou skupinu tvoří cytokininy aromatické. Patří sem zejména 6-benzylaminopurin (BAP), dále například 6-(3-hydroxybenzylamino)purin (meta-topolin, mT) či 6-furfurylaminopurin (Kinetin, K). Jako aromatický substituent se zde vyskytuje benzylový kruh (topoliny) nebo furfuryl (K). Problematická

je jejich rozpustnost ve vodě, která je způsobena jejich lipofilní povahou.

Do třetí skupiny výše zmíněných syntetických cytokininů s močovinným základem patří například 1-fenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina (thidiazuron) nebo N-fenyl-N'-2-chloro-4-pyridylmočovina (pyridilmočovina).



Obr. 1: Strukturální reprezentace trans-zeatinu, benzylaminopurinu, kinetinu a thidiazuronu

## 2.2 Biosyntéza a inaktivace cytokininů

V přírodě se vyskytující cytokininy jsou zpravidla adeninové deriváty s isoprenoidním postranním řetězcem připojeným na atomu N6 adeninu. Ve vyšších rostlinách se vyskytuje v nejvyšším množství *trans*-zeatin. Cytokininy jsou aktivní jako volné báze (Hothorn et al., 2011; Lomin et al., 2015), avšak mohou se vyskytovat také ve formě různých konjugátů, například ribosidů, kdy k cytokininu je nejčastěji přes N9 atom připojena ribóza, anebo ve formě ribotidů, ve kterém je na ribosid napojena nejméně jedna fosfátová skupina.

Biosyntéza je zahájena adicí 3-methylbut-2-en-1-ylu, odebraného z dimethylallyl difosfátu (DMADP), na atom N6 adenosindifosfátu (ADP) či adenosintrifosfátu (ATP). Tato reakce je katalyzována pomocí isopentenyl transferázy (IPT) (Sakakibara, 2006). Vzniklé iP ribotidy mohou být hydroxylovány na isoprenoidním řetězci pomocí cytochromu P450 (CYP735A1 a CYP735A2) na cytokininy *trans*-zeatinového typu (Takei et al., 2004b). Aktivní formy cytokininů (volné báze) vznikají pomocí katalýzy enzymů LONELY GUY (LOG) odštěpením cukerných zbytků (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009). Syntéza aromatických cytokininů zatím není zcela objasněna (Kieber et al., 2018).

### 2.3 Inaktivace cytokininů

Existují dvě různé cesty inaktivace cytokininů. První cestou je degradace pomocí cytokinin oxidáz (CKX), které odštěpí postranní řetězec na atomu N6 adeninu (Werner et al., 2006). Druhou možností je konjugace volných bází s jednoduchými cukry, nejčastěji s glukózou. Tato konjugace může probíhat dvěma způsoby. N-glukosylací na N7 atomu purinu nebo N9 atomu purinu, která je ireverzibilní. Další možností je ještě adice glukózy na kyslíkový atom hydroxyly v substituentu v poloze C6 purinu a vznik reversibilního O-glukosidu.

Stěžejními enzymy, jenž se účastní N-glukosylace, jsou glukosyltransferázy využívající uridin difosfát glukózu a uridin trifosfát glukózu jako glukosylové donory (Spíchal, 2012). O-glukosylace přes kyslík v isoprenoidním řetězci cytokininu je reverzibilní pomocí  $\beta$ -glukosidáz (Brzobohatý et al., 1993). Tato vratná forma glukosylace je tedy možností, jak dočasně snížit množství aktivních forem isoprenoidních a aromatických cytokininů v rostlině. Mezi enzymy účastnící se reverzibilní deaktivace cytokininů jsou řazeny O-glukosyltransferázy a O-xylosyltransferázy (David W. S. Mok et al., 2001). Cytokininy, takto napojeny na glukózové jednotky, jsou inaktivní v cytokininových biotestech a také nejsou schopny se vázat na histidin kinázové (HK) cytokinové receptory (Spíchal et al., 2004).

### 2.4 Rozpustnost

Problémem aromatických cytokininů pro použití v biotechnologiích, zejména v mikropropagaci rostlin, je jejich nízká rozpustnost ve vodě. Tuto vlastnost ovlivňuje aromatické jádro purinu, ale taky hydrofobicita postranních řetězců (David W. S. Mok, 1994). Zvýšením rozpustnosti ve vodě by se značně ulehčilo také jejich použití v

rostlinných hnojivech, kdy většina nerozpustných látek se nejprve rozpouští v DMSO a následně ředí do vody. Stejně se postupuje i při testování biologické aktivity těchto derivátů. Bohužel použití DMSO jako vehikula může také přinášet nevýhody. Bylo zjištěno, že DMSO může nepřímo zvyšovat množství prolinu v rostlinných buňkách, jelikož ovlivňuje množství reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v rostlině (Zhang et al., 2016). Prolin je multifunkční aminokyselina, jejíž nahromadění v rostlinných buňkách poukazuje například na biotický a abiotický stres v rostlině (Szabados et al., 2010). Zvýšením rozpustnosti aromatických cytokininů ve vodě by bylo možné se vyhnout použití tohoto rozpouštědla a vyhnout se tedy i některým jeho negativním účinkům na rostlinu.

#### 2.4.2 Zvýšení rozpustnosti

Tato práce navazuje na bakalářskou práci „Příprava a vlastnosti vybraných protonizovaných cytokininů“ (Klos, 2018), přičemž využívá podobné principy rozpouštění látek převedením cytokininových bází na několik solí minerálních kyselin. Dochází k protonizaci vybrané cytokinové báze. Tato diplomová práce rozšiřuje spektrum aromatických cytokininů, které byly převedeny na jejich rozpustnější, protonizované soli, zkoumá jejich rozpustnost, fyzikálně chemické a krystalografické vlastnosti a zejména výrazně rozšiřuje spektrum použitých kyselin. Tím dochází i k přípravě několika významně účinných a velmi dobře rozpustných derivátů.

### 2.5 Krystalografie

Každá chemická sloučenina je schopna existovat ve čtyřech různých stavech – pevném, kapalném, plynném a plazmatu. V plynném stavu má systém vysokou tepelnou energii a molekuly se chovají takřka nezávisle. Pokud dojde k ochlazení, sníží se celková energie systému a začnou se uplatňovat vazby mezi molekulami, například slabé vazebné interakce, které jsou však nestálé – v tomto případě mluvíme o kapalném stavu. Jakmile dojde k většímu ochlazení, začínají být veškeré vazby v systému stálé a mluvíme o pevném stavu. Uspořádání molekul v látce může být buď pravidelné – krystalický stav, anebo nepravidelné – amorfní stav (Valvoda, 1992).



## 2.6 Krystal a krystalová mřížka

Krystal je homogenní anizotropní prostředí s ostrým bodem tání a trojrozměrně periodickým uspořádáním stavebních částic, tzv. motivem. Stavba krystalu je dána chemickým složením látky a také prostorovými vlastnostmi molekul dané látky. Každou strukturu krystalu lze vytvořit pouze periodickým opakováním jejího motivu. Motiv může být periodicky opakován různými mechanismy – translací (posunutím), otáčením, zrcadlením, či kombinací těchto mechanismů.

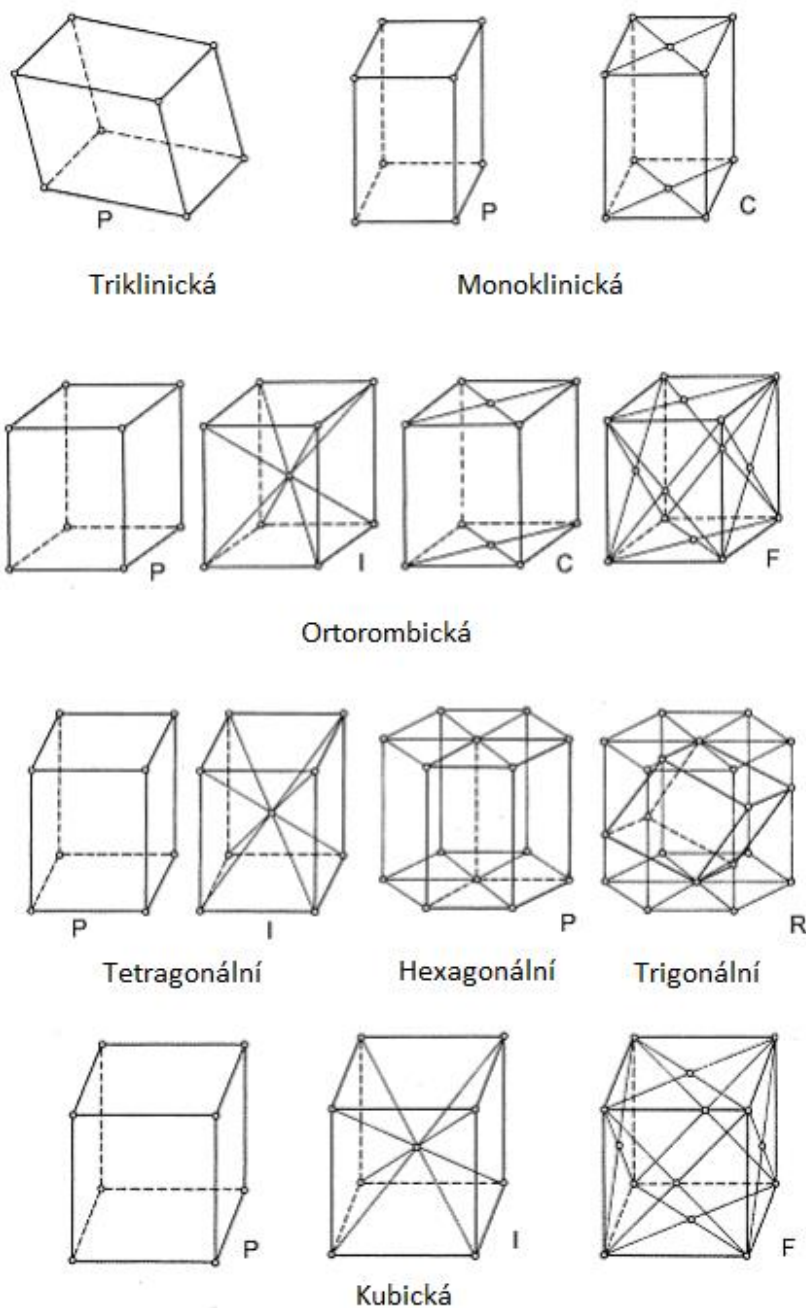
Polykrystalické látky se skládají z většího množství malých krystalů tzv. monokrystalů s velikostí částic přibližně 10  $\mu\text{m}$  až několik milimetrů. Uvnitř monokrystalů je pravidelné uspořádání částic, avšak jednotlivé monokrystaly jsou v polykrystalické látce orientovány zpravidla náhodně – makroskopická izotropie. V případě, že monokrystaly nejsou orientovány náhodně, mluvíme o textuře materiálu, a tedy mírné anizotropii. Monokrystal má tedy v celém svém objemu jediný opakující se strukturální motiv a je anizotropní (Kraus, 1985).

Pokud chceme určit krystalovou strukturu, musíme znát krystalovou mřížku, což je periodické uspořádání množiny abstraktních bodů v prostoru. Krystalická mřížka má tzv. mřížkové parametry, což jsou tři vektory ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) a tři úhly ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Z těchto parametrů může být určena elementární buňka. Elementární buňka je část, ze které je možné určit celou krystalickou mřížku a pokud známe motiv (atomy, ionty či molekuly), může být popsána celá krystalická struktura. Existují čtyři typy elementárních buněk: primitivní (P), bazálně centrovaná (A, B, C), plošně centrovaná (I) a prostorově centrovaná (F). Spolu se sedmi typy krystalových mřížek tvoří soubor čtrnácti Bravaisových mřížek, které popisují způsoby, jak v prostoru uspořádat atomy, ionty nebo molekuly se současným maximálním zachováním symetrie, viz tab. 1 a obr. 2.

Tab. 1: Bravaisovy mřížky a jejich mřížkové parametry

Krystalová soustava	Mřížkové parametry		Typy elementární buňky
Kubická	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, I, F
Tetragonální	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, I
Ortorombická/kosočtverečná	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	P, I, F, C
Hexagonální	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	P
Trigonální	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	P

Krystalová soustava	Mřížkové parametry	Typy elementární buňky
Monoklinická/jednoklonná	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$	P, C
Triklinická/trojklonná	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	P



Obr. 2: Bravaisovy prostorové mřížky a krystalové soustavy (Převzato a upraveno z Hanzlíková, 2014).

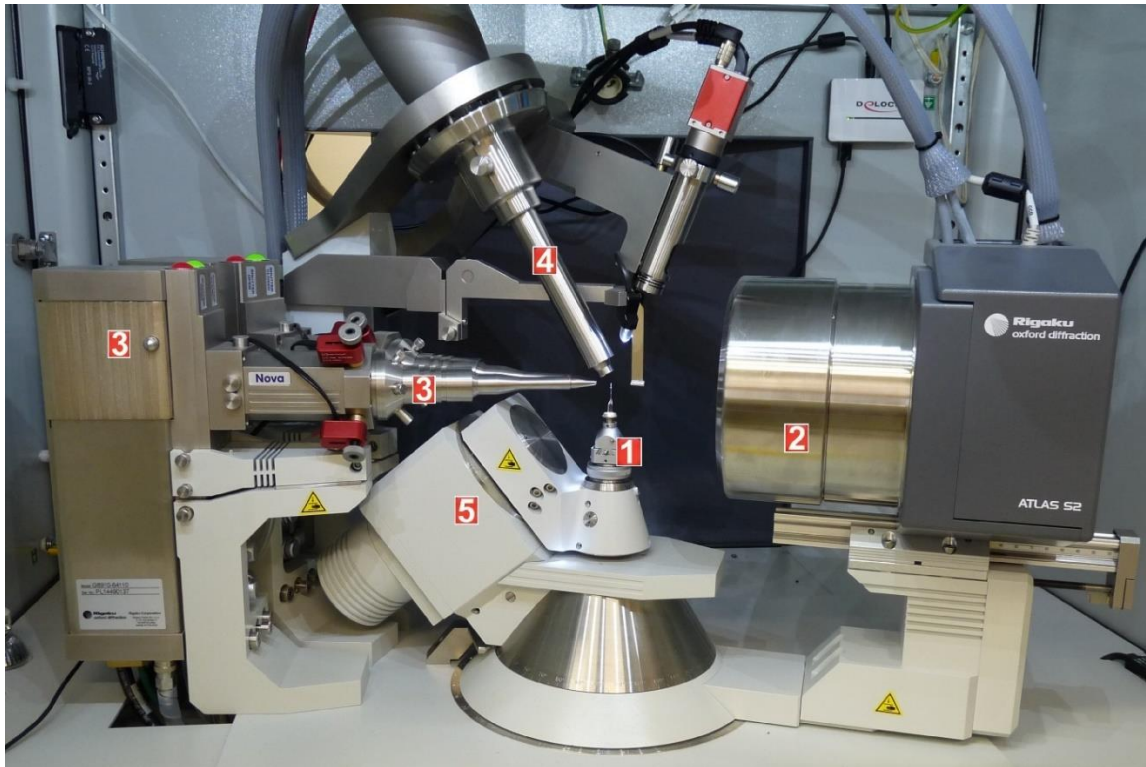
## 2.7 Rentgenové záření a princip rtg difrakce

Rentgenové záření je druh elektromagnetického ionizujícího záření s vlnovými délkami od 10 nm až 1 pm, které se kromě lékařských aplikací (diagnostika) využívá v krystalografii. Rentgenové záření vzniká dopadem elektronů o vysoké energii na vhodný materiál, nejčastěji např. měď nebo kobalt (Röntgen, 1896). Pokud má elektron dostatečně vysokou energii, je schopen vyrazit elektron z vnitřní vrstvy orbitalu atomu příslušného kovu. Tento vyražený elektron je okamžitě doplněn elektronem z vyšší vrstvy, a tedy vyšší energií než původní a tento energetický rozdíl je vyzářen v podobě charakteristického rtg záření. Jakmile dopadne rentgenové záření na krystal, dochází k difrakci záření. Musí být splněna difrakční podmínka, která říká, že dráhový rozdíl mezi paprsky monochromatického záření rozptylujícími se na různých rovinách  $hkl$  se vzájemnou vzdáleností  $d$ , dopadajícími na ně pod úhlem  $\vartheta$  musí být celistvý násobek jejich vlnové délky  $\lambda$ . Podmínku difrakce vyjadřuje Braggova rovnice:

$$2d \cdot \sin \theta = n\lambda$$

U rentgenové práškové difrakce (XRPD) je tato podmínka splněna, pokud je poloha jednotlivých krystalů zcela náhodná. Této podoby lze snadno docílit rozetřením vzorku v misce s tloučkem, čímž dojde k eliminaci přirozené textury dané látky. S určitou pravděpodobností budou některé krystaly orientovány tak, že roviny  $hkl$  budou v difrakční poloze. Tato pravděpodobnost se zvyšuje se zvyšujícím se objemem měřeného vzorku. Tímto způsobem vzniká difrakční záznam neboli difraktogram, na kterém lze vidět intenzity difrakce v závislosti na poloze detektoru. Každá látka nebo její alotropická modifikace či polymorfie má jiný difraktogram. Rentgenová prášková difrakce (XRPD) slouží tedy jako rychlá metoda ke kvalitativní analýze látky.

V případě rtg difrakce na monokrystalech je měřen pouze jeden monokrystal o velikosti od 100  $\mu\text{m}$  do 1 milimetru. Ten je upevněn na skleněném vlasu na goniometrické hlavičce a vykonává rotační či oscilační pohyb, při kterém na něho dopadá rentgenové záření, viz obr 3. Vznikají obvykle 2D snímky zobrazující jednotlivé difrakce, které jsou následně programem zpracovány pro výpočet 3D modelu molekul (Graaf a McHenry, 2007).



Obr. 3: Difraktometr Supernova z FZÚ použitý k měření monokrystalů; 1 – Goniometrická hlavička se skleněným vlasem na níž je nalepen vzorek; 2 – Plošný detektor difraktovaného záření Atlas S2; 3 – Měděná rentgenová lampa a kolimátor rentgenového záření; 4 – Chladič na plynný dusík; 5 – Goniometr pro natáčení vzorku do difrakční polohy

## 2.8 Polymorfie

Schopnost molekul, iontů či atomů krystalovat v různých krystalových modifikacích se nazývá polymorfie. Tyto polymorfy se mohou výrazně lišit ve svých vlastnostech, například v barvě, teplotě tání, stabilitě, biodostupnosti, rozpustnosti a rychlosti rozpouštění či toxicitě. Ve farmacii jsou kladeny vysoké nároky na stabilitu daného polymorfu, jenž má sloužit k výrobě léčiva. Pomocí polymorfů se však mohou vyhnout některé firmy (generické) patentové kolizi. Jakmile firma (originátor) připraví nějakou novou látku, snaží se připravit také veškeré polymorfie dané látky a rovněž je kryt patentem. Registrovaná látka obsahuje API (aktivní farmaceutickou substanci neboli léčivou látku) v přesně definované fyzikální i chemické formě. K rozlišení těchto polymorfismů se používá nejčastěji rentgenová prášková difrakce, rentgenová difrakce monokrystalů nebo také různé druhy molekulové spektroskopie (B. Kratochvíl et al, 2016).

### 2.8.1 Krystalizace

Krystalizace z roztoku je separační metoda, ve které je oddělena pevná fáze od matečného roztoku. Tento proces musí být pečlivě kontrolován, aby bylo dosaženo určitých požadavků na tvar krystalů, velikost, stupeň shlukování, stabilitu a čistotu. Docílit krystalizace je možno několika různými způsoby. Ideální je okamžitá krystalizace precipitací po přidání reaktantu. V každém případě je vhodné vycházet z homogenního, nasyceného roztoku. Krystalizace pro získání monokrystalů je proces, který vyžaduje často čas v řádu dnů až týdnů. Jedná se například o postupné vypařování rozpouštědla, ideálně za snížené teploty. V neposlední řadě je nutno uvést krystalizaci přidáním antisolventu neboli rozpouštědla, ve kterém je cílová látka nerozpustná. Je možná i kombinace více způsobů. Byl například navržen tzv. multifunkční krystalizátor (Westhoff et al., 2000).

## 2.9 Cytokininové testy biologické aktivity

Pomocí testů biologické aktivity jsme schopni hodnotit účinek nově syntetizovaných látek na rostliny a tuto aktivitu porovnat s původními látkami. V této diplomové práci byly látky hodnoceny pomocí tří biotestů, které mají ukazovat míru cytokininové aktivity – kalusového, senescenčního a CRE1/AHK4 receptorového testu.

V případě kalusového biotestu byl sledován účinek nových látek na buněčný růst nediferenciovaného pletiva *Nicotiana tabacum* (T. Murashige, 1962).

Senescenční biotest je prováděn na sedmidenních listech pšenice (*Triticum aestivum* L.), která je pěstována za definovaných podmínek. List je po zastřížení vložen do roztoku testované látky o určité koncentraci a ponechán ve tmě. Po 5-7 dnech od založení testu je porovnávána koncentrace chlorofylu v jednotlivých listech s kontrolou ponořenou pouze do vody a standardem (roztok BAP). Koncentrace chlorofylu je měřena spektrofotometricky (J. Holub, 1998).

Pomocí kvalitativního receptorového testu byly nově připravené látky otestovány na schopnost aktivovat cytokininový receptor CRE1/AHK4 nesený vektorem pNIII, který je transformován do bakterií *Escherichia coli*. Tento receptor je lokalizován na plazmatické membráně a v endoplazmatickém retikulu rostlinných buněk, kde tvoří dimery. Funkčně se jedná o histidinkinázy. V tomto transgenním kmeni *Escherichii coli* je konstitutivně exprimován fúzní gen *cps::lacZ* a cytokininový receptor. Jakmile testovaná látka stimuluje receptor, dochází k transdukci signálu, a tedy expresi LacZ

genu, který obsahuje sekvenci pro tvorbu  $\beta$ -galaktosidázy, která je následně stanovena pomocí chromogenního či fluorogenního substrátu.

### **3 Experimentální část**

#### **3.1 Použité chemikálie**

K přípravě látek byly použity následující chemikálie: 35% kyselina chlorovodíková a 65% kyselina dusičná od firmy Penta s.r.o. 99,5% kyselina methansulfonová byla zakoupena u firmy HoneyWell Fluka. Methanol a isopropanol byly zakoupeny od firmy Lach-ner s.r.o. Deriváty cytokininů: chlorid 6-(3-methoxy-benzylamino)purinia (m-MeOBAP), chlorid 6-(3-hydroxybenzylamino)purinia (m-topolin) a nitrát 6-benzylaminopurinia (BAPNO<sub>3</sub><sup>-</sup>) byly připraveny v rámci Bakalářské práce (Klos, 2018). Všechny ostatní báze byly poskytnuty firmou OlChemIm s.r.o.

#### **3.2 Metody a přístrojová technika**

Elementární analýza C, H, N připravených produktů byla stanovena pomocí analyzátoru Thermo Finnigan Flash EA1112. EA byla stanovena Ing. J. Kočířovou.

Bod tání byl měřen na přístroji Büchi Melting Point B-540. Základní teplota byla nastavená na 100 °C. Měření probíhalo ve skleněné tyčince při gradientu 3 °C/min.

Před testem rozpustnosti bylo nutno přesycené roztoky zfiltrovat pomocí metody centrifugace microspin. Byla použita plastová zkumavka typu eppendorf s póry o 2  $\mu$ m, do které byl vložen vzorek a centrifuga Eppendorf 5415R.

V testu rozpustnosti výpočtem z kalibrační křivky plochy píků HPLC byl použit systém Waters Alliance 2695 Separations Module na koloně C18 Symmetry o průměru 2,1 mm a délky 150 mm s pórovitostí 5  $\mu$ m. Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi (mravenčan amonný:methanol v poměru 9:1). Následně byl vzorek promýván methanolickým gradientem (10 – 90 % 26 minut) při pH 4 a průtoku 0,3 ml/min. Absorbance složek byly detekovány v oblasti UV při vlnové délce 210 – 400 nm detektorem Waters 2996 PDA detector. Eluát byl použit ke stanovení molekulové hmotnosti látek metodou LC-MS za použití ionizace pomocí ESI v negativním i pozitivním módu. Iontový zdroj byl vyhříván na teplotu 120 °C, desolvatační teplota byla 300 °C. Jako zmlžovací a desolvatační plyn byl použit dusík. Napětí na kapiláře činilo 3 keV a

napětí na vstupní štěrbině 20 V. Měření proběhlo v rozsahu m/z 50-400. Čistota látek, MS a rozpustnost byla měřena Mgr. H. Omámikovou.

K ověření chemické individuality byl využit NMR spektrometr - JEOL 500 ECA, kalibrace posunu na zbytkový pík rozpouštědla v  $^1\text{H}$  DMSO- $d_6$  2,50 ppm. Spektra byla analyzována s pomocí Mgr. M. Höniga, PhD.

Prášková rentgenová difrakce (XRPD) byla měřena za laboratorní teploty na přístroji Bruker D8 Advance ECO s rentgenovým zářením typu CuKAlpha a detektorem SSD 160. Měření bylo provedeno za asistence Ing. J. Wally.

Ke stanovení struktury vybraných látek pomocí rentgenové difrakce na monokrystalech byl použit čtyřkruhový difraktometr Supernova s plošným detektorem Atlas. Pro měření byla použita měděná lampka s rentgenovým zářením o vlnové délce 1.54184 Å, kolimované pomocí tenkovrstvých zrcadel (Cu Enhance Ultra) do tloušťky paprsku 0,3 mm. Monokrystalová data byla změřena na pracovišti FZÚ AV ČR RNDr. M. Duškem, CSc. a jeho spolupracovníky.

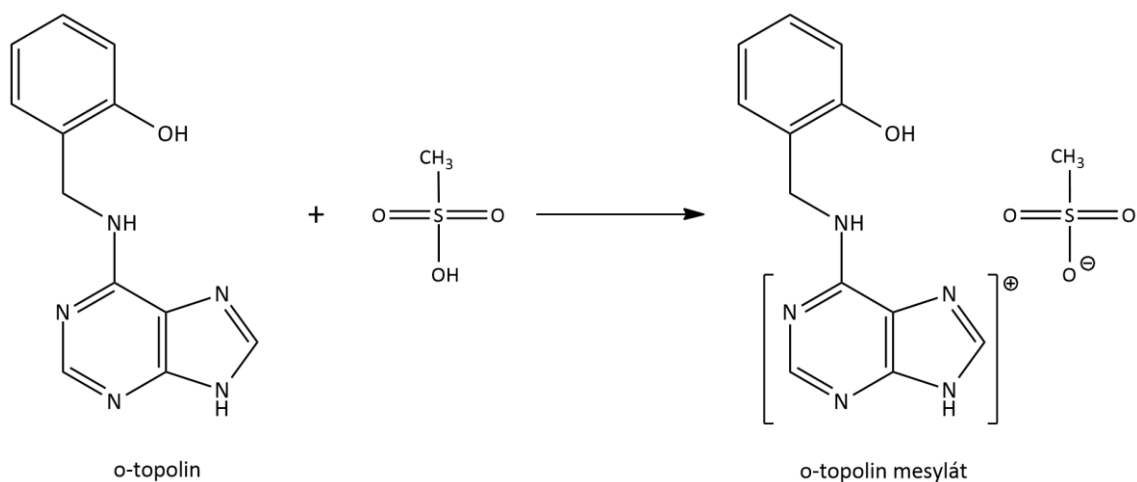
### 3.3 Syntéza

#### 3.3.1 Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (o-topolin mesylát)

Protonizace proběhla dle schématu 1. Do 30 ml methanolu bylo přidáno 300 mg 2-hydroxy-benzylaminopurinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 81  $\mu\text{l}$  kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 383 mg.

Výtěžek o-topolin mesylátu: 91,19 %, HPLC: >99 %, Mr = 337,51; MS  $[\text{M}+\text{H}^+] = 242,18$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  9.27 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.18 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.14 – 7.07 (m, 1H), 6.83 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.74 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.69 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).



*Schéma 1: Příprava mesylátu 2-hydroxy-benzylaminopurinia*

### 3.3.2 Příprava 6-(3-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (m-topolin mesylát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 1. Do 30 ml methanolu bylo přidáno 300 mg 6-(3-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 81 µl kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 356 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek m-topolin mesylátu: 84,76 %, HPLC: >99 %, Mr = 337,51; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,18

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.55 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.28 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.00 – 6.94 (m, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

### 3.3.3 Příprava 6-(4-hydroxybenzylamino)purin methansulfonátu (p-topolin mesylát)

Protonizace byla provedena dle návodu popsaného RNDr. Markem Zatloukalem v podané, ale doposud nezveřejněné patentové přihlášce a proběhla stejným způsobem jako na schématu 1. Do 30 ml methanolu bylo přidáno 300 mg 6-(4-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C



přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 81  $\mu$ l kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 374 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek p-topolin mesylátu: 89,05 %, HPLC: >99 %, Mr = 337,51; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,18

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.29 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.73 (d, 2H), 2.08 (s, 3H).

#### 3.3.4 Příprava 6-(3-methoxy-benzylamino)purin methansulfonátu (m-MeOBAP mesylát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 1. Do 30 ml methanolu byl přidán 300 mg 6-(3-methoxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 76  $\mu$ l kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 372 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek m-MeOBAP mesylátu: 90,15 %, HPLC: >99 %, Mr = 351,01; MS [M+H<sup>+</sup>] = 256,25

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.59 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.42 – 2.33 (m, 4H).

#### 3.3.5 Příprava 6-benzylaminopurinia methansulfonátu (BAP mesylát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 1. Do 50 ml methanolu byl přidán 1 g 6-benzylaminopurinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 289  $\mu$ l kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu.

Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 100 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 958 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek BAP mesylátu: 67,07 %, HPLC: >99 %, Mr = 321,11; MS [M+H<sup>+</sup>] = 226,16

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.66 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.40 – 7.29 (m, 5H), 7.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.80 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H).

### 3.3.6 Příprava 6-furfurylaminopurin methansulfonátu (kinetin mesylát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 1. Do 50 ml methanolu byl přidán 300 mg 6-furfurylaminopurinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 91 µl kyseliny methansulfonové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 349 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek kinetin mesylátu: 80,30 %, HPLC: >99 %, Mr = 311,11; MS [M+H<sup>+</sup>] = 216,19

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.53 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.45 (s, 2H), 4.85 (s, 2H), 2.40 – 2.34 (m, 3H).

### 3.3.7 Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin chloridu (o-topolin chlorid)

Protonizace proběhla dle schématu 2. Do 50 ml methanolu byl přidán 300 mg 6-(2-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 104 µl 37% kyseliny chlorovodíkové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 324 mg.

Výtěžek o-topolin chloridu: 94,04 %, HPLC: >99 %, Mr = 277,86; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,15

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  9.74 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.15 – 7.09 (m, 1H), 6.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.76 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.76 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H).

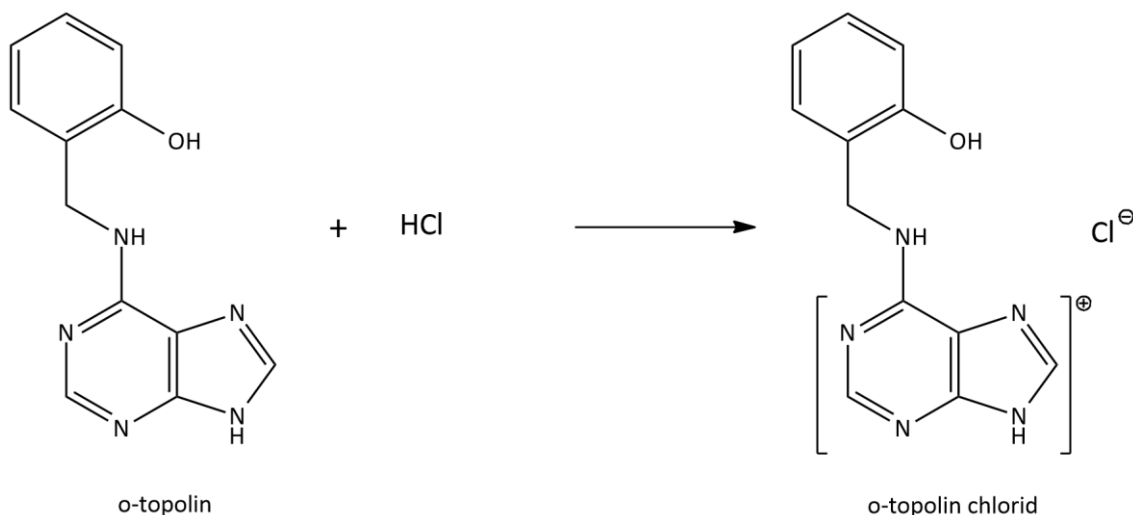


Schéma 2: Příprava chloridu 2-hydroxy-benzylaminopurinia

### 3.3.8 Příprava 6-benzylaminopurin chloridu (BAP chlorid)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 2. Do 50 ml methanolu byl přidán 210 mg 6-benzylaminopurinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C v teplé lázni přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 78  $\mu\text{l}$  37% kyseliny chlorovodíkové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 198 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek BAP chloridu: 81,14 %, HPLC: >99 %,  $M_r = 261,46$ ; MS  $[M+H^+] = 226,16$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  10.06 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.43 – 7.31 (m, 5H), 7.29 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.86 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H).

### 3.3.9 Příprava 6-(4-hydroxy-benzylamino)purin chloridu (p-topolin chlorid)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 2. Do 50 ml methanolu byl přidán 300 mg 6-(4-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 104  $\mu\text{l}$  37% kyseliny

chlorovodíkové. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 323 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek p-topolin chloridu: 93,75 %, HPLC: >99 %, Mr = 277,86; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,18

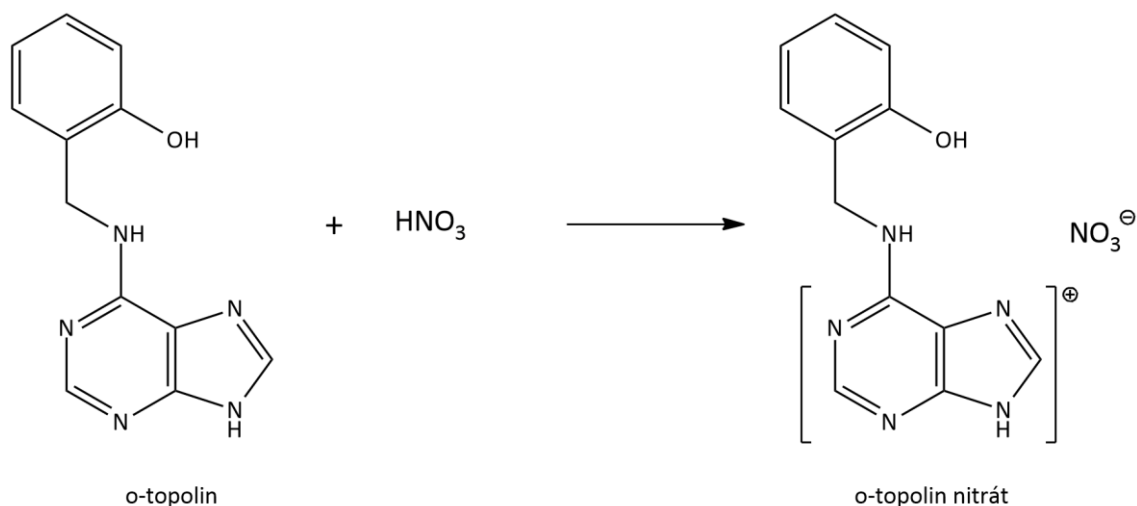
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.80 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H).

### 3.3.10 Příprava 6-(2-hydroxybenzylamino)purin nitrátu (o-topolin nitrát)

Protonizace proběhla dle schématu 3. Do 50 ml methanolu byl přidán 300 mg 6-(2-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 88 μl 67% kyseliny dusičné. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 317 mg.

Výtěžek o-topolin nitrátu: 83,98 %, HPLC: >99 %, Mr = 304,41; MS [M-H<sup>+</sup>] = 242,18

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.49 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.70 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).



*Schéma 3: Příprava nitrátu 2-hydroxy-benzylaminopurinia*

### 3.3.11 Příprava 6-(3-hydroxy-benzylamino)purin nitrátu (m-topolin nitrát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 3. Do 50 ml methanolu byl přidán 482 mg 6-(3-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 134 µl 67% kyseliny dusičné. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 380 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek m-topolin nitrátu: 62,42 %, HPLC: >99 %, Mr = 304,41; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,18

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 10.17 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.82 – 8.67 (m, 3H), 8.65 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H).

### 3.3.12 Příprava 6-(4-hydroxybenzylamino)purin nitrátu (p-topolin nitrát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 3. Do 50 ml methanolu byl přidán 482 mg 6-(4-hydroxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 134 µl 67% kyseliny dusičné. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu

24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 410 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek o-topolin nitrátu: 67,34 %, HPLC: >99 %, Mr = 304,41; MS [M+H<sup>+</sup>] = 242,24

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 9.45 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.70 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H).

### 3.3.13 Příprava 6-(3-methoxy-benzylamino)purin nitrátu (m-MeOBAP nitrát)

Protonizace proběhla stejným způsobem jako na schématu 3. Do 50 ml methanolu byl přidán 510 mg 6-(3-methoxy-benzylamino)purinu. Látka byla míchána při 250 RPM a teplotě 60 °C přibližně 30 min. Následně bylo opatrně přikapáváno 134 μl 67% kyseliny dusičné. Postupně vznikl naprosto čirý roztok, který byl ponechán reagovat přibližně 1 hodinu. Produkt byl následně zahuštěn na RVO na odparek. Látka byla promyta pomocí 50 ml acetonu a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen po dobu 24 h při 60 °C v sušárně. Výsledný produkt činil 402 mg. Struktura látky je uvedena ve schématu 4.

Výtěžek m-MeOBAP nitrátu: 63,23 %, HPLC: >99 %, Mr = 317,91; MS [M+H<sup>+</sup>] = 256,18

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.87 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 6.62 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.21 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H).

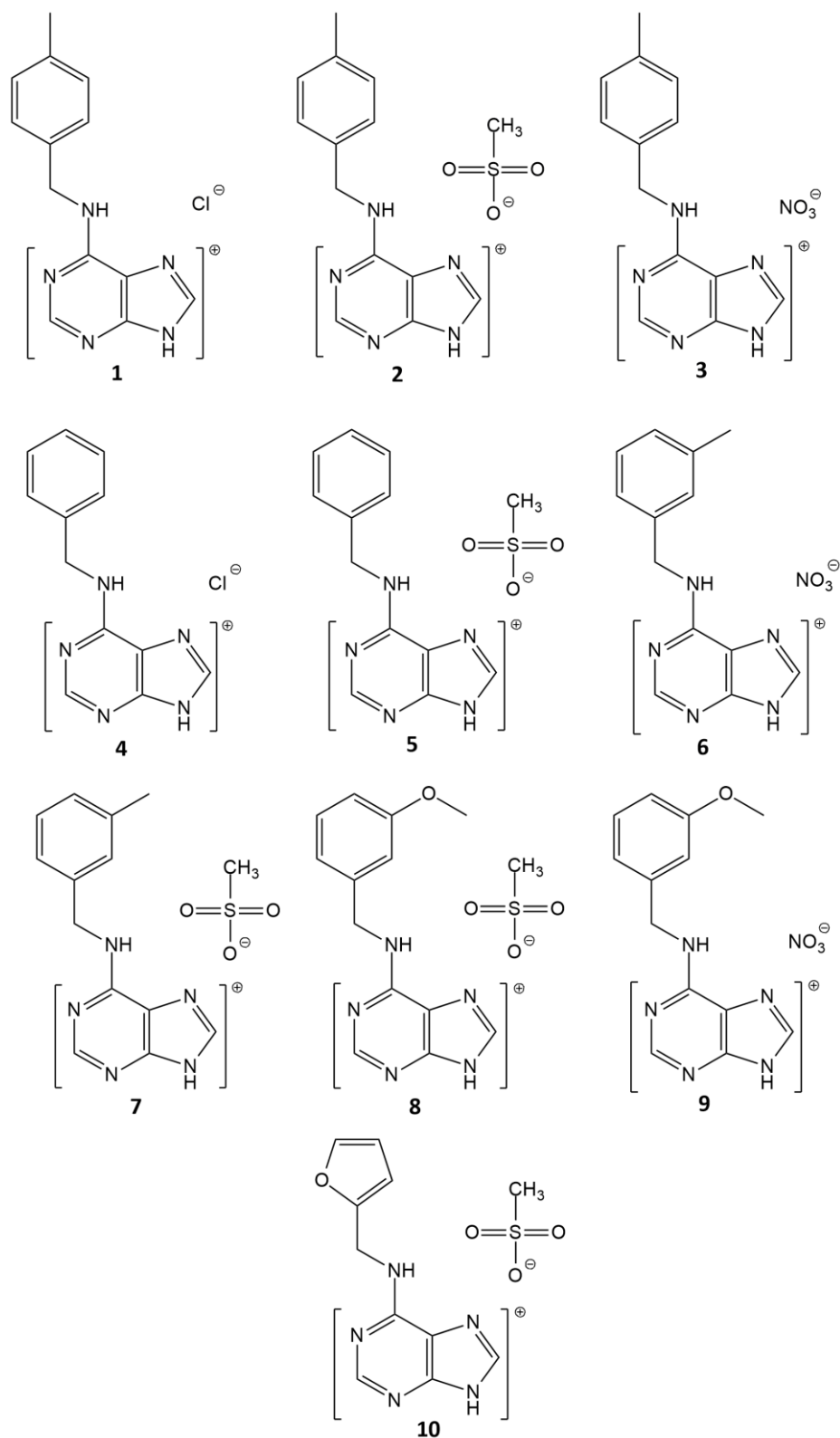


Schéma 4: Zbylé struktury nově syntetizovaných látek – **1** - p-topolin chlorid, **2** - p-topolin mesylát, **3** - p-topolin nitrát, **4** - BAP chlorid, **5** - BAP mesylát, **6** - m-topolin nitrát, **7** - m-topolin mesylát, **8** - m-MeOBAP mesylát, **9** - m-MeOBAP nitrát, **10** - kinetin mesylát

### **3.4 Postupy krystalizace**

#### **3.4.1 Krystalizace volným vypařováním rozpouštědla za snížené teploty**

Vzorky o-topolin mesylátu a m-topolin mesylátu byly použity k vypěstování monokrystalů k následnému měření pomocí rentgenové difrakce na monokrystalech. U obou vzorků byl zvolen stejný postup. V kádince bylo rozmícháno 100 mg vzorku ve 20 ml methanolu. Jakmile byl roztok čirý, kádinka byla překryta parafilmem, ve kterém byly pomocí jehly vytvořeny dírky o průměru 1 mm. Následně byla kádinka přikryta pomocí Petriho misky. Takto připraveny látky ke krystalizaci byly vloženy do ledničky a pod teplotou 7 °C byly ponechány krystalizovat 14-21 dní. Následně byly izolovány z matečného louhu jednotlivé monokrystaly m-topolin mesylátu a zaslány na XRD do FZU AV, instituce, která disponuje systémem pro monokrystalovou difrakční analýzu. Monokrystaly o-topolin mesylátu se však tímto způsobem nepodařilo vypěstovat.

#### **3.4.2 Krystalizace přidáním antisolventu**

Ve druhém typu krystalizace byla použita krystalizace za postupného přidávání tzv. antisolventu. V kádince bylo rozmícháno 100 mg vzorku ve 20 ml methanolu. Jakmile byl roztok čirý, celá kádinka byla vložena do větší kádinky, ve které bylo 30 ml isopropanolu. Velká kádinka byla překryta parafilmem. V takto uzavřené aparatuře dochází k postupné difúzi plynů až promísení kapalin, což vede ke krystalizaci. Tímto způsobem byly získány monokrystaly o-topolin mesylátu, které se nedařilo výše zmíněným způsobem vykrystalizovat.

### **3.5 Test rozpustnosti výpočtem z kalibrační křivky získané pomocí HPLC**

U všech vzorků byl připraven přesycený roztok v 1 ml destilované vody. Přesycený roztok byl zfiltrován přes centrifugu eppendorf 5415R s pórovitostí 0,2 μm. Filtrace proběhla při centrifugaci 5 min při 8000x g. Následně se vzorek ředil dle plochy píku 10x až 10000x.

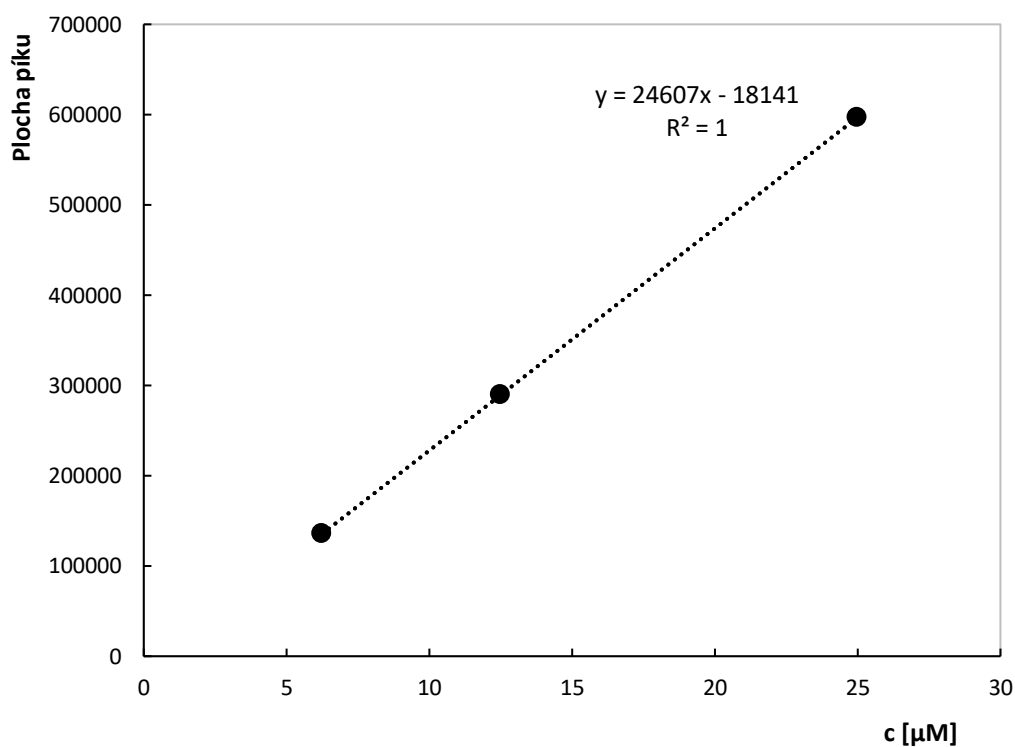
K vyhotovení kalibrační křivky byl vždy připraven standard o koncentraci 10 mM v destilované vodě a ten byl případně dále ředěn na požadované koncentrace potřebné k vytvoření kalibrační řady. Z původních látek, které byly nerozpustné v methanolu i destilované vodě, bylo připraveno 100 μl roztoku o koncentraci 100 mM pomocí DMSO a následně byl roztok ředěn opět dle plochy píku na požadované koncentrace k vytvoření kalibrační křivky. Následně bylo do rovnice spojnice trendu dosazeno a byla vypočtena



teoretická koncentrace látky nasyceného roztoku v destilované vodě. Názorný příklad je uveden v tab. 2 a obr. 4.

Tab. 2: Kalibrační řada o-topolin chloridu

o-topolin chlorid	
c [ $\mu\text{M}$ ]	plocha píku
6,25	135667
12,5	289435
25	597050
Původní roztok (10000x zředěno)	439153
Koncentrace nasyceného roztoku	<b>178467,4 <math>\mu\text{M}</math></b>



Obr. 4: Kalibrační křivka o-topolinu chloridu

### 3.6 Biologické testování

#### 3.6.1 Inhibice senescence

Byla použita semena jarní pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka). Obilky byly opláchnuty 96% ethanolem a poté proplachovány 1 hodinu tekoucí vodovodní vodou a vysety do misek s Agroperlitem nasyceným Hoaglandovým živným roztokem (100 ml + 5 ml Fe-EDTA doplněno do 1 l). Klíčení probíhalo ve světelném kultivačním boxu (perioda

světlo/tma – 16/8 hodin, 7000 lx, 22 °C). Po 7 dnech, kdy byl první list zcela vyvinut, byly odebrány primární listové segmenty o délce přibližně 3,5 cm, váženy po čtyřech a zastříženy, aby vážily dohromady 0,1 g. Čtveřice listů byly ihned ponořeny svými bazálními konci do jamek mikrotitrační destičky ELISA, které obsahovaly 150 µl roztoku testované látky v požadovaných koncentracích 100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM a 0,01 µM. Inkubace probíhala při 24 °C po dobu 96 hodin. Následně byl chlorofyl ze čtveřic listů extrahován pomocí 5 ml 80% ethanolu ve vodní lázni při 80 °C po dobu 10 minut. Listy byly vyjmuty a objem extraktu byl doplněn opět na 5 ml. Absorbance chlorofylu byla měřena při vlnové délce 665 nm. Látky byly srovnány s BAP rozpuštěným v DMSO, který sloužil jako standard, a také s původní látkou, která musela být také rozpuštěna v DMSO. Jako kontrola sloužily listy bez předchozí inkubace. Tento test byl proveden paní J. Balonovou dle již dříve publikovaných protokolů (Holub, 1998).

### 3.6.2 AHK4 receptorový test

Nejprve byla připravena bakteriální pre-kultura *E. coli* s vektorem pINIII se sekvencí pro expresi AHK4 receptoru. Příprava proběhla za sterilních podmínek ve flowboxu. Do zkumavky bylo odpipetováno 3 ml M9 média a 3 µl ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Následně bylo ke směsi přidáno 3 µl zásobní kultury *E. coli* KMI001-pINIII:AHK4. Takto připravená pre-kultura byla inkubována přibližně 17 hodin v třepačce při 25 °C při 150 rpm. Z testovaných látek byly připraveny vodné roztoky o molární koncentraci 10 mM, případně 1 mM u málo rozpustných látek. Bohužel se u některých látek nepodařilo vytvořit ani 1 mM zásobní roztok, apřoto byly z tohoto testu vyřazeny. Následně byly látky ředěny na požadované koncentrace 50 µM, 10 µM, 1 µM a 0,1 µM a porovnány s původní látkou, rozpuštěnou v DMSO, a s aktivitou tZ. Následovala inkubace v termomixeru 17 hodin při 450 rpm a 25 °C. Po inkubaci bylo změřeno OD při 600 nm do nové 96-ti jamkové desky bylo napipetováno po 2 µl 25 mM 4-methylumbelliferylgalaktosidáza (MUG) a přeneseno 50 µl kultury z každé jamky první desky. Následovala další inkubace v termomixeru 10 minut při 37 °C. Reakce byla poté zastavena přidávkem Stop pufru a byla změřena fluorescence při excitační/emisní vlnové délce 365/460 nm. Tento test byl proveden Mgr. Karolínou Wojewodovou.

### 3.6.3 Kalusový test

Jedna látka byla hodnocena v 5 koncentračních řadách (50 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM a 0,01 mM) v 6-ti jamkových deskách. Na otestování jedné látky bylo potřeba 5 desek a 100 ml vyautoklávovaného MS média. Celou dobu se pracovalo sterilně ve flow boxu. Do kádinky bylo odlito 20 ml média a byla přidána látka o požadované koncentraci rozpuštěna ve vodě. Po rozmíchání se do každé jamky desky přeneslo 3 ml roztoku. Po ztuhnutí bylo do každé jamky přidáno 0,1 g kalusu a ten byl rozdělen na tři díly. Hotové desky byly inkubovány 4 týdny při 25 °C ve tmě. Jako standard byla použita deska s BAP a ke kontrole deska s čistým médiem. Tento test byl proveden paní J. Balonovou po mírné úpravě dle publikovaných protokolů (Holub, 1998).

### 3.6.4 Polní testování na jarním ječmeni (var. Francin)

Vzhledem k faktu, že pracoviště CRH disponuje pokusnými poli a příslušnými personálními kapacitami pro uskutečnění testování na plodinách *in situ*, byly s připravenými vybranými látkami testovány v rámci ošetření jarního ječmene a porovnány s neprotonizovanými příslušnými cytokininy. Jarní ječmen byl ošetřen pomocí tří látek – BAP kontrola, m-topolin mesylát a BAP mesylát. Ošetření bylo provedeno aplikací postřiku na listy ječmene v BBCH – 31-33 (stonek dosáhl 10-30 % konečné délky). Experiment proběhl v roce 2019 v lokalitě Olomouc. Výsev v tomto polním experimentu obsahoval 3,5 milionů naklíčených semen, 5 parcel z každé varianty a porovnání s neošetřenou kontrolou. Pokus byl proveden dle GEP (Good Experimental Practise). Parcela měla rozlohu 10 m<sup>2</sup> a množství vody s použitou látkou bylo 300 l/ha (300 ml/parcela). Koncentrace testovaných látek byla 5 µM. Polní experiment byl proveden Ing. R. Koprnou, PhD.

## 4 Výsledky

### 4.1 Elementární analýza nově připravených látek

U všech připravených látek byla provedena elementární analýza pomocí Flash EA analyzátoru. Analyzované hodnoty procentuálně přibližně odpovídají teoretickým výpočtům zastoupení jednotlivých prvků. U některých látek byly pozorovány rozdíly v procentuálním zastoupení některých prvků 1 % a více. Toto mohlo být způsobeno například nedokonalým odpařením rozpouštědel, se kterými se pracovalo. Je možno také uvažovat o nevhodně zvoleném standardu (nikotinamid).

Tab. 3: Výsledky elementární analýzy

Vzorky	Analýza			Teorie		
	% N	% C	% H	% N	% C	% H
o-topolin nitrát	27,07	47,88	4,48	27,59	47,30	3,94
o-topolin chlorid	24,80	51,12	4,56	25,19	51,82	4,32
o-topolin mesylát	19,93	45,76	4,81	20,74	46,22	4,44
BAP chlorid	26,67	55,78	4,48	26,78	55,08	4,59
BAP mesylát	21,33	47,18	4,47	21,80	48,58	4,67
m-MeOBAP mesylát	20,72	45,88	4,15	19,94	47,86	5,13
m-MeOBAP nitrát	25,84	48,60	4,51	26,42	49,07	4,72
m-topolin mesylát	20,19	45,71	4,41	20,74	46,22	4,44
m-topolin nitrát	27,06	47,69	3,92	27,59	47,30	3,94
p-topolin chlorid	25,09	51,51	4,51	25,19	51,82	4,32
p-topolin nitrát	27,90	48,48	3,91	27,59	47,30	3,94
p-topolin mesylát	20,63	46,44	4,46	20,74	46,22	4,44
Kinetin mesylát	22,44	42,84	4,09	22,50	42,43	4,18

## 4.2 Porovnání bodů tání

U všech nově připravených látek byla změřena teplota tání a porovnána s látkou původní, neprotonizovanou.

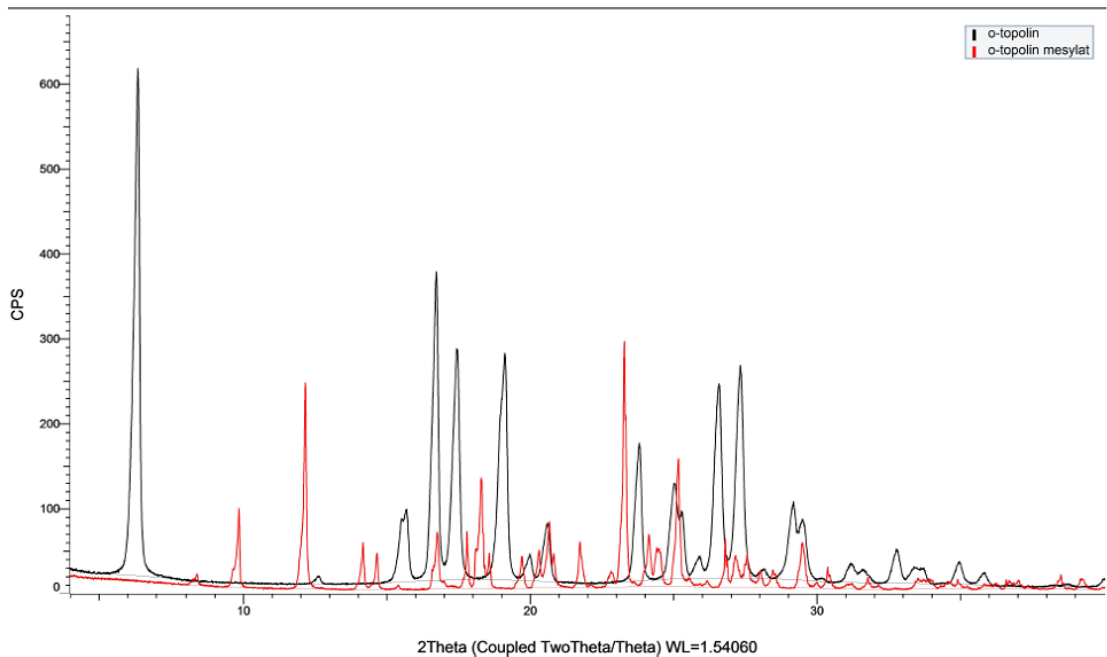
Tab. 4: Porovnání bodů tání jednotlivých látek

Látka	Bod tání látky (°C)	Bod tání původní látky (°C)
m-topolin chlorid	198-200	
m-topolin nitrát	267-270	283-285
m-topolin mesylát	174-177	
o-topolin chlorid	130-133	
o-topolin nitrát	106-109	265-268
o-topolin mesylát	166-171	
p-topolin chlorid	231-233	
p-topolin nitrát	208-211	270-273
p-topolin mesylát	181-183	
BAP chlorid	215-219	
BAP nitrát	172-175	231-235
BAP mesylát	148-151	
m-MeoBAP chlorid	176-178	
m-MeoBAP nitrát	190-192	248-252
m-MeoBAP mesylát	208-210	
Kinetin mesylát	164-166	269-273

## 4.3 Prášková rentgenová difrakce

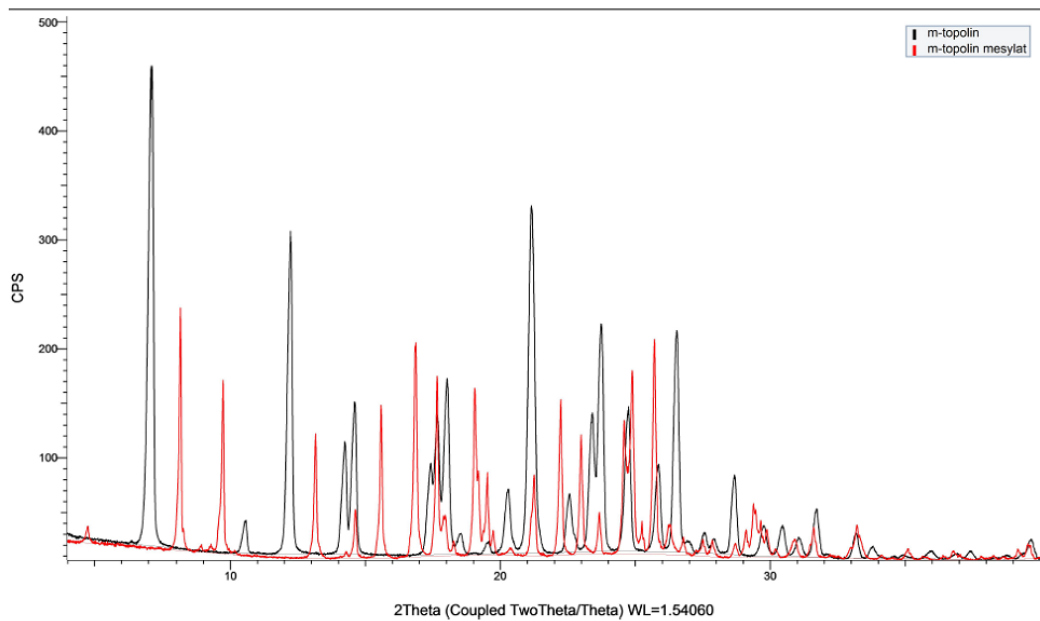
Nově připravené látky byly charakterizovány pomocí XRPD, difraktometr Bruker D8 Advance ECO s RTG zářením  $\text{CuK}\alpha$  a detektorem SSD160. V obrázcích níže lze vidět vždy porovnání difraktogramu původní látky (značeno černě) s difraktogramem látky protonizované příslušnou kyselinou (značeno červeně) viz obrázky 5-16. Difraktogram o-topolinu chloridu nemohl být porovnán, jelikož byla látka amorfní.

(Coupled TwoTheta/Theta)



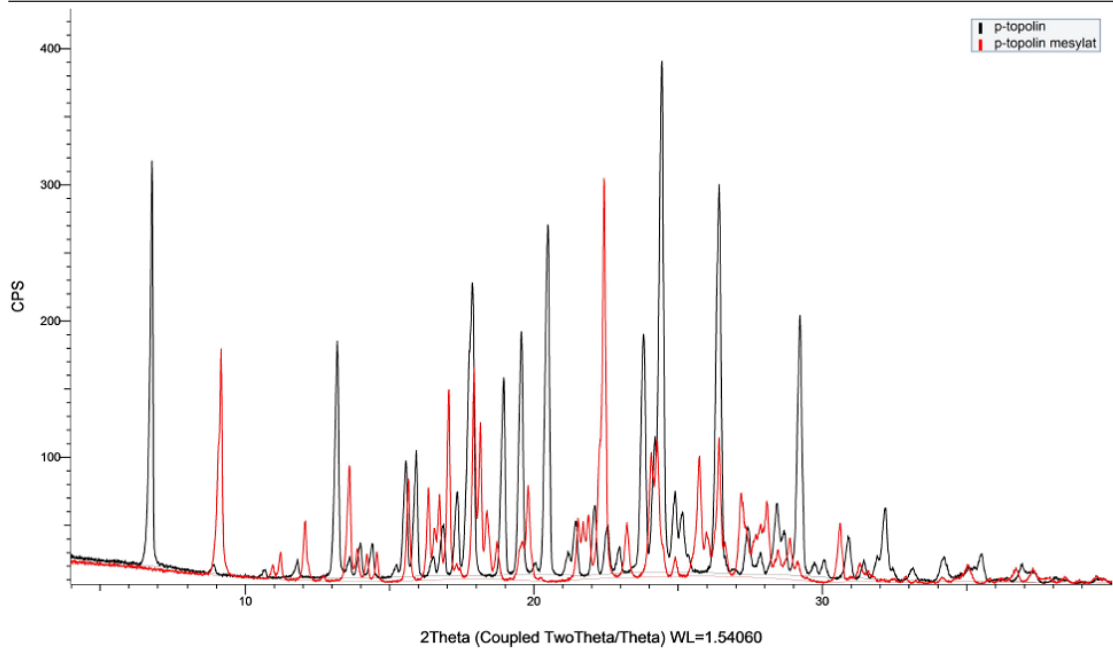
Obr. 5: Porovnání difraktogramů o-topolin mesylátu a o-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



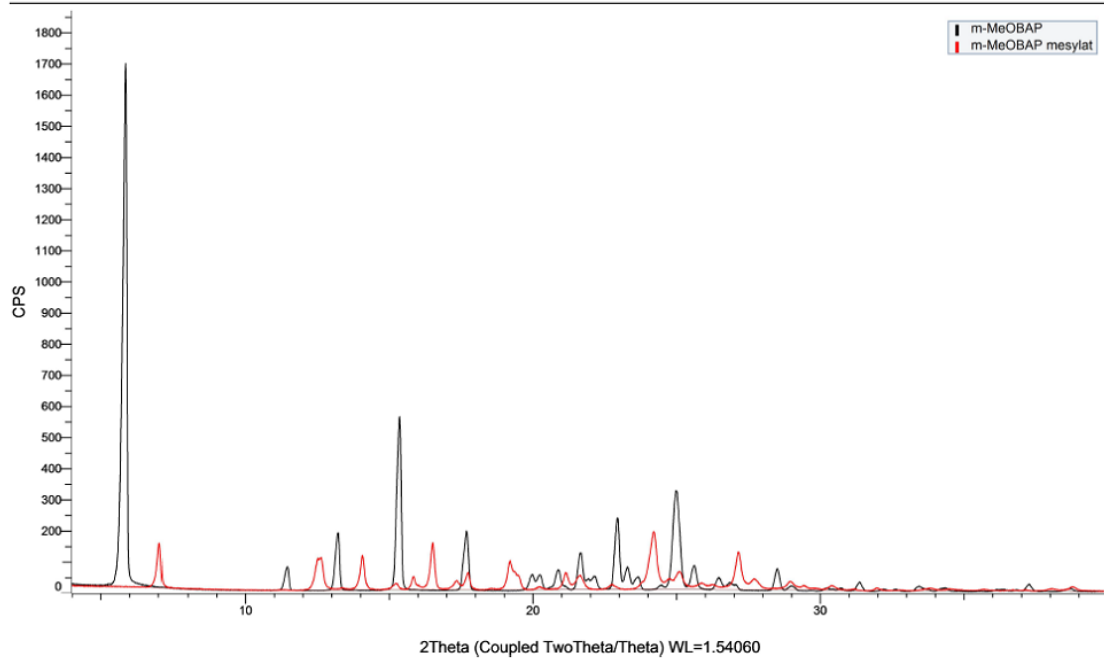
Obr. 6: Porovnání difraktogramů m-topolin mesylátu a m-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



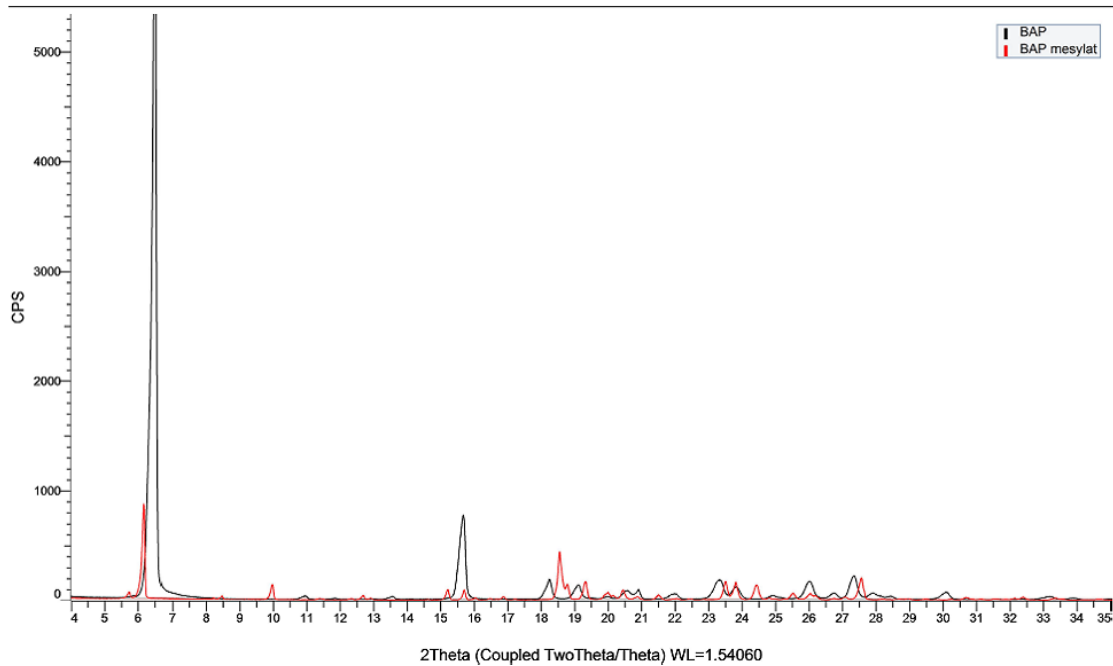
Obr. 7: Porovnání difraktogramů p-topolin mesylátu a p-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



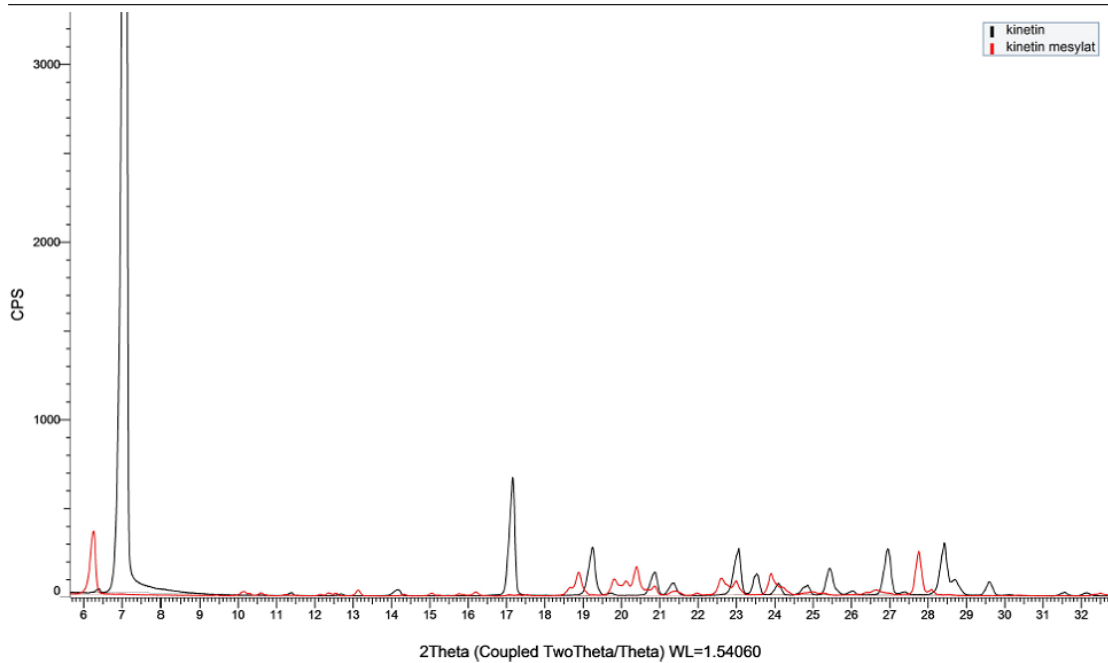
Obr. 8: Porovnání difraktogramů m-MeOBAP mesylátu a m-MeOBAP

(Coupled TwoTheta/Theta)



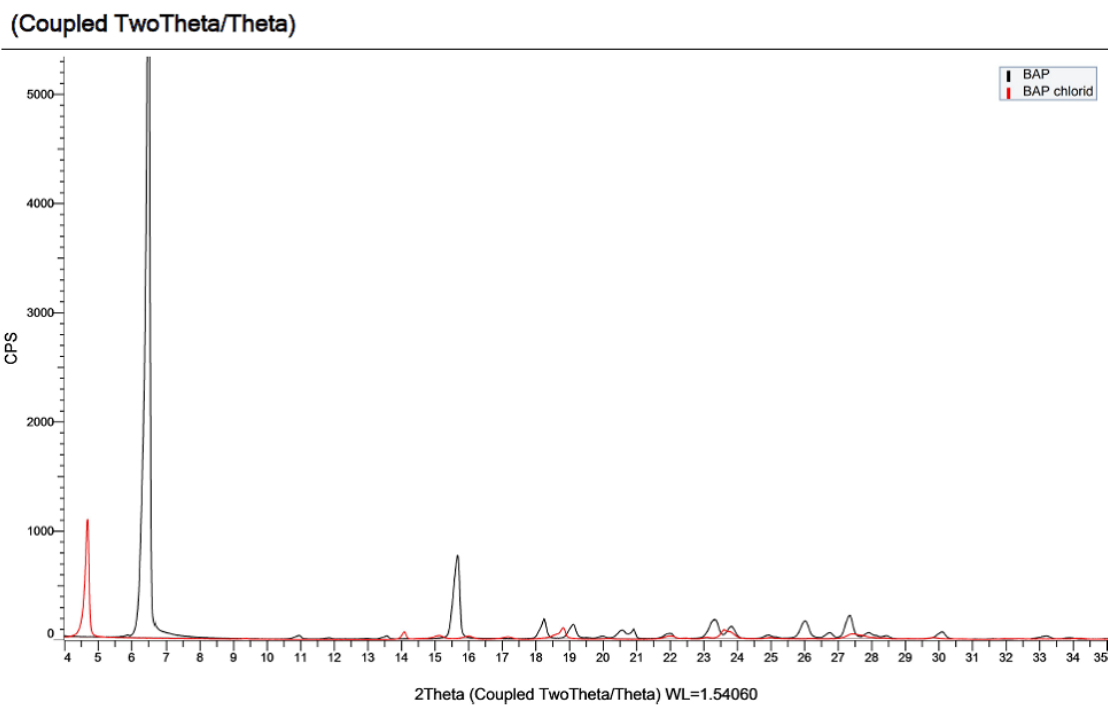
Obr. 9: Porovnání difraktogramů BAP mesylátu a BAP

(Coupled TwoTheta/Theta)

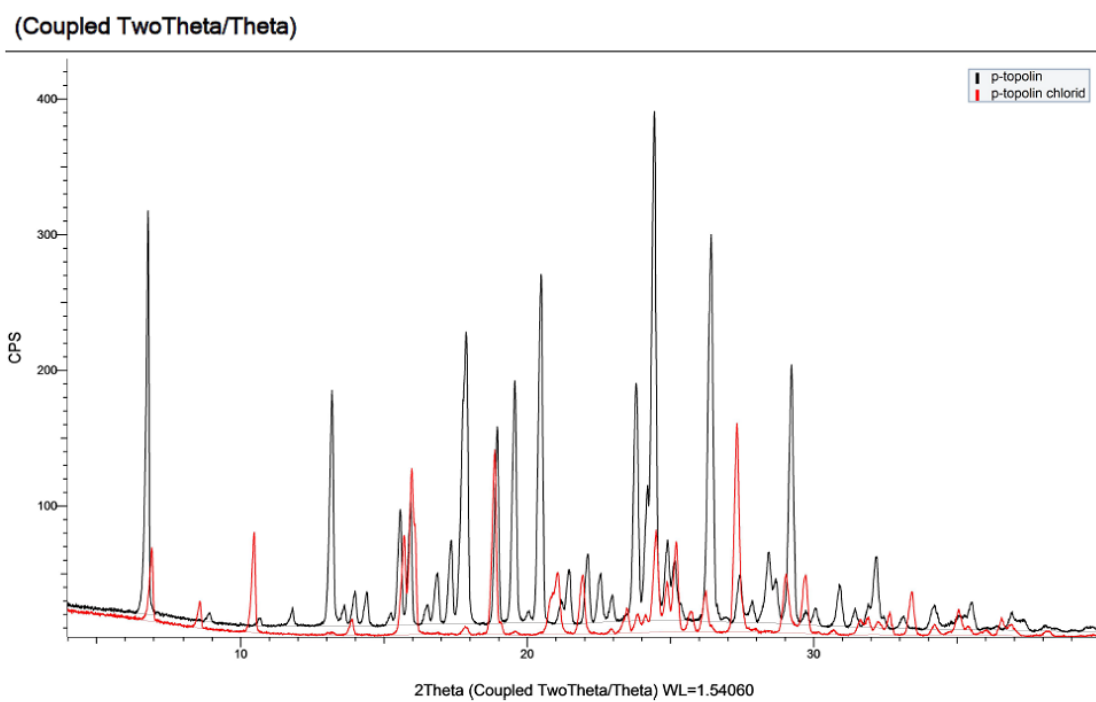


Obr. 10: Porovnání difraktogramů kinetin mesylátu a kinetinu



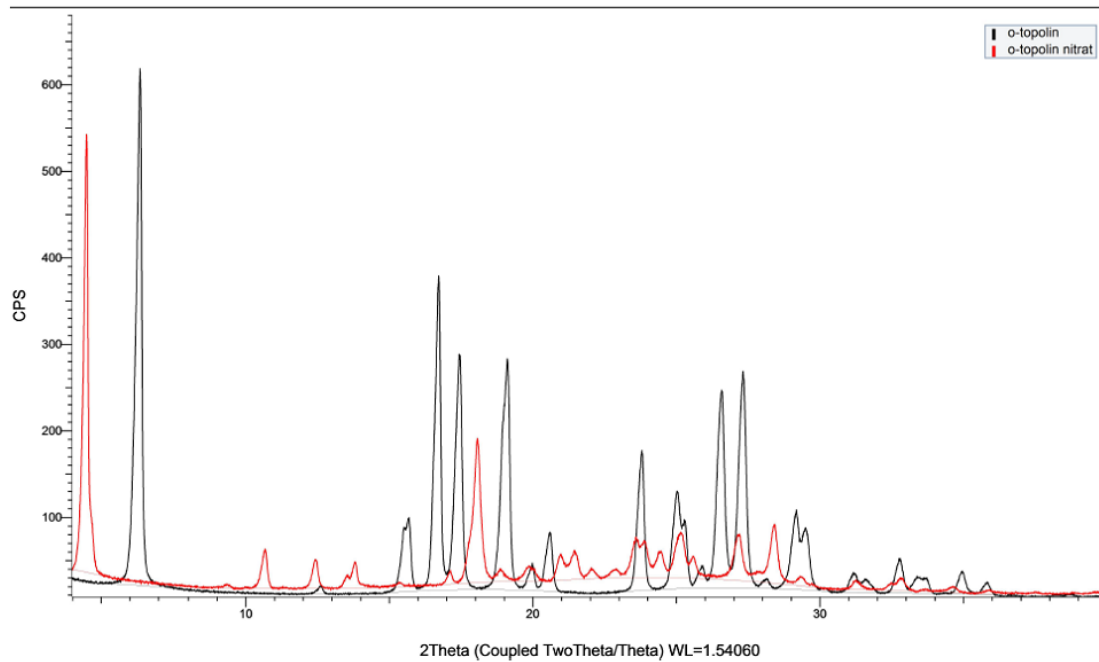


Obr. 11: Porovnání difraktogramů BAP chloridu a BAP



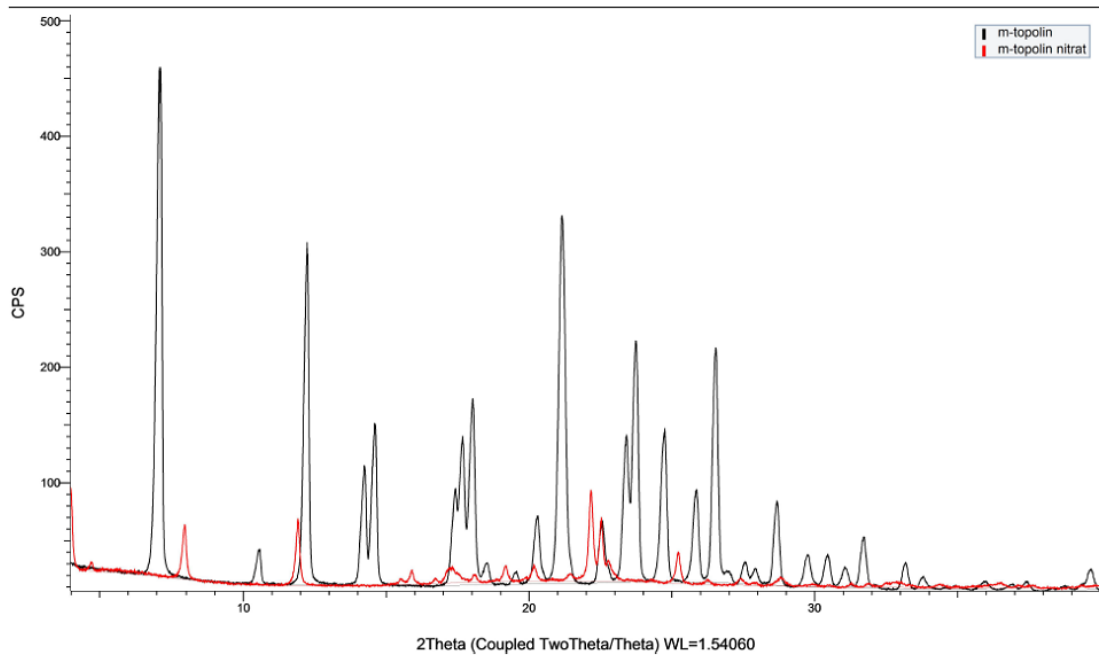
Obr. 12: Porovnání difraktogramů p-topolin chloridu a p-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



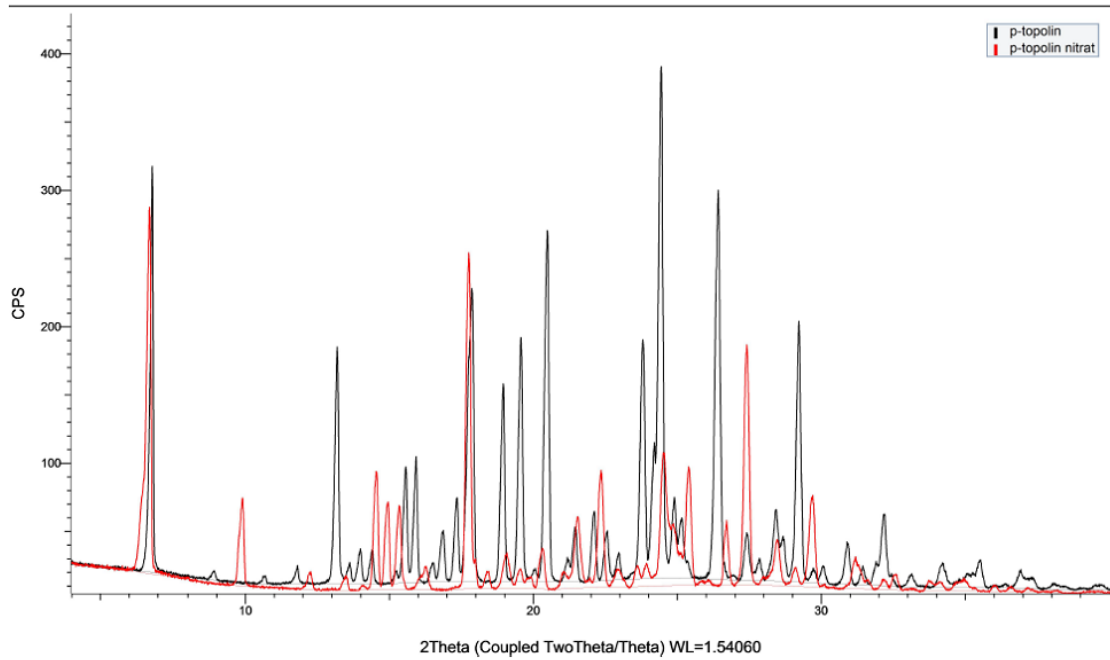
Obr. 13: Porovnání difraktogramů o-topolin nitrátu a o-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



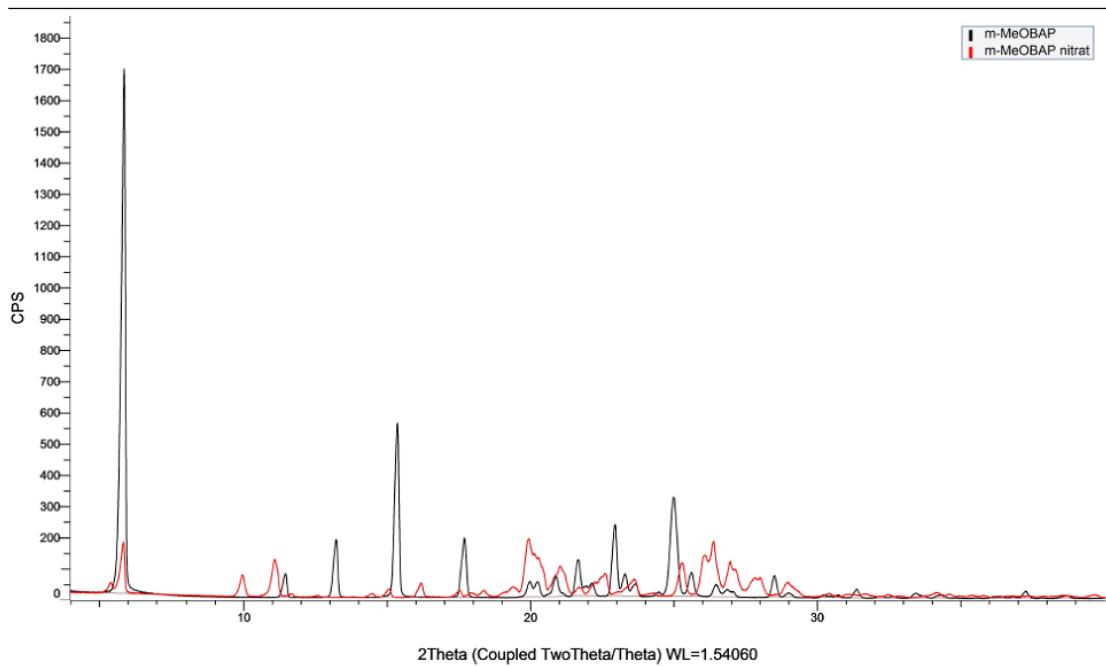
Obr. 14: Porovnání difraktogramů m-topolin nitrátu a m-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



Obr. 15: Porovnání difraktogramů *p*-topolin nitrátu a *p*-topolinu

(Coupled TwoTheta/Theta)



Obr. 16: Porovnání difraktogramů *m*-MeOBAP nitrátu a *m*-MeOBAP

## 4.4 Monokrystalová rentgenostrukturní analýza

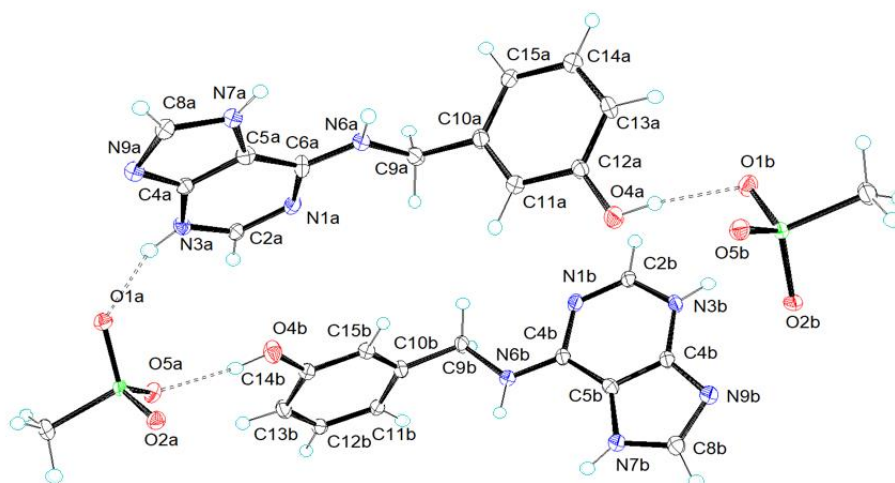
### 4.4.1 Monokrystalová analýza m-topolin mesylátu

Látky o-topolin mesylát a m-topolin mesylát byly charakterizovány pomocí difrakce na monokrystalech a jejich teoretická struktura, uvedena na obr. 17, byla zobrazena programem Ortep 3. Pomocí monokrystalové rentgenostrukturní analýzy bylo zjištěno, že m-topolin mesylát je centrosymetrický dimer propojený vodíkovými vazbami. Látka vykristalizovala v ortorombické krystalové soustavě s prostorovou grupou Pna21, jejíž elementární buňka obsahuje tyto parametry:  $a = 14,9313$  (1),  $b = 7,8302$  (3),  $c = 25,1594$  (1) Å,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$  a objem elementární buňky je  $2941,51$  Å<sup>3</sup>. Krystalografická data jsou uvedena v tab. 5. Ke sbírání dat, redukční a absorpční korekci byl použit software CrysAlisPro (Rigaku Oxford Diffraction, 2018 verze 1.171.40.53). Bylo zjištěno, že zkoumaná sloučenina se skládá z kationtu 6-(3-hydroxybenzylamino)purinia a aniontu kyseliny methansulfonové. Vodíkové atomy byly do struktury dopočítány pomocí softwaru nebo přímo lokalizovány v diferenční mapě. Centrosymetrický dimer je tvořen dvěmi molekulami sloučeniny spojené intermolekulárními vodíkovými interakcemi mezi kyslíkovým atomem mesylátového aniontu a vodíky N-H purinového kationtu. Systém je stabilizován pomocí těchto vodíkových vazeb spojujících N6a..H6b purinia s O1a aniontem mesylátu, N7a..H7a kationt purinia s O5b aniontem mesylátu, O4b..H4b hydroxylové skupiny, která je součástí benzenového kruhu kationtu m-topolinu s O5b aniontem mesylátu a opačně O4a..H4a kationtu m-topolinu s O1b aniontem mesylátu. Tyto vodíkové interakce pravděpodobně souvisejí s výrazným zlepšením rozpustnosti zmíněné látky ve vodě. Dalším faktorem může být významná změna torzních úhlů, viz tab. 15, oproti torzním úhlům podobných sloučenin popsanych v literatuře (Umadevi et al., 2001; Raghunathan et al., 1983; Trávníček et al., 2004 a 2007).

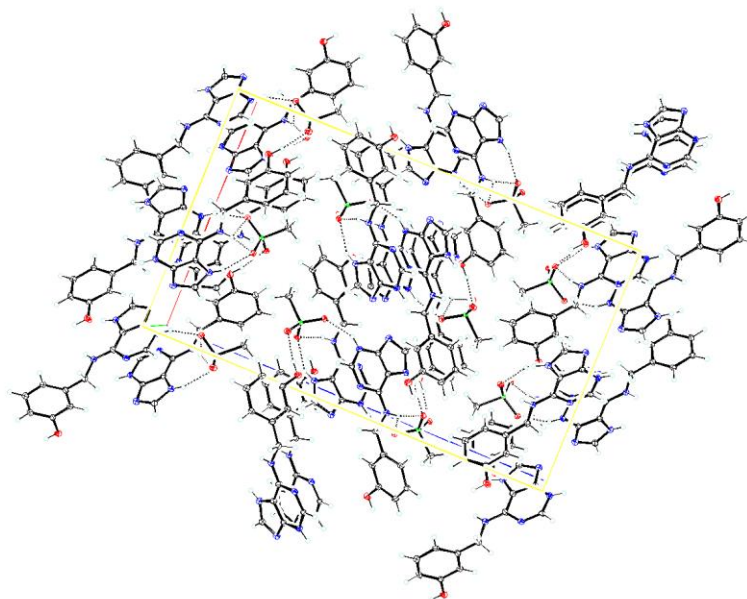
Výsledný R-faktor (založený na F a 5945 reflexích s  $[F_2 > 2\sigma(F_2)]$ ) byl 0,0257. Vybrané geometrické parametry meta-topolin mesylátu jsou uvedeny v tab. 5. Podle rentgenostrukturní analýzy krystalické soli m-topolin mesylátu byl také stanoven sumární vzorec sloučeniny  $C_{13}H_{15}N_5O_4S$ .

Tab. 5: Základní naměřená krystalografická data *m*-topolin mesylátu

m-topolin mesylát	
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S
Mr	337,36
Teplota měření	94,94 (13) K
Vlnová délka	1,54184 Å
Krystalová soustava	ortorombická
Prostorová grupa	Pna21
Rozměry elementární buňky	$a$ (Å) = 14,93130 (10) $b$ (Å) = 7,8302 (3) $c$ (Å) = 25,15940 (10)
	$\alpha$ (°) = 90
	$\beta$ (°) = 90
	$\gamma$ (°) = 90
Objem elementární buňky	2941,51 (12)
Počet reflexí/parametry	5945/441
R [F <sub>2</sub> > 2σ (F <sub>2</sub> )]	0,0257



Obr. 17: Molekulová struktura *m*-topolin mesylátu znázorněná pomocí programu Ortep 3



Obr. 18: Krystalová struktura (crystal packing) *m*-topolin mesylátu. Žlutými čarami je znázorněna elementární buňka *m*-topolin mesylátu. Obrázek byl vytvořen pomocí programu Ortep 3

Tab. 6: Vybrané geometrické parametry (délky vazeb) v *m*-topolin mesylátu, které popisují délky vazeb v Ångströmech

Vazba	Délka vazby (Å)	Vazba	Délka vazby (Å)
N1a-C2a	1,311	N1b-C2b	1,318
N1a-C6a	1,368	N1b-C6b	1,362
N3a-C2a	1,346	N3b-C2b	1,335
N3a-C4a	1,363	N3b-C4b	1,366
N3a-H3a	0,843	N3b-H3b	0,843
C4a-C5a	1,387	C4b-C5b	1,412
C5a-C6a	1,416	C5b-C6b	1,412
C8a-H8a	0,960	C8b-H8b	0,960
C9a-C10a	1,505	C9b-C10b	1,516
O4a-C13a	1,132	O4b-C13b	1,367
O4a-H4a	0,861	O4b-H4b	0,861
N6a-C6a	1,321	N6b-C6b	1,333
N6a-C9a	1,472	N6b-C9b	1,472
N6a-H6a1	0,842	N6b-H6b1	0,842
N7a-C8a	1,349	N7b-C8b	1,349
N7a-H7a	0,842	N7b-H7b	0,842
N9a-C8a	1,332	N9b-C8b	1,328
N9a-C4a	1,357	N9b-C4b	1,356
C2a-H2a	0,960	C2b-H2b	0,960

Tab. 7: Vybrané geometrické parametry popisující úhly mezi jednotlivými atomy

Vazba	Úhel (°)	Vazba	Úhel (°)
C2a-N1a-C6a	119,700	C2b-N1b-C6b	119,200
C2a-N3a-C4a	117,470	C2b-N3b-C4b	117,740
C4a-N3a-H3a	122,400	C4b-N3b-H3b	121,960
C6a-N6a-H6a	119,950	C6b-N6b-H6b	118,380
C9a-N6a-H6a	118,350	C9b-N6b-H6b	119,880
C8a-N7a-C5a	106,490	C8b-N7b-C5b	106,580
C8a-N9a-C4a	102,800	C8b-N9b-C4b	102,980
N1a-C2a-N3a	125,610	N1b-C2b-N3b	125,850
N9a-C4a-C5a	112,280	N9b-C4b-C5b	112,500
N3a-C4a-C5a	119,590	N3b-C4b-C5b	119,020
C4a-C5a-N7a	104,570	C4b-C5b-N7b	104,230
N7a-C5a-C6a	135,100	N7b-C5b-C6b	135,030
N6a-C6a-N1a	118,750	N6b-C6b-N1b	118,090
N6a-C6a-C5a	123,980	N6b-C6b-C5b	124,480
N9a-C8a-N7a	113,860	N9b-C8b-N7b	113,710
N9a-C8a-H8a	123,070	N9b-C8b-H8b	123,130

Tab. 8: Vybrané geometrické parametry popisující torzní úhly

Torzní úhly (°)	
C(5a)-C(6a)-N(6a)-C(9a)	178,52
C(6a)-N(6a)-C(9a)-C(10a)	-164,11
N(6a)-C(9a)-C(10a)-C(15a)	-96,37
C(5b)-C6b-N6b-C9b	178,44
C6b-N6b-C9b-C10b	-164,65
N6b-C9b-C10b-C11b	-97,88

Tab. 9: Vybrané geometrické parametry popisující vodíkové vazby. Délky vazeb jsou uvedeny v Ångströmech (D - donor, H – vodík, A – akceptor).

Vazba	Délka vazby			Vazebný úhel (°)
D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N3b-H3b...O2b	0,843	1,972	2,74	151,04
N6a-H6a...O5b	0,842	2,065	2,882	163,57
N3a-H3a...O1a	0,843	1,949	2,746	157,18
N6b-H6b...O2a	0,842	2,076	2,895	163,93
N7a-H7a...O5b	0,842	2,068	2,804	145,63
O4a-H4a...O1b	0,861	1,852	2,706	171,51
O4b-H4b...O5b	0,861	1,866	2,722	172,62

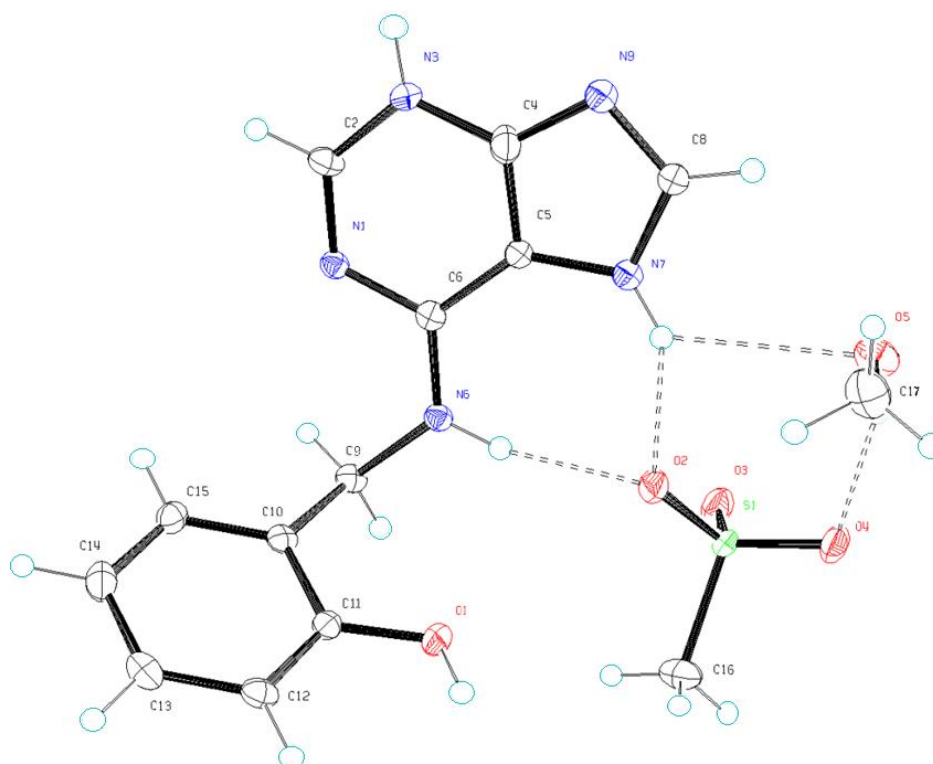
#### 4.4.2 Monokrystalová struktura o-topolin mesylátu

Látka krystaluje v monoklinické krystalové soustavě s prostorovou grupou P21/c, jejíž elementární buňka obsahuje tyto parametry:  $a=10,3822$  (4),  $b=21,0265$  (5),  $c=8,1025$  (2) Å,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=107,466^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$  a objem elementární buňky  $1688,21$  (9) Å<sup>3</sup>. Ke sbírání dat, redukční a absorpční korekci byl použit software CrysAlisPro (Rigaku Oxford Diffraction, 2018 verze 1.171.40.53) a strukturní model byl určen programem Superflip & SHELXT a následně upřesněn pomocí metody nejmenších čtverců programem JANA2006. Bylo zjištěno, že zkoumaná sloučenina se skládá nejen z kationtu 6-(3-hydroxybenzylamino)purinia a aniontu kyseliny methansulfonové, ale také je přítomna molekula methanolu, jenž byl použit jako solvent. Vodíkové atomy byly do struktury dopočítány pomocí softwaru anebo lokalizovány v diferenční mapě. Intermolekulární vodíkové interakce jsou přítomny nejen mezi kyslíkovým atomem mesylátového aniontu a vodíky N-H purinového kationtu. Systém je stabilizován pomocí těchto vodíkových vazeb spojujících N6a..H6b, ale také mezi purinovým kationtem a molekulou methanolu. Vodíkové vazby spojují N6..H6 purinu s O2 aniontem mesylátu, N7..H7 purinu s O2 aniontem mesylátu, O5..H5 methanolu je spojeno s O2 aniontu mesylátu a zároveň s N7..H7 purinové struktury o-topolinu. Dále O1..H1 hydroxylové skupiny, která je součástí benzenového kruhu kationtu o-topolinu je spojen vodíkovým můstkem s O3 atomem aniontu mesylátu. Výsledný R-faktor (založený na F a 3024 reflexích s  $[F_2 > 2\sigma(F_2)]$ ) byl 0,0324. Rentgenostrukturní analýza krystalické soli o-topolin mesylátu určila sumární vzorec  $C_{14}H_{19}N_5O_5S$ . Molekula solventu methanolu spolu s vodíkovými vazbami mezi samotným puriniovým kationtem a mesylátovým aniontem zřejmě ovlivňuje rozpustnost dané sloučeniny ve vodném prostředí, jelikož solvát methanolu prohlubuje hustou síť intermolekulárních vodíkových interakcí, které jsou jinak tvořeny především mezi vodíky napojenými na dusíky protonizovaného kationtu a kyslíky aniontu mesylátu. Další významnou změnou je velikost torzních úhlů, viz tab. 15, oproti torzním úhlům podobných sloučenin popsanych v literatuře (Umadevi et al., 2001; Raghunathan et al., 1983; Trávníček et al., 2004 a 2007). Monokrystalická data byla interpretována za pomoci RNDr. M. Duška, CSc. a vedoucí diplomové práce doc. Mgr. L. Plíhalové, Ph.D.

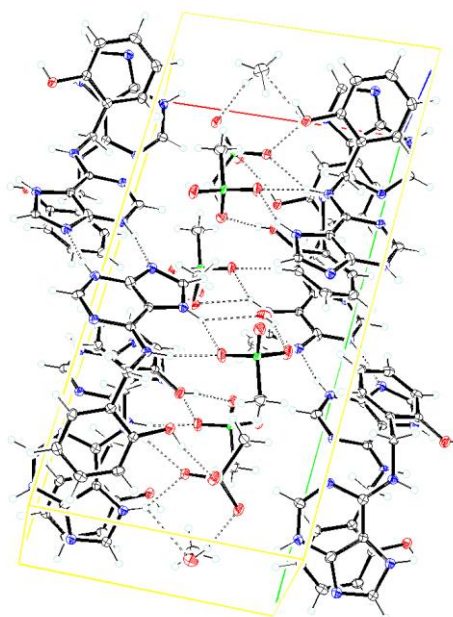


Tab. 10: Základní získaná krystalografická data o-topolin mesylátu

o-topolin mesylát	
Sumární vzorec	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S
Mr	369,40
Teplota měření	120,01 (10) K
Vlnová délka	1,54184 Å
Krystalová soustava	Monoklinická
Prostorová grupa	P2 <sub>1</sub> /c
Rozměry elementární buňky	<i>a</i> (Å) = 10,3822 (4) <i>b</i> (Å) = 21,0265 (4) <i>c</i> (Å) = 8,1025 (2) $\alpha$ (°) = 90 $\beta$ (°) = 107,466 (3) $\gamma$ (°) = 90
Objem elementární buňky	1688,21 (9)
Počet reflexí/parametry	2824/241
R [F <sub>2</sub> > 2 $\sigma$ (F <sub>2</sub> )]	0,0324



Obr. 19: Molekulová struktura o-topolin mesylátu znázorněná pomocí programu Ortep 3



Obr. 20: Krystalová struktura *o*-topolin mesylátu. Žlutými čarami je znázorněna elementární buňka *o*-topolin mesylátu, znázorněná v programu Ortep 3

Tab. 11: Vybrané geometrické parametry (délky vazeb) v *o*-topolin mesylátu v Ångströmech

Vazba	Délka vazby (Å)
N1-C2	1,313
N1-C6	1,367
N3-C2	1,341
N3-C4	1,362
N3-H3	0,871
C4-C5	1,377
C5-C6	1,414
C8-H8	0,960
N9-C8	1,327
O1-C11	1,361
N6-C6	1,319
N7-C8	1,345
C9-C10	1,510
O1-H1	0,850
N6-C9	1,466
N7-H7	0,870
N9-C4	1,359
N9-C8	1,327
C2-H2	0,960

Tab. 12: Vybrané geometrické parametry popisující velikost úhlů vazeb

Vazba	Úhel (°)
C2-N1-C6	119,11
C2-N3-C4	116,96
C4-N3-H3	121,56
C6-N6-H6	118,85
C9-N6-H6	117,14
C8-N7-C5	106,74
C8-N9-C4	103,75
N1-C2-N3	126,12
N9-C4-C5	111,82
N3-C4-C5	120,16
C4-C5-N7	104,55
N7-C5-C6	135,30
N6-C6-N1	119,31
N6-C6-C5	123,17
N9-C8-N7	113,14
N9-C8-H8	123,43

Tab. 13: Vybrané geometrické parametry popisující torzní úhly

Torzní úhly (°)	
C(5)-C(6)-N(6)-C(9)	-178,37
C(6)-N(6)-C(9)-C(10)	-91,49
N(6)-C(9)-C(10)-C(15)	118,34

Tab. 14: Vybrané geometrické parametry popisující vodíkové vazby. Délky vazeb jsou uvedeny v Ångströmech (D - donor, H – vodík, A – akceptor).

D-H...A	Délka vazby			Vazebný úhel (°)
	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N6-H6...O2	0,83	1,988	2,839	165,85
N7-H7...O5	0,87	2,638	3,191	122,52
N7-H7...O2	0,87	1,99	2,751	145,37
O5-H5...O4	0,849	2,023	2,85	164,21

Tab. 15: Porovnání torzních úhlů m-topolin mesylátu a o-topolin mesylátu s podobnými sloučeninami.

	m-topolin CH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub>	o-topolin CH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub>	p-MeOtopolin HCl	p-topolin HCl	BAP	BAP HBr	o-topolin CH <sub>3</sub> COOH
C(5a)-C(6a)- N(6a)-C(9a)	178,52	-178,37	178,9	-179,52	-174,25	179,79	176,86
C(6a)-N(6a)- C(9a)-C(10a)	-164,11	-91,49	-129,5	88,93	80,90	144,19	80,85
N(6a)-C(9a)- C(10a)-C15a)	-96,37	118,34	49,7	75,75	68,26	-54,16	-99,04

## 4.5 Výsledky biologického testování

### 4.5.1 Kalusový test

V kalusovém biotestu byly látky porovnány ve svém účinku na růst nediferenciovaného pletiva *Nicotiana tabacum* (T. Murashige, 1962) a jejich relativní aktivita byla stanovena v porovnání s interním standardem – benzylaminopurinem. Látky BAP nitrát a m-topolin chlorid byly syntetizovány v rámci bakalářské práce (Klos, 2018) a zde byly pouze otestovány k lepšímu porovnání s ostatními látkami. Látky byly vždy rozpuštěny ve vodě a porovnány se svou původní látkou, která byla rozpuštěna v DMSO. U látek m-topolin nitrát, p-topolin nitrát, m-MeOBAP chlorid a m-MeOBAP nitrát se nepodařilo dosáhnout výchozí koncentrace ve vodě 10 mmol/l, a proto nebyly otestovány. Většina nových látek má srovnatelný účinek v porovnání se svou původní látkou, viz tab. 16. Mírně vyšší aktivitu má pouze m-MeOBAP mesylát a p-topolin mesylát oproti své neprotonizované formě. Aktivitu interního standardu převýšily tři látky – BAP nitrát, m-MeOBAP mesylát a kinetin.

Tab. 16: Relativní aktivita testovaných látek k BAP v kalusovém testu. Hodnoty všech látek jsou uvedeny při koncentraci 100 μM.

Látka	Relativní aktivita k BAP [%]
BAP chlorid	99 ± (6)
BAP nitrát	106 ± (5)
BAP mesylát	95 ± (4)
m-topolin	116 ± (5)
m-topolin chlorid	nerozpuštěn
m-topolin nitrát	nerozpuštěn
m-topolin mesylát	95 ± (4)

Látka	Relativní aktivita k BAP [%]
o-topolin	78 ± (6)
o-topolin chlorid	88 ± (6)
o-topolin nitrát	82 ± (3)
o-topolin mesylát	72 ± (4)
p-topolin	58 ± (6)
p-topolin chlorid	42 ± (7)
p-topolin nitrát	nerozpuštěn
p-topolin mesylát	66 ± (6)
m-MeOBAP	89 ± (6)
m-MeOBAP chlorid	nerozpuštěn
m-MeOBAP nitrát	nerozpuštěn
m-MeOBAP mesylát	103 ± (2)
kinetin	109 ± (4)
kinetin mesylát	93 ± (4)

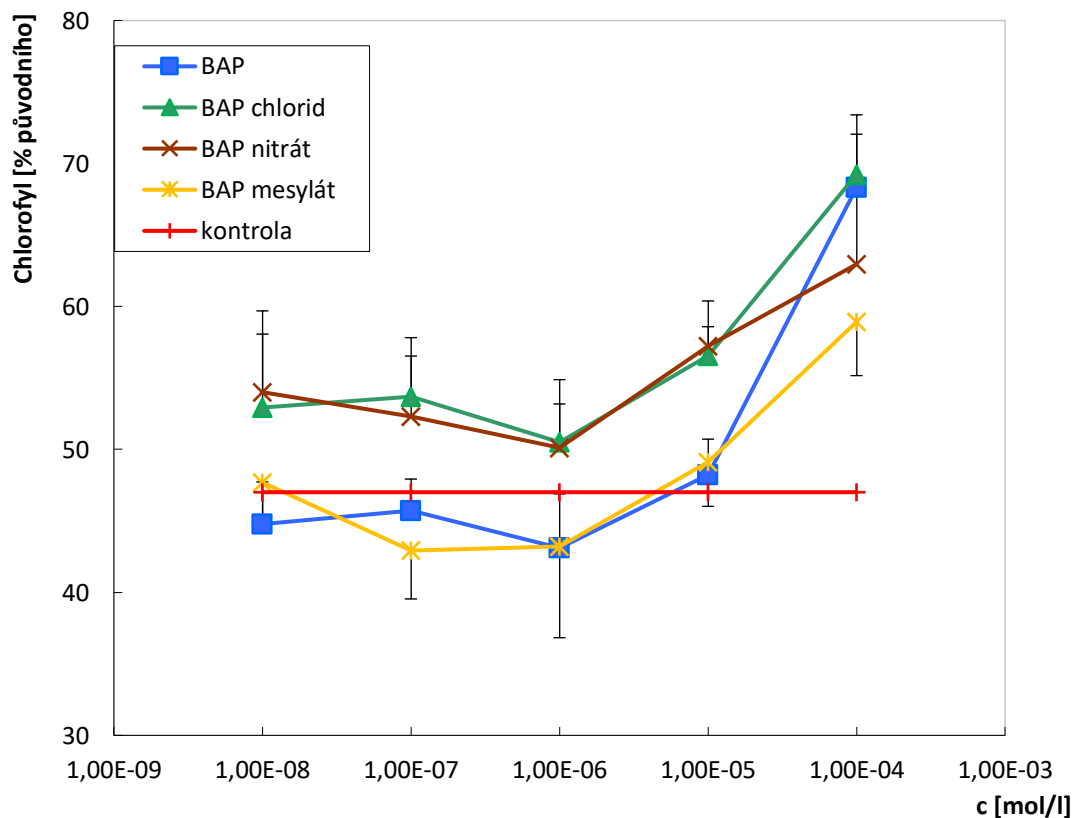
#### 4.5.2 Senescenční test

V senescenčním biotestu byly látky srovnávány z hlediska svého antisenescenčního působení s interním standardem – benzylaminopurinem. Látky BAP nitrát, m-topolin chlorid a m-MeOBAP chlorid byly syntetizovány v rámci bakalářské práce (Klos, 2018) a zde byly pouze otestovány k lepšímu porovnání s ostatními látkami. Látky m-topolin nitrát a p-topolin nitrát se nepodařilo úplně rozpustit ve vodě na potřebnou koncentraci, tudíž se od jejich testování upustilo. Kinetin mesylát a většina solí m-topolinu a BAP mají srovnatelné antisenescenční účinky jako referenční látka. Kinetin mesylát, BAP chlorid a BAP nitrát v nižších koncentracích aktivitu BAP převyšují. Dále má srovnatelný účinek o-topolin a o-topolin mesylát. Naopak soli m-MeOBAP mesylát a m-MeOBAP nitrát mírně převyšují aktivitu BAP. Nízké antisenescenční vlastnosti vykazují p-topoliny a také o-topolin chlorid a o-topolin nitrát, jehož aktivita byla v senescenčním testu nulová, viz tab. 17. Grafické porovnání solí odvozených z BAP je uvedeno na obr. 21.

*Tab. 17: Relativní aktivita testovaných látek k BAP v senescenčním testu. Hodnoty všech látek jsou uvedeny při koncentraci 100 µM.*

Látka	Relativní aktivita k BAP [%]
BAP chlorid	104 ± (5)
BAP nitrát	75 ± (10)
BAP mesylát	56 ± (7)
m-topolin	108 ± (4)
m-topolin chlorid	104 ± (7)
m-topolin nitrát	nerozpuštěn
m-topolin mesylát	84 ± (13)

Látka	Relativní aktivita k BAP [%]
o-topolin	79 ± (15)
o-topolin chlorid	26 ± (6)
o-topolin nitrát	0
o-topolin mesylát	81 ± (15)
p-topolin	38 ± (5)
p-topolin chlorid	36 ± (6)
p-topolin nitrát	nerozpuštěn
p-topolin mesylát	22 ± (4)
m-MeOBAP	96 ± (6)
m-MeOBAP chlorid	84 ± (7)
m-MeOBAP nitrát	112 ± (6)
m-MeOBAP mesylát	129 ± (7)
kinetin	99 ± (4)
kinetin mesylát	97 ± (12)



Obr. 21: Srovnání aktivity solí odvozených od benzylaminopurinu v senescenčním biotestu

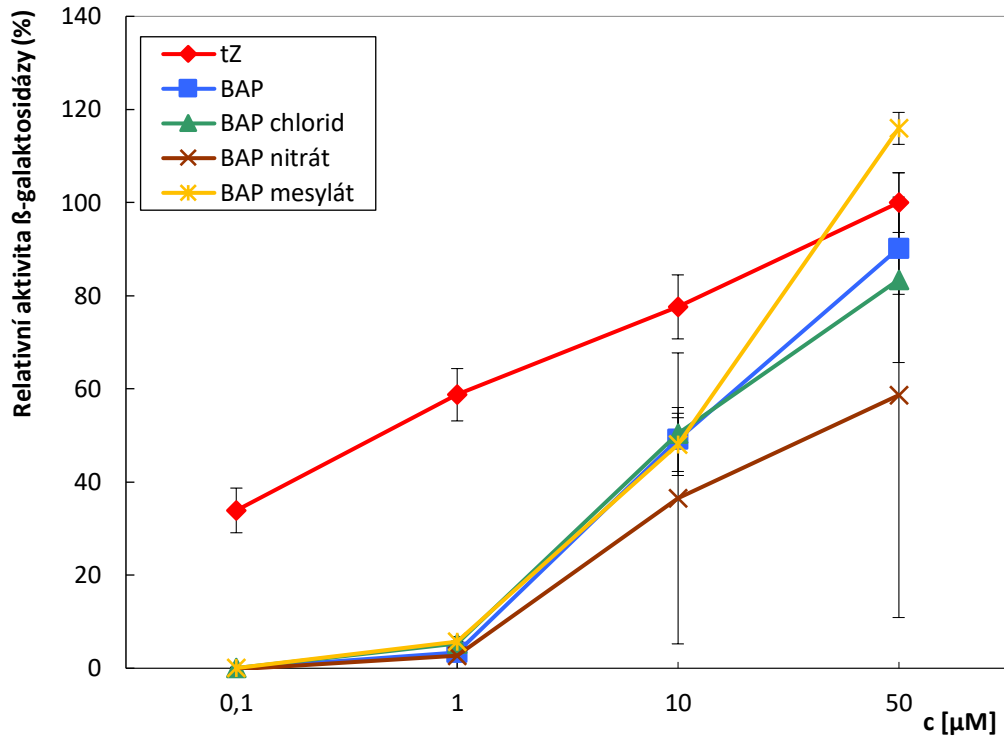
#### 4.5.3 Receptorový test

U receptorového testu byla sledována interakce a spuštění signální dráhy cytokininového receptoru CRE1/AHK4. Aktivita tZ, jakožto interního standardu, byla porovnávána s testovanými látkami. Výsledky jsou uvedeny v tab. 18. Optimální

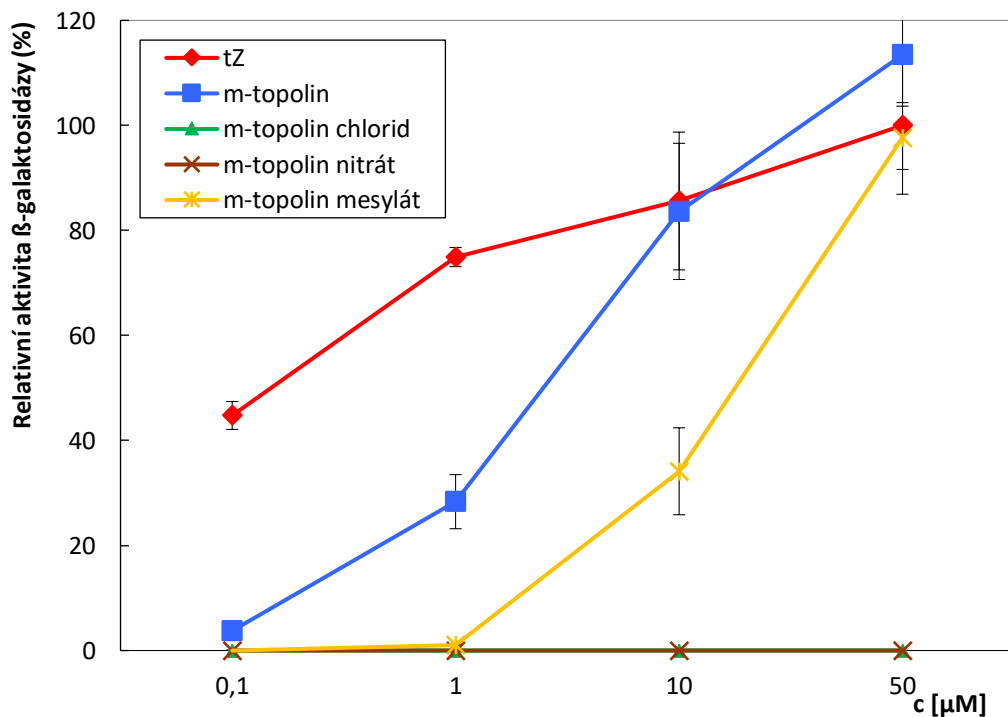
koncentrace pro interakci s CRE1/AHK4 receptorem byla 50  $\mu\text{M}$  u každé z hodnocených látek. Látky BAP nitrát, m-topolin chlorid a m-MeOBAP chlorid byly syntetizovány v rámci bakalářské práce (Klos, 2018) a zde byly pouze otestovány k lepšímu porovnání s ostatními látkami. U BAP a jeho solí je zřejmé, že interagují s receptorem v podobné míře jako tZ s výjimkou BAP nitrátu, jehož hodnotu z důvodu velké směrodatné odchylky nelze brát v úvahu. Látky odvozeny od m-topolinu či kinetinu stimulují cytokininový receptor AHK4 velmi podobnou měrou a jejich hodnoty jsou také srovnatelné s aktivitou tZ v nevyšší měřené koncentraci. V případě o-topolinu je nejvýraznější aktivita o-topolin nitrátu, který vysoce převyšuje aktivitu interního standardu při koncentraci 50  $\mu\text{M}$ . Naproti tomu soli p-topolinu a m-MeOBAP jsou neaktivní s výjimkou m-MeOBAP mesylátu, jehož aktivita je blízká aktivitě tZ. Z hlediska nižších koncentrací (1-10  $\mu\text{M}$ ) se aktivita tZ nevyrovnává žádná látka, výjimku tvoří kinetin, m-topolin a m-MeOBAP mesylát při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Grafické porovnání viz obrázky 22-27.

Tab. 18: Relativní aktivita testovaných látek k aktivitě tZ v receptorovém testu CRE1/AHK4.

Látka	Relativní aktivita k tZ [%]
BAP	90 $\pm$ (10)
BAP chlorid	83 $\pm$ (18)
BAP nitrát	59 $\pm$ (48)
BAP mesylát	116 $\pm$ (3)
m-topolin	113 $\pm$ (9)
m-topolin chlorid	91 $\pm$ (3)
m-topolin nitrát	87 $\pm$ (36)
m-topolin mesylát	98 $\pm$ (6)
o-topolin	56 $\pm$ (4)
o-topolin chlorid	86 $\pm$ (14)
o-topolin nitrát	175 $\pm$ (29)
o-topolin mesylát	87 $\pm$ (2)
p-topolin	3 $\pm$ (1)
p-topolin chlorid	4 $\pm$ (1)
p-topolin nitrát	1 $\pm$ (0)
p-topolin mesylát	2 $\pm$ (1)
m-MeOBAP	1 $\pm$ (0)
m-MeOBAP chlorid	5 $\pm$ (2)
m-MeOBAP nitrát	3 $\pm$ (1)
m-MeOBAP mesylát	90 $\pm$ (4)
kinetin	126 $\pm$ (3)
kinetin mesylát	71 $\pm$ (7)

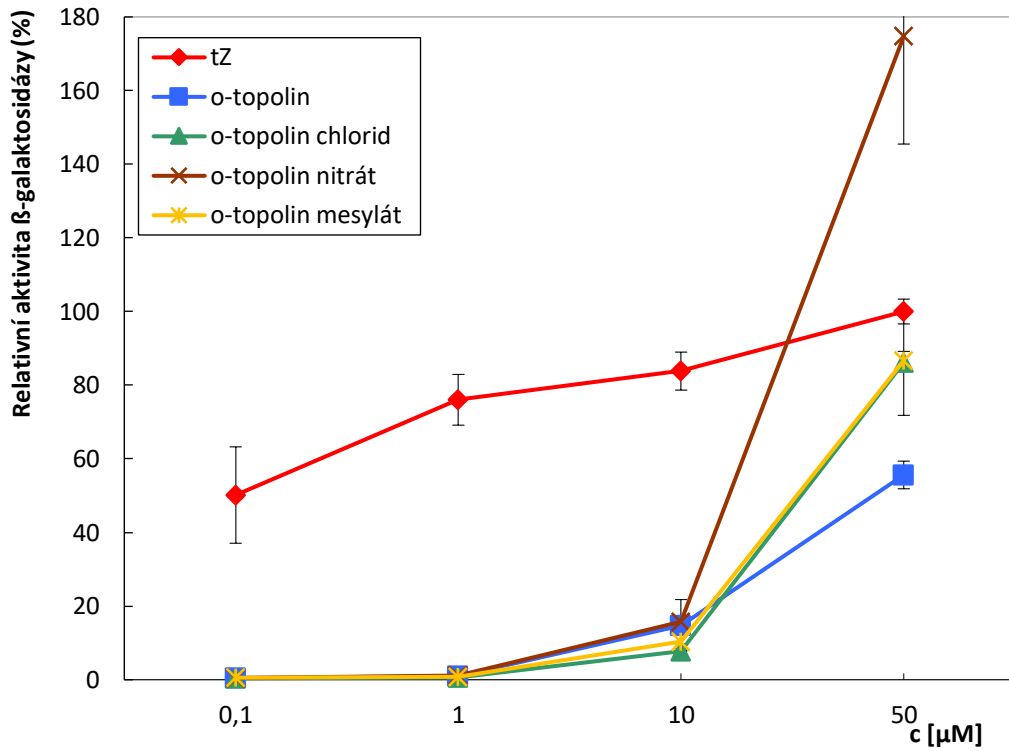


Obr. 22: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor CRE1/AHK4) na koncentraci připravených solí BAP.

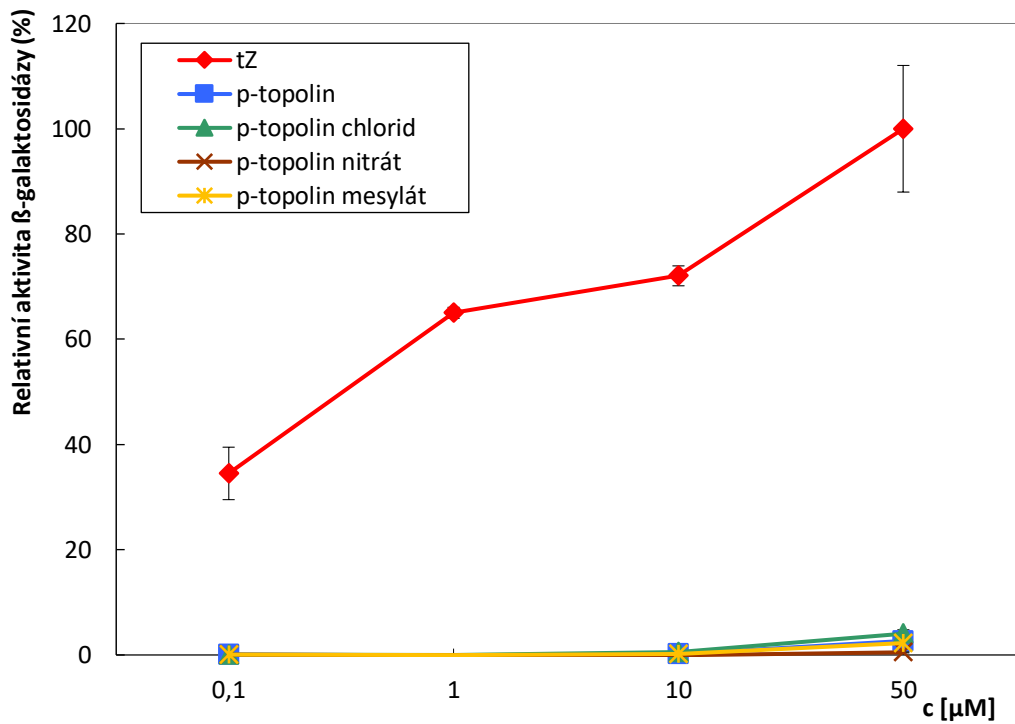


Obr. 23: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor AHK4) na koncentraci připravených solí m-topolinu.

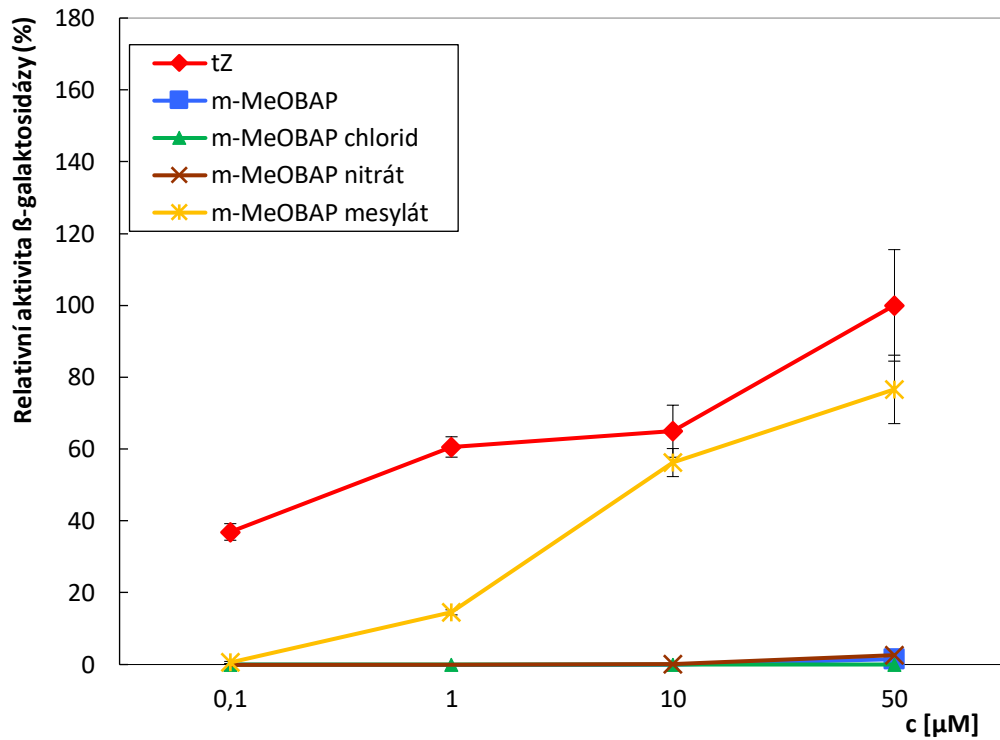




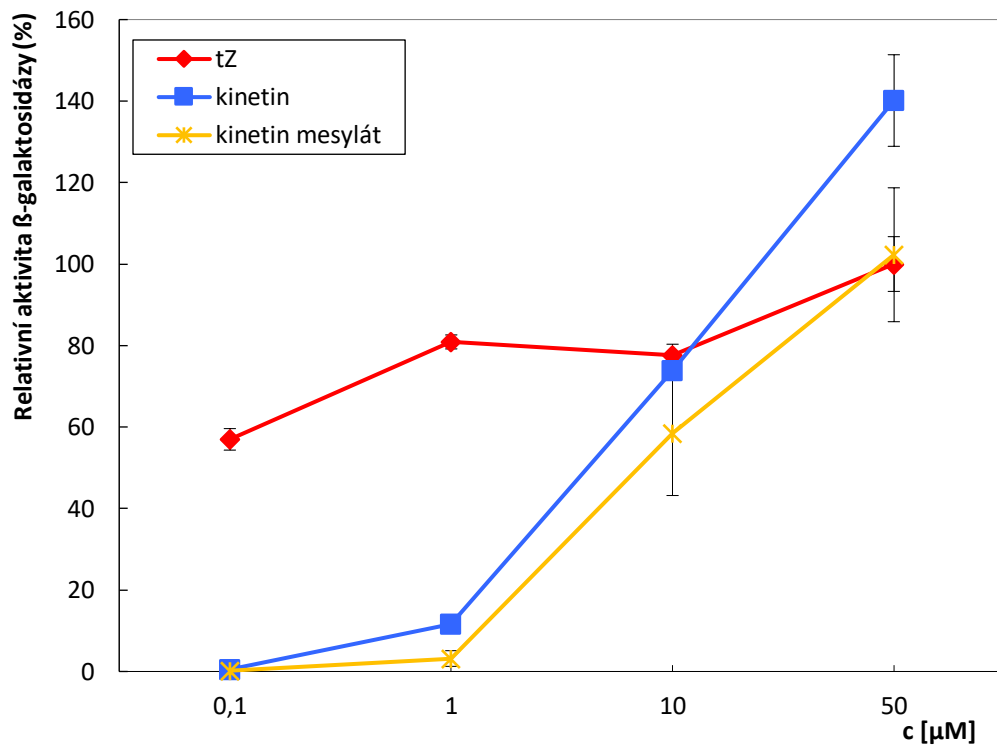
Obr. 24: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor AHK4) na koncentraci připravených solí o-topolinu.



Obr. 25: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor AHK4) na koncentraci připravených solí p-topolinu.



Obr. 26: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor AHK4) na koncentraci připravených solí m-topolinu.



Obr. 27: Závislost relativní aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (receptor AHK4) na koncentraci připravené soli kinetinu.

#### 4.6 Výsledky polního testu na jarním ječmeni var Francin

Byla testována aplikace nově připravených cytokininových solí na výnos jarního ječmene var. Francin. Aplikací nových látek a také látky BAP na jarní ječmen (var. Francin) se zvýšil počet silných odnoží o 36,11 až 55,56 % v porovnání s neošetřenou kontrolou. Naopak počet středních odnoží se snížil o 19,05 až 40,48 %. Došlo k navýšení počtu klasů na m<sup>2</sup> u všech testovaných látek o 6,62 až 12,06 % a také k celkovému výnosu zrna. Největší nárůst byl konkrétně u rostlin ošetřených pomocí m-topolin mesylátu a to o 8,03 %. Největší nárůst počtu klasů na m<sup>2</sup> (12,06 %) byl naopak pozorován u rostlin ošetřených pomocí BAP mesylátu. Lze říci, že použití mesylátů místo originálních cytokininů ovlivňuje tvorbu odnoží a zejména m-topolin mesylát kladně ovlivňuje i samotný výnos ječmene. Statistická významnost výsledku byla hodnocena pomocí t-testu. Pokud je hodnota t-testu mezi 0,01 – 0,05, tak je výsledek statisticky významný. V případě, že hodnota je menší než 0,01, je výsledek statisticky vysoce významný nebo naopak nad 0,05 statisticky nevýznamný, viz tab. 19.

Tab. 19: Výsledky polního testu

	Kontrola (neošetřeno)	BAP	m-topolin mesylát	BAP mesylát
Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]		5	5	5
Výnos zrna (t/ha) (vlhkost 14 %)	7,42	7,42	8,01	7,74
% srovnáno s kontrolou	100	100,13	108,03	104,34
T-Test		0,747	0,443	0,418
Silné odnože (počet)	1,8	2,8	2,45	2,75
% srovnáno s kontrolou	100	155,56	136,11	152,78
T-Test		0,001	0,018	0,001
Střední odnože (počet)	2,1	1,7	1,25	1,35
% srovnáno s kontrolou	100	80,95	59,52	64,29
T-Test		0,149	0,008	0,004
Slabé odnože (počet)	1,85	2,1	1,8	2,25
% srovnáno s kontrolou	100	113,51	97,3	121,62
T-Test		0,534	0,878	0,165
SUMA odnoží	5,75	6,6	5,5	6,35
% srovnáno s kontrolou	100	114,78	95,65	110,43

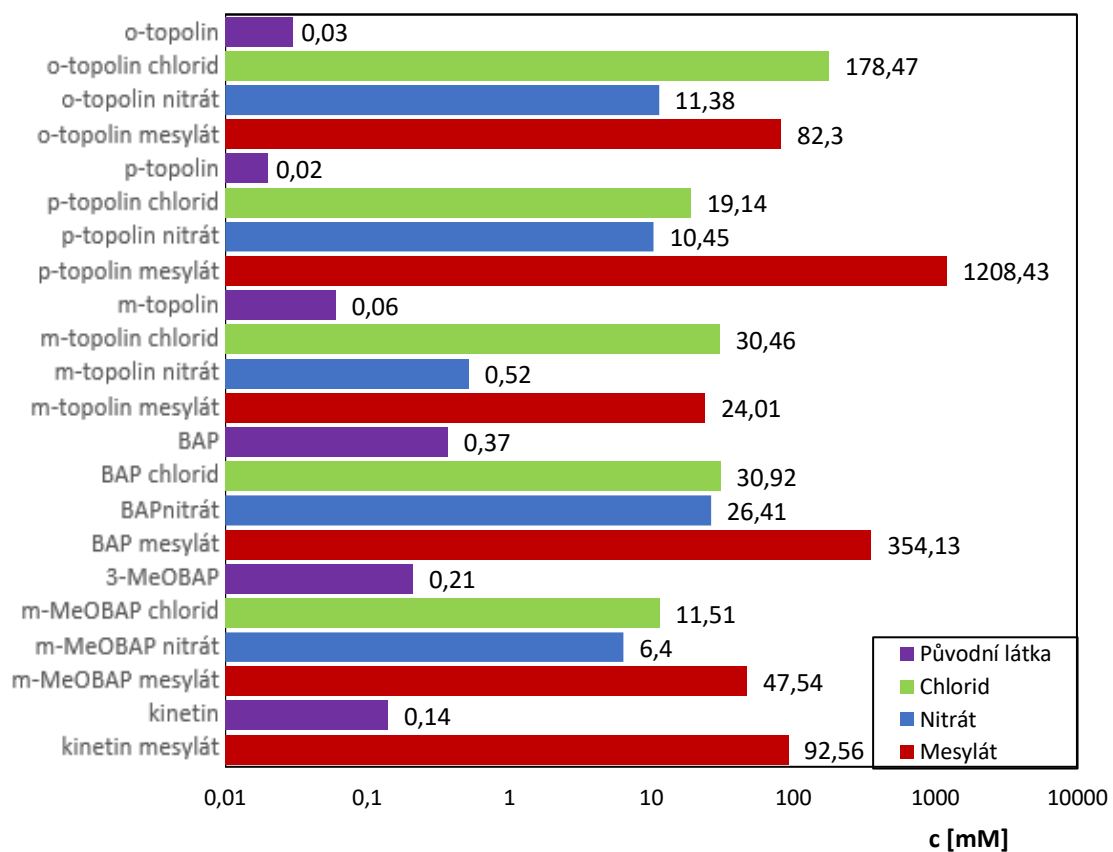
	Kontrola (neošetřeno)	BAP	m-topolin mesylát	BAP mesylát
T-Test		0,069	0,581	0,134
Výška rostlin [cm]	82,8	82,5	83,1	83,2
% srovnáno s kontrolou	100	99,64	100,36	100,48
T-Test		-	-	-
Počet klasů na m <sup>2</sup>	676,8	752	721,6	758,4
% srovnáno s kontrolou	100	111,11	106,62	112,06
T-Test		0,15	0,39	0,094

#### 4.7 Test rozpustnosti pomocí výpočtu z kalibrační křivky

U všech nových látek byla stanovena, pomocí výpočtu z plochy píků získaných z HPLC, rozpustnost v destilované vodě a byla zjištěna zpravidla lepší rozpustnost než u látek původních. V některých případech se rozpustnost zvýšila až tisíckrát jak je zřetelné z tab. 20 či obr. 28.

Tab. 20: Porovnání koncentrací původních látek ve vodě s látkami protonizovanými příslušnými kyselinami.

Původní látka	c původní látky [mM]	Protonizovaná látka	c protonizované látky [mM]
o-topolin	0,03	o-topolin chlorid	178,47
		o-topolin nitrát	11,38
		o-topolin mesylát	82,30
p-topolin	0,02	p-topolin chlorid	19,14
		p-topolin nitrát	10,45
		p-topolin mesylát	1208,43
m-topolin	0,06	m-topolin chlorid	30,46
		m-topolin nitrát	0,52
		m-topolin mesylát	24,011
BAP	0,37	BAP chlorid	30,92
		BAP nitrát	26,41
		BAP mesylát	354,13
m-MeOBAP	0,21	m-MeOBAP chlorid	11,51
		m-MeOBAP nitrát	6,40
		m-MeOBAP mesylát	47,54
Kinetin	0,14	Kinetin mesylát	92,56



Obr. 28: Porovnání rozdílů rozpustností mezi původními látkami a látkami protonizovanými příslušnými kyselinami. Pro lepší přehlednost je graf v logaritmickém měřítku.

## 5 Diskuze

Protonizace všech třinácti látek se obešla bez jakýchkoli problémů. Všechny třináct nově vzniklých solí aromatických cytokininů bylo charakterizováno pomocí metod EA, HPLC, LC-MS, NMR a XRPD a dvě látky dokonce pomocí monokrystalové rentgenostrukturní analýzy. Výsledky elementární analýzy potvrdily, že se jedná o sledované látky. Čistota všech látek byla větší než 99 %.  $^1\text{H}$  NMR analýza taktéž potvrdila strukturu nově syntetizovaných látek. Hmotnostní spektrometrie pouze potvrdila, že se stále jedná o tutéž látku a nenastala změna struktury, avšak nepotvrdila, jestli došlo k protonizaci. Anionty kyselin nebyly patrné v pozitivním ani negativním módu. Všechny záznamy protonizovaných cytokininů měly odlišný difraktogram od původních látek, tudíž rentgenová prášková difrakce potvrdila, že se jedná o krystalická chemická individua. V jednom případě, konkrétně u o-topolin chloridu, se difraktogram získat nepodařilo, jelikož byla připravená látka zřejmě amorfního charakteru a nepovedlo se ji vykrytalizovat.

U látek m-topolin mesylát a o-topolin mesylát se podařilo vypěstovat monokrystal. U m-topolin mesylátu je zřejmé, že ke zvýšení rozpustnosti přispívá nejen kyselina methansulfonová, který prohlubuje vazebné možnosti pro rozsáhlejší síť vodíkových můstků, ale pravděpodobně také zjevná změna v torzních úhlech oproti podobným sloučeninám, jejichž krystalová struktura byla publikována v minulosti (Umadevi et al., 2001; Raghunathan et al., 1983; Trávníček et al., 2004 a 2007). Je nutno podotknout, že změna rozpustnosti nebyla tak zásadní jako například u o-topolin mesylátu, u kterého došlo rovněž k výše zmíněným změnám. Důvodem je pravděpodobně molekula methanolu, která je jako solvent navázána na molekulu o-topolin mesylátu a stabilizuje krystalickou strukturu pomocí vodíkových vazeb, jak ukázala monokrystalová rtg difrakce.

Cytokininová aktivita jednotlivých, nově připravených solí byla stanovena pomocí kalusového, senescenčního a receptorového CRE1/AHK4 biotestu. Původní látky byly testovány v DMSO a jejich soli byly vždy rozpuštěny v destilované vodě. Z výsledků receptorového testu lze usuzovat, že u většiny cytokininových solí se adice kyseliny neprojevila významně na výsledné biologické aktivitě dané látky. V nižších koncentracích byly látky účinné, v porovnání s referenčním tZ, jen velmi zřídka. Mezi látky vykazující

cytokinovou aktivitu na receptorech CRE1/AHK4 patří kinetin, kinetin mesylát, m-topolin a m-MeOBAP mesylát. Aktivita kinetinu při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  se takřka shoduje s jeho již dříve publikovanou aktivitou (Spíchal et al., 2004). Překvapující je aktivita m-MeOBAP mesylátu, který v tomto receptorovém testu, jakožto jediný derivát m-MeOBAP, dosahoval biologické aktivity, což by mohlo být způsobeno změnou struktury způsobenou kyselinou methansulfonovou. Tato skutečnost by však musela být potvrzena pomocí rozsáhlejšího testování. V antisenesescenčním biotestu měla většina látek srovnatelné účinky jako referenční BAP. Soli BAP (nitrát, chlorid) dosahovaly lepších účinků než původní látka, naopak BAP mesylát dosahoval srovnatelné aktivity s původní látkou. Lze tedy říci, že adice solí neovlivnila negativně antisenesescenční účinek BAP, naopak ve formě iontů může být tento cytokinin účinnější v nižších koncentracích. Vyšší účinnost v nižších koncentracích platí také pro kinetin a kinetin mesylát. Ostatní látky mají srovnatelnou nebo nižší aktivitu než referenční BAP. Vyšší účinnost při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  má opět m-MeOBAP mesylát. Kalusový test opět podpořil myšlenku, že biologická aktivita se nijak zvlášť neliší mezi původní a protonizovanou formou cytokininu a většina látek dosáhla srovnatelných výsledků jako standard. Zde, stejně jako v předešlých dvou biotestech, vykazoval zvýšenou aktivitu m-MeOBAP mesylát a lze tedy říci, že biologická aktivita této soli je vyšší než u původní báze, jejíž aktivita koresponduje s již dříve publikovaným výzkumem (Doležal et al., 2006). Lze se domnívat, že její rozsáhlejší studie by mohla přinést slibné výsledky.

Polní experiment přinesl zajímavé výsledky o účincích dvou látek *in vivo*. Po ošetření jarního ječmene (var. Francin) pomocí m-topolin mesylátu vzrostl výnos zrna o 8,03 %. Naopak zvýšený počet klasů na  $\text{m}^2$  o 12,06 % byl zaznamenán u BAP mesylátu. Byla opět podpořena myšlenka, že adice kyseliny methansulfonové na příslušný cytokinin by mohl mít pozitivní vliv na účinek látky v rostlině *in vivo*. Z hlediska porovnání původní látky (BAP) a její soli (BAP mesylát) lze říci, že dosahovali velmi podobných výsledků. Ze statistického hodnocení polního experimentu pomocí t-testu vyplynulo, že z výsledků je statisticky významný počet silných odnoží u m-topolin mesylátu. Dále statisticky vysoce významný je počet silných odnoží u BAP a BAP mesylátu, a počet středních odnoží u m-topolin mesylátu a BAP mesylátu. Zbytek výsledku je možno považovat za statisticky nevýznamné. Zmíněné dvě látky vykazovaly slibné účinky na rostliny a určitě budou znovu testovány, případně i na jiných typech rostlin.

U všech protonizovaných látek se zvýšila rozpustnost ve vodě. Prokazatelně nejvyšší rozpustnosti dosáhl p-topolin mesylát, u kterého došlo ke zvýšení rozpustnosti více než 60000krát a následně BAP mesylát, kde došlo ke zvýšení téměř 1000krát. Vysoké rozpustnosti dosáhl také o-topolin chlorid s vysokou pravděpodobností právě proto, že byl amorfní. Velice zajímavé by bylo srovnání rozpustnosti jeho amorfní formy s formou krystalickou, což by mohlo být předmětem příštího studia. Je známo, že amorfní látky bývají často rozpustnější a mají vyšší biodostupnost, avšak jejich nevýhodou je nízká fyzikální a chemická stabilita (Kratochvíl et al., 2011). Další zajímavou látkou, u níž by mohlo být využitelné zvýšení rozpustnosti ve vodě, je kinetin. Kinetin má prokazatelný vliv na diferenciaci keratinocytů (Berge et al., 2006, 2008), působí preventivně na keratinocyty vystavené zářením UVB a snižuje tvorbu thyminových dimerů (McDaniel et al., 2005). Dále byl potvrzen jeho antiagregační efekt na trombocyty *in vitro* (Sheu et al., 2003) či *in vivo* (Hsiao et al., 2003), což by potencionálně mohlo vést k jeho využití jakožto prevence proti trombóze nebo k léčbě trombofilie. Ze tří použitých kyselin zvyšovala nejvíce rozpustnost kyselina methansulfonová, pravděpodobně z důvodu většího počtu vodíků ve své struktuře dostupných pro tvorbu vodíkových můstků. Soli kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné jsou v rozpustnosti srovnatelné. Je třeba brát v úvahu, že stanovení rozpustnosti cytokininových solí proběhlo pomocí výpočtu z kalibrační křivky a byla provedena pouze jedna sada měření, což znamená, že reálné hodnoty rozpustnosti se mohou mírně lišit.



## 6 Závěr

V této diplomové práci bylo připraveno třináct nových solí látek, které jsou odvozeny ze struktury substituovaného purinu, za použití tří různých kyselin. Fyzikálně-chemická charakterizace potvrdila, že došlo k protonizaci nově syntetizovaných látek. Látky m-topolin mesylát a o-topolin mesylát byly vykrystalizovány a jejich struktura byla detailně charakterizována pomocí rentgenové difrakce na jejich monokrystalech. Methanol, pozorován jakožto součást krystalické soustavy o-topolin mesylátu, má pravděpodobně zásadní vliv na zvýšení rozpustnosti. Z cytokininových biotestů je patrné, že vytvoření soli cytokininu nemá negativní vliv na jeho biologickou aktivitu. Naopak v některých případech došlo k razantnímu zlepšení biologické aktivity, například u m-MeOBAP mesylátu. Potvrzení a určení důvodů, proč tomu tak je, by mohlo být předmětem následující práce. Látky m-topolin mesylát a BAP mesylát dosáhly pozitivních výsledků při testech *in vivo*, avšak pro jednoznačné stanovení jejich aktivity by bylo nutné je podrobit rozsáhlejšímu testování. V testu rozpustnosti dosáhly zlepšené rozpustnosti prakticky všechny látky. Nejvýrazněji však rozpustnost aromatických cytokininů ve vodě ovlivnila kyselina methansulfonová. Z tohoto důvodu se její použití jeví jako nejlepší varianta ke zlepšení rozpustnosti dalších látek v příštích pracích.

## 7 Seznam literatury

Aremu, A., Bairu, M., Szüčová, L., Finnie, J. and Van Staden, J. (2012). The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. *Journal of Plant Physiology*, 169(15), pp.1530-1541.

Berge, U., Kristensen, P., Rattan, S. (2006). Kinetin-Induced Differentiation of Normal Human Keratinocytes Undergoing Aging in Vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1067. 332-6.

Berge, U., Kristensen, P., Rattan, S. (2008). Hormetic modulation of differentiation of normal human epidermal keratinocytes undergoing replicative senescence in vitro. *Experimental gerontology*. 43. 658-62.

Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*. 262(5136):1051-1054.

Bunge, H. J., Esling, C. (1982). *Quantitative Texture Analysis*. DGM. Oberursel.

Davies, P. J. (2004). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Press, the Netherlands.

Davies, P. J. (2010). "The plant hormones: their nature, occurrence, and functions," in *Plant hormones*. Ed. Davies P. J, 1–15.

Doležal, K., Popa, I., Kryštof, V. (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 14(3):875-884.

Emery, R. J. N., Lepoint, L., Barton, J. E., Turner, N. C., Atkins, C. A. (1998). *cis*-Isomers of cytokinins predominate *Cicer arietinum* throughout their development. *Plant Physiol*; 117:1515–1523.

Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Žižková, E., Hanuš, J., Dančák, M., Trávníček, B., Pešek, B., Krupička, M., Vaňková, R., Strnad, M. (2011). Distribution, biological activities,

metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 2827-2840.

Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Kollmer, I., Schmülling, T. and Frébort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* 26, 255-267.

Graaf, M., McHenry, M. (2007). *Structure of Materials. An Introduction to Crystallography, Diffraction and Symmetry.* Cambridge University Press.

Guo, Y., Gan, S. (2005). Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Curr Top Dev Biol* 71: 83–112

Hanzlíková, K. (2014). *Růst monokrystalů a jejich základní charakterizace.* Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.

Harrison, M. A. (2012). Cross-Talk Between Phytohormone Signaling Pathways Under Both Optimal and Stressful Environmental Conditions, in: *Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants.* Springer, Berlin, Heidelberg, 49–76.

Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. and Strnad, M. (1998). Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*, 26, pp. 109-115.

Hothorn, M., Dabi, T. and Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* 7, 766-768.

Hsiao, G., Shen, M. Y., Lin, K. H., Chou, C. Y., Tzu, N. H., Lin, C. H., Chou, D. S., Chen, T. F., Sheu, J. R. (2003). Inhibitory activity of kinetin on free radical formation of activated platelets in vitro and on thrombus formation in vivo. *European journal of pharmacology.* 465. 281-7.

Julian, M. M. (2015). *Foundations of Crystallography.* CRC Press. Taylor & Francis Group. Second edition.

Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4), dev149344.

- Klos, D. (2018). Příprava a vlastnosti vybraných protonizovaných cytokininů. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Kratochvíl, B., Hušák, M., Brynda, J., Sedláček, J. (2008). Co nabízí současná RTG strukturní analýza?, Chem. Listy 102, 889-901.
- Kratochvíl, B., Hušák, M., Korotková, E., Jegorov, A. (2016). Význam stanovení rtg krystalových struktur pro farmacii, Chem. Listy 110, 40-47.
- Kratochvíl, B., Koupilová, I. (2011). Farmaceutické amorfny hydráty, Chem. Listy 105, 3-7
- Kraus, I. (1985). Úvod do strukturní rentgenografie. Academia. Praha
- Kraus, I., Trofimov, V. V. (1988). Rentgenová tenzometrie. Academia. Praha 1988.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., and Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature 445 652–655.
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. Plant Cell. 21(10):3152-3169.
- Letham, D. S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays. Life Sci. 2:569-573.
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V., Schmölling, T., Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. Journal of Experimental Botany 66: 1851-1863.
- Luštinec J., Žárský V. (2003) Úvod do fyziologie vyšších rostlin, pp. 179, 195-196, Karolinum, Praha.
- Macháčková, I. (1998). Růstové regulátory. In: Leinerová E (ed): Fyziologie rostlin. Pp. 240–285.
- McDaniel, D., Neudecker, B., Dinardo, J., Lewis, J., Maibach, H. (2005). Idebenone: A new antioxidant - Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants. Journal of cosmetic dermatology. 4. 10-7.

- McGaw, B. A., Burch, L. R. (1995). Cytokinin biosynthesis and metabolism. - In *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (P. J. Davies, ed.), pp. 96-117.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955b). Structure and synthesis of kinetin. *J Am Chem Soc* 78: 2662–2663.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okomura, F. S., von Saltza, M. H. and Strong, F. M. (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1345-1350.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 89-118.
- Mok, David, W. S. (1994). *Machteld C Cytokinins : chemistry, activity, and function*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 218.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473-497.
- Newnham, R. E. (2005). *Properties of Materials. Anisotropy. Symmetry. Structure*. Oxford University Press.
- O'Brien, J. A., Benkova, E., 2013. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses, *Front. Plant Sci.* 4 451.
- Plíhalová, L., Vylíčilová, H., Doležal, K., Zahajská, L., Zatloukal, M., Strnad, M. (2016). Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology, Plant Biotechnology: Green for Good III, Olomouc*, 15 – 18 June 2015 33, 614–624.
- Pospíšilová, J. (2003a). Interaction of Cytokinins and Abscisic Acid During Regulation of Stomatal Opening in Bean Leaves. *Photosynthetica* 41, 49–56.
- Pospíšilová, J. (2003b). Participation of Phytohormones in the Stomatal Regulation of Gas Exchange During Water Stress. *Biologia Plantarum* 46, 491–506.
- Raghunathan, S., Sinha, B. K., Pattabhi, V., Gabe, E. J. (1983). *Acta Crystallographica, Section C: Crystal Structure Communications*, 39, 1545.

- Röntgen, W. C. (1896): Nature, 53, 274-276.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annu Rev Plant Biol. 57:431-449.
- Sheu, J. R., Hsiao, G., Shen, M. Y. (2003). Inhibitory mechanisms of kinetin, a plant growth-promoting hormone, in platelet aggregation. Platelets. 14(3):189-196.
- Spíchal, L. (2012). Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. Funct. Plant Biol. 39, 267.
- Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. Plant Cell Physiol. 45 1299–1305.
- Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., Schmölling, T. (2004). Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay, Plant and Cell Physiology, Volume 45, Issue 9, 15, Pages 1299–1305.
- Szüčová, L., Zatloukal, M., Spíchal, L., Voller, J., Doležal, K., Strnad, M., Massino, F.J. (2011). 6,9-disubstituted purine derivatives and their use as cosmetic and cosmetic compositions, ÚEB AV ČR, USA/USPTO US7960397.
- Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. Journal of Biological Chemistry. 279:41866-41872.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., Friml J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development Cell. Mol. Life Sci., 63, pp. 2738-2754.
- Tarkowski, P., Doležal, K., Strnad, M. (2004). Analytical methods in cytokinin research. Chem. listy 98: 834-841.
- Trávníček, Z., Kara, G., Matiková-Mařarová, M., Baran, P. (2007). 6-(4-Hydroxy-benzyl-amino)purin-3-ium chloride: A protonated form of para-topoline. Acta

*Crystallographica*, Section E-structure Reports Online - ACTA CRYSTALLOGR E-STRUCT REP. 63.

Trávníček, Z., Maloň, M., Šindelář, Z., Doležal, K., Rolčík, J., Kryštof, V., Strnad, M., Marek, J. (2001). Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine (HL1) or 6-(3-chlorobenzylamino)purine (HL2). The single-crystal X-ray structure of [Cu(H+L2)2Cl3]Cl·2H2O. *Journal of Inorganic Biochemistry* 84: 23-32.

Trávníček, Z., Popa, I., Doležal, K. (2004). CCDC 251323: Experimental Crystal Structure Determination.

Umadevi, B., Stanley, N., Muthiah, P. T., Bocelli, G., Cantoni, A. (2001). *Acta Crystallographica*, Section E: Structure Reports Online, 57, o881.

Valvoda, V., Polcarova, M., Lukáč, P. (1992). *Základy strukturní analýzy*. Karolinum. Praha. 1992.

Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. and Schmölling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol. (Stuttg.)* 8, 371-381.

Westhoff, G., Kramer, H. J. M., Jansens, P., Grievink, J. (2004). Design of a multifunctional crystallizer for research purposes. *Chemical Engineering Research & Design - CHEM ENG RES DES.* 82. 865-880.

Zalabák, D., Galuszka, P., Mrízová, K., Podlešáková, K., Gu, R., Frébortová, J. (2014). Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol. Biochem.* 74, 283-293.