

Univerzita Palackého v Olomouci



Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

Bakalářská práce

Typy testované biologické aktivity Zn(II) komplexů s N-donorovými ligandy odvozenými od purinového skeletu

Vypracoval: Ivan Saksa

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Radka Křikavová, Ph.D.

Studijní obor: Chemie

Studijní program: Bioanorganická chemie

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci *Typy testované biologické aktivity Zn(II) komplexů s N-donorovými ligandy odvozenými od purinového skeletu* vypracoval samostatně, pod odborným vedením vedoucí bakalářské práce Mgr. Radky Křikavové, Ph.D., a že jsem použil pouze literární a elektronické zdroje uvedené v práci.

V Olomouci, 30.4.2014

.....

Obsah

1.	Úvod a cíle práce	1
2.	Zinek.....	3
2.1	Vlastnosti	3
2.2	Biologická funkce.....	4
2.2.1	Úloha zinku v Alzheimerově chorobě.....	7
2.2.2	Role zinku při prevenci a léčbě rakoviny prostaty	8
3.	Purinové deriváty	10
3.1	Merkaptopurin a azathioprin	11
3.1.1	Obecné vlastnosti	11
3.1.2	Metabolismus a účinky azathioprinu a 6-merkaptopurinu	11
3.1.3	Leukémie	14
3.2	Zn(II) komplexy s deriváty purinu	15
3.2.1	Kinetin.....	16
3.2.2	Zn(II) komplexy s kinetinem.....	16
3.2.3	Biologická aktivita	17
3.3	Olomoucín	18
3.3.1	Objev a vlastnosti	18
3.3.2	Připravené Zn(II) komplexy	19
3.3.3	Biologická aktivita	19
4.	Praktická část.....	21
4.1	Přehled použitých analytických metod.....	21
4.1.1	Elementární analýza	21
4.1.2	Hmotnostní spektrometrie	21
4.1.3	NMR.....	22
4.1.4	Infračervená spektrometrie.....	23
4.1.5	Konduktometrie.....	23

4.1.6	Termická analýza	24
4.2	Experimentální část	24
4.2.1	Syntéza ligandů	24
4.2.2	Komplex 1	28
4.2.3	Komplex 2	29
4.2.4	Komplex 3	31
4.2.5	Komplex 4	32
4.2.6	Komplex 5	33
4.2.7	Ostatní provedené syntézy	34
4.3	Diskuze a výsledky	35
4.3.1	Komplex 1	35
4.3.2	Komplex 2	37
4.3.3	Komplex 3	38
4.3.4	Komplex 4	39
4.3.5	Komplex 5	40
5.	Závěr.....	42

1. Úvod a cíle práce

Bioanorganická chemie je odvětví chemie zabývající se chováním a funkcí kovových iontů v organismu. Velký rozvoj bioanorganické chemie nastal v druhé polovině 20. století, kdy docházelo i k velkému rozvoji analytických metod, které umožnily lépe studovat a pochopit funkci některých kovů v lidském organismu (např. se podařilo určit strukturu a funkci hemoglobinu). V současné době je pro farmaceutický průmysl perspektivní studium komplexních sloučenin vykazujících biologickou aktivitu. Zinek je esenciální biogenní prvek a v lidském těle jsou zinku přibližně 2 g. Biologická dostupnost zinku umožňuje jeho využití, jako centrálního atomu v komplexních sloučeninách a v kombinaci s organickým ligandem vykazujícím také biologickou aktivitu, mohou vznikat potenciálně biologicky aktivní komplexy. Cílem přípravy komplexů je tedy zvýšení biologické aktivity, oproti samotnému ligandu, např. připravené Zn(II) komplexy s olomoucínem (inhibitor cyklin-dependentní kinázy) vykazují výrazně vyšší cytotoxickou aktivitu, než samotný olomoucín. Komplexy nemusí vykazovat pouze protinádorovou aktivitu, ale i např. aktivitu antibakteriální, protizánětlivou atd. Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše na zadané téma, a v praktické části bylo cílem připravit a charakterizovat Zn(II) komplexy s deriváty 6-merkaptopurinu (6-MP).

V první části své bakalářské práce se věnuji charakterizaci zinku, především s akcentem na jeho biologickou funkci, jako je, např. jeho role v enzymech, při rakovině prostaty a celková důležitost zinku pro imunitu lidského organismu.

V druhé části se věnuji purinovým derivátům. Je zde popsán metabolismus 6-MP, který se využívá především při léčbě leukémie a jako imunosupresivum, a jeho deriváty jsou použity v praktické části jako ligandy. Dále jsou zde popsány další purinové deriváty vykazující biologickou aktivitu (kinetin, olomoucín) a jejich připravené Zn(II) komplexy.

Praktická část je rozdělena na tři podkapitoly. První podkapitola se věnuje popisu použitých analytických metod, přístrojů a případných podmínek měření. V experimentální části jsou popsány syntézy vybraných látek a výsledky měření. V diskuzi je uvedeno okomentování výsledků analýz a návrh pravěpodobné struktury látky.

Cíle bakalářské práce tedy jsou:

1. Vypracování literární rešerše týkající se problematiky zinku v biologických systémech, Zn(II) komplexů s N-donorovými ligandy odvozenými od purinového skeletu a jejich biologické aktivity.

2. Zvolit vhodný syntetický postup pro přípravu potenciálně biologicky aktivních Zn(II) komplexů s vybraným derivátem purinu (konkrétně s deriváty 6-merkaptopurinu).

2. Zinek

2.1 Vlastnosti

Zinek patří společně s kadmíem (Cd) a rtutí (Hg) do 12. skupiny periodické tabulky prvků a je v zemské kůře zastoupen v poměrně velkém množství 76 mg/kg. Při tuhnutí zemské kůry se vyloučil v sulfidové fázi (ZnS) a jeho nejdůležitějšími sloučeninami jsou tedy sulfidy. Vlivem povětrnostních podmínek docházelo později k vyluhování zinku a jeho srážení ve formě uhličitanu, křemičitanu nebo fosforečnanu. Elektronová konfigurace zinku je $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^2$. Vzhledem ke stabilitě zaplněných d orbitalů (které se tedy neúčastní vazby s ligandy v komplexních sloučeninách) mají tyto prvky jen málo z charakteristických vlastností přechodných kovů a podle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii IUPAC je tedy mezi přechodné prvky neřadíme. Pro zinek je typické oxidační číslo $+II$. Jelikož konfigurace d^{10} neumožňuje žádnou stabilizaci krystalovým polem, závisí stereochemie jednotlivých sloučenin na velikosti a polarizační schopnosti kationtu M^{II} a stereochemických požadavcích ligandů. Zn(II) upřednostňuje tetraedrické komplexy s koordinačním číslem 4, ale může tvořit i komplexy s koordinačními čísly 5 a 6. Zinek má tendenci k tvorbě kovalentních sloučenin a tvoří stabilní komplexy nejen s ligandy, ve kterých je donorový atom kyslík (O), ale i dusík (N) a síra (S). Stabilní komplexy vznikají také s kyanidy a halogenidy. Koordinace ligandů na přechodné prvky je popsána Pearsonovou teorií, nebo-li hard-soft principem. Pearsonova teorie rozděluje Lewisovy kyseliny a zásady na měkké a tvrdé. Zásady jsou donorem elektronového páru, zatímco kyseliny jsou akceptorem elektronového páru. Vlastnosti a zástupci jednotlivých skupin jsou uvedeni v Tabulce 1. Komplexní částice se vytvoří interakcí měkké kyseliny a měkké báze nebo tvrdé kyseliny a tvrdé báze. Podle hard-soft teorie je zinek hraniční Lewisova kyselina, která se váže na donorové atomy jako N, O a S.[1, 2, 3]

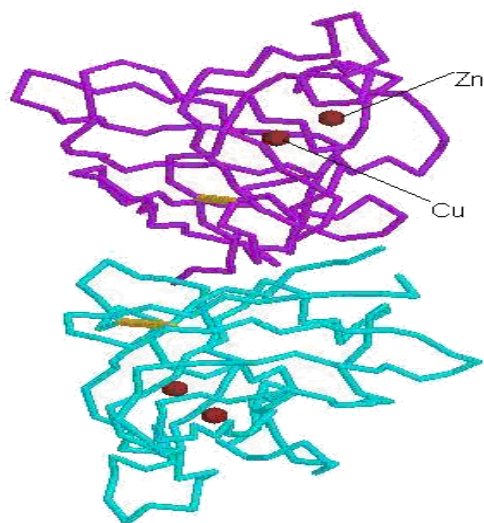
	Vlastnosti	Zástupci
Měkká zásada	Nízká elektronegativita donorového atomu, lehko oxidovatelný a polarizovatelný, má energeticky nízko ležící obsazené orbitály	H^- , SO_3^{2-} , CN^-
Tvrdá zásada	Vysoká elektronegativita donorového atomu, málo polarizovatelný a oxidovatelný, má energeticky vysoko ležící neobsazené orbitály	NH_3 , N_2H_4 , OH^-
Měkká kyselina	Malý kladný náboj akceptorového atomu, velký iontový poloměr, lehce	Pt^{2+} , Au^+ , karbeny

	polarizovatelné valenční elektrony	
Tvrdá kyselina	Velký kladný náboj akceptorového atomu, malý iontový poloměr, má lehce polarizovatelné elektrony	H^+ , Li^+ , Co^{3+}
Hraniční kyselina		Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}
Hraniční zásada		NO_2^- , SO_3^{2-} , N_2

Tabulka 1: Uvedený přehled dělení látek podle hard-soft teorie

2.2 Biologická funkce

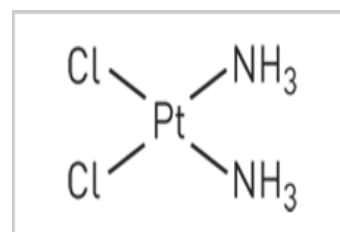
Zinek patří mezi esenciální prvky a v lidském organismu se vyskytuje v oxidačním stavu +II. Je důležitý pro funkci více než 300 enzymů (např. superoxid dismutáza (SOD) viz. dále), stabilizaci a syntézu DNA, genovou expresi, pro přenos nervových signálů, růst, imunologické funkce atd. V roce 1961 byla vyslovena hypotéza, že nedostatek zinku hraje hlavní roli v tzv. trpasličím syndromu (extrémní poruchy růstu). Tato hypotéza se v pozdějších letech ukázala víceméně jako pravdivá. Nedostatek zinku hraje důležitou roli, ale ke vzniku nemoci je zapotřebí i dalších faktorů, jako např. umožnění mutace chromozomu. Deficit zinku se může projevit také pomalým hojením ran, očními chorobami, ztrátou nebo oslabením sluchu, zraku (špatné vidění za šera) a také zhoršením paměti a nechtěným úbytkem na váze. Závažný nedostatek způsobuje zpomalení a poruchy buněčného dělení a celkově buněčného růstu. Lidské tělo obsahuje v průměru 2-3 g zinku (doporučená denní dávka zinku je 12 mg pro ženy, 15 mg pro muže a 7 mg pro dítě). Lidské tělo dokáže zinek získat jediné z potravy, přičemž významnými zdroji zinku jsou plody moře (zejména ústřice), hovězí, vepřové i drůbeží maso, játra, vejce, mléko a mléčné výrobky. Z rostlinných zdrojů je zinek nejvíce obsažen v celozrnných obilovinách, luštěninách, ořeších a semínkách. Jeho největší koncentrace v lidském těle je v prostatě, mozku, ledvinách, plicích a kostech. Většina zinku se nachází uvnitř buněk – 30-40 % v jádře, 50 % v organelách a cytoplasmě a zbytek v buněčné membráně.[4] Zinek funguje u enzymů často jako kofaktor, tzn. nebiřkovinná část enzymů, a je součástí oxidoreduktáz, hydroláz, ligáz, lyáz a transferáz. Obecně přibližně jedna třetina ze



Obrázek 1: Příklad metaloenzymu, struktura SOD s vyznačenými atomy Zn a Cu [4]

všech enzymů jsou metaloenzymy, v kterých hrají kovové ionty katalytické nebo strukturní role. Důležité pro studium role kovů v organismu jsou také způsoby, kterými se kovové ionty dostanou do buněk (např. zinkový transportér ZIP1 popsáný dále v kapitole 2.2.2 nebo sodíkové pumpy) a následně do těchto metaloenzymů (v případě zinku je za to zodpovědný především protein metalothionein) a celková metaloregulace, která popisuje, jaký vliv má koncentrace kovového iontu na aktivaci nebo deaktivaci genů. [4]

Řada farmaceutických postupů a přípravků využívá kovových iontů. Nejznámějším příkladem je využití cis-platiny při chemoterapii rakovinných nádorů, která je velmi využívána při léčbě pokročilých nádorů s 80-90 % úspěšností. Cytostatika mají, obecně za úkol zničit rychle se množící buňky, mezi něž nádorové buňky patří. Na rozdíl od jiných kovů jako vanad a platina, jejichž sloučeniny byly testovány pro jejich protinádorové vlastnosti, zinek nepodléhá ve fyziologických podmínkách oxidaci nebo redukci. Vzhledem k zjištěným cytotoxickým vlastnostem zinku (např. při rakovině prostaty viz. kap 2.2.2) se nyní prozkoumává použitelnost jeho sloučenin k chemoterapii rakoviny vaječníku a prostaty, pro jejichž léčbu jsou v současné době omezené možnosti.



Obrázek 2: Struktura cisplatiny

Sloučeniny zinku mají jiný mechanismus účinku než nejčastěji používaná cytostatika jako cisplatina, doxorubicin nebo paclitaxel, takže může být použit jako primární léčivo nebo jako druhá linie obrany proti chemoresistentním nádorům.[5]

Zinek se používá také v dalším odvětví farmaceutického průmyslu, které se zabývá posílením imunity organismu. Zinek je pro tuto roli vhodný, protože je v těle přítomný v relativně vysokých koncentracích a váže se na některé donorové atomy přítomné v proteinech. Při nedostatku zinku může docházet až k virovým, bakteriálním a plísňovým infekcím. Velké množství buněčných složek imunitní odpovědi organismu je založeno na zinku a ten je důležitý především pro zrání, aktivitu a funkci T-buněk (druh lymfocytů), protože působí jako kofaktor hormonu Thymulinu. Proto je nedostatek zinku spojován se snížením syntézy T-buněk, po mitogenní stimulaci (mitogen je chemická látka (nejčastěji protein), která povzbuzuje buňky k buněčnému dělení). Aktivita T-buněk je regulována koncentrací zinku v séru, nízká hladina zinku zvýší abnormální funkce, zatímco vysoké množství zinku potlačuje funkci T-buněk. Ideální koncentrace fyziologického zinku pro optimální funkci T-buněk je 12-16 μM . Tým pod vedením doktora Rinka zhodnotil efekt zinku na imunitní systém studiem *in vitro* a *in vivo* a využil jevu chemotaxe. Chemotaxe je jev, při kterém somatické buňky, bakterie a další jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy řídí svůj pohyb v závislosti na koncentraci látek v jejich prostředí. Tento jev je velmi důležitý pro bakterie,

kteře se při hledání potravy pohybují na místo s nejvyšší koncentrací látky (např. glukóza), a nebo naopak, při výskytu toxické látky (např. fenol) se snaží toto místo opustit. U vícebuněčných organismů je chemotaxe důležitá např. u pohybu spermií k vajíčku nebo k pohybu právě výše popsaných T-buněk. Při testování se podařilo prokázat, že koncentrace zinku je velmi důležitá pro aktivitu a pohyb T-buněk, protože při snížené hladině zinku došlo ke snížení chemotaxe bílých krvinek.[6]

U zinku jsou prokázány také antioxidační účinky. Jako antioxidanty označujeme látky, které omezují škodlivý efekt volných radikálů. Volné radikály jsou takové látky, které mají jeden nebo více nepárových elektronů. Klasickým příkladem antioxidantu je např. vitamín E. Nikdy nebylo prokázáno, že zinek interaguje přímo s oxidačními látkami, ale působí spíše nepřímým způsobem a to tak, že stabilizuje strukturu buněčné membrány, je součástí SOD, udržuje tkáňovou koncentraci metalothioneinu (dále bude používána zkratka MT) a má ochranný efekt proti úbytku vitamínu E. Cu, Zn-SOD je důležitý antioxidant a patří do skupiny enzymů oxidoreduktáz. Zinek má v SOD strukturní funkci, zatímco měď má funkci disproportionační. Hlavní funkcí SOD je katalyzovat disproportionaci superoxidového radikálu na H_2O_2 a O_2 podle rovnic:

1. $Cu^{2+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Cu^+ + O_2$
2. $Cu^+ + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow Cu^{2+} + H_2O_2$
3. $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Lidské tělo si superoxid syntetizuje v mitochondriích, protože je využíván především imunitním systémem k eliminaci cizorodých látek. Působení superoxidu je pro buňky velmi nebezpečné, protože dochází k předávání elektronu dalším molekulám, což má v konečném důsledku za následek poškození buňky. Proto je nadbytečný superoxid dále metabolizován na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je pro buňky také toxický, proto je dále disproportionován pomocí enzymu katalázy na kyslík a vodu podle rovnice: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Zajímavostí je, že mnoho druhů bakterií katalázu nemá, a proto je proti nim peroxid vodíku velmi účinný (jeho zvýšená koncentrace vede k ničení buněk). SOD ve své struktuře může obsahovat kromě mědi a zinku i nikl, železo a mangan. Tyto jednotlivé druhy SOD se od sebe liší strukturou i umístěním. Nejvíce SOD je v cytosolu (Zn-Cu SOD), ale je přítomna i v mitochondriích (Mn-SOD) a v mezibuněčném prostoru.[7, 8]

Zinkový MT je protein, který má ve své struktuře ionty $Zn(II)$ a má v organismu mnoho funkcí, jako je ochrana proti oxidačnímu stresu, detoxikace těžkých kovů, má velký vliv na metabolismus zinku a jeho začlenění do struktury metaloenzymů atd. Savci mají 4 formy MT (-1, -2, -3 a -4). V lidském těle je MT syntetizován v ledvinách a játrech. Nedávné výzkumy

prokázaly, že ochranný efekt zinkového MT je v porovnání s MT s jinými antioxidanty, jako jsou albumin a glutation, výrazně větší. Porovnával se i účinek MT vázaného na jiné kovy (měď a kadmium), ale MT vázaný na zinek měl výrazně vyšší účinek.[9]

Mezi velkou skupinu zinečnatých proteinů patří tzv. zinkové prsty (přeloženo z anglického originálu Zinc fingers). Tyto proteiny mají mnoho rolí při regulaci apoptózy, vázání lipidů, syntézy proteinů a působí především jako transkripční faktory (jejich účelem je rozpoznávat specifické sekvence DNA). Mezi velmi častý zinkový prst u eukaryot patří Cys₂His₂ bohatý na sekvence cysteinu a histidinu.[10]

Vysoká koncentrace zinku vzhledem k ostatním orgánům je v mozku, kde hraje důležitou roli pro kapacitu mozku, ukládání a vybavování informací. Jeho důležitá role v mozku je spojena s jeho přítomností v synaptických váčcích (ty jsou přítomny v axonech) vedoucí k následnému přenosu informací (zprostředkovává interakci receptoru a neurotransmiteru). Je velmi důležitý především pro GABA receptory (GABA-kyselina gama aminomáselná). GABA slouží, jako důležitý neurotransmitter tzn., že přenáší chemický signál mezi dvěma neurony. Takto vázaný zinek tvoří jen 8 % obsahu zinku v mozku. Zbytek zinku v mozku je vázán především v enzymech, v kterých vystupuje jako kofaktor.[11, 12]

2.2.1 Úloha zinku v Alzheimerově chorobě

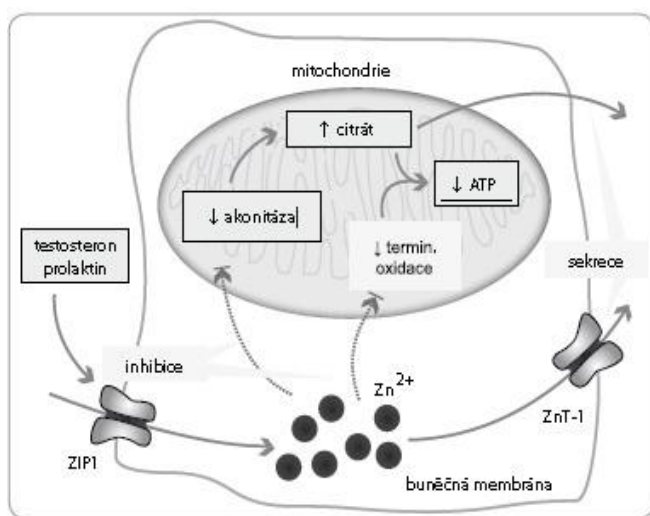
V současné době probíhají výzkumy, které prokazují vztah mezi koncentrací zinku v mozku a Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. Alzheimerova choroba je nejčastější ze všech demencí. Představuje asi 50-60 % všech demencí, a dalších asi 10 % demencí je smíšené etiologie, kde se kromě alzheimerovských změn etiologicky podílejí i ischemicko-vaskulární změny (mozkové infarkty). Alzheimerova choroba je progredientní neurodegenerativní onemocnění, projevující se syndromem demence, které je poměrně dobře definováno patologickými nálezy, společnými pro všechny postižené. Na druhou stranu však existuje interindividuální variabilita, pokud se týče doby vzniku, rychlosti progresu i některých dalších klinických odchylek. Značně se mohou lišit genetické predispozice jednotlivých pacientů, i množství a druh nejrozličnějších faktorů, ovlivňujících rozvoj a průběh choroby. Hypotézy jsou založeny na myšlence, že v případě Alzheimerovy choroby dojde na začátku nemoci ke zvýšení koncentrace intracelulárního chelátového zinku, který se poté uvolní, začne shlukovat β -A-proteiny (např. β -amyloid je významný degenerativní protein), čímž bude ovlivňovat neuronální životaschopnost. Jak abnormálně vysoká, tak nízká koncentrace intracelulárního chelátového zinku může vést k poruchám až degradaci neuronální sítě.[13, 14]

2.2.2 Role zinku při prevenci a léčbě rakoviny prostaty

U mužů bývá třetím nejčastějším úmrtním rakovinovým nádorem nádor prostaty. Charakteristickým znakem při rakovině prostaty je pokles koncentrace zinku a citrátu v maligních buňkách (o 70-80 %). Zatím není známý žádný případ, kdyby si maligní buňka zachovala vysokou hladinu zinku nebo citrátu. Tento vztah je přesvědčivým důkazem toho, že maligní buňky ztrácí schopnost akumulovat zinek a to je důležitý faktor v rozvoji a růstu maligních nádorů. Právě tato spojitost vedla k myšlence, že zvýšení koncentrace zinku v maligních buňkách, by mohla vést k léčbě a prevenci rakoviny prostaty.

Prostata se skládá ze 3 základních částí, a to periferní část (zhruba 70 %), centrální část (25 %) a přechodová část (5 %). Koncentrace zinku v centrální žláze je mnohem menší než v periferní části. Proto je z hlediska výzkumu důležitá především periferní část a to z toho důvodu, že jsou v ní buňky akumulující zinek (v periferní části je 10x větší koncentrace zinku než v ostatních měkkých tkáních). Savčí buňky mají obecné mechanismy, které by měly nadměrnému ukládání zinku zamezit (a to z toho důvodu, že zinek je ve větší koncentraci toxický). U vylučovacích epitelových buněk periferní zóny však k omezení ukládání nedochází, a to především proto, že zinek je potřebný k inhibici enzymu m-akonitázy (enzym katalyzující dehydrogenaci citrátu na α -ketoglutarát). V důsledku dojde k potlačení oxidace citrátu, jeho hromadění a sekreci. Získaný citrát je důležitý pro metabolismus spermií. Hlavní funkcí buněk periferní zóny žláзовého epitelu je tedy produkce a sekrece abnormálně vysokého množství citrátu. Inhibice m-akonitázy vede k menšímu zisku ATP, produkovaného oxidací citrátu v Krebsově cyklu (u maligních buněk dochází k uvolňování zinku inhibujícího m-akonitázu, a tudíž k výrazně větší oxidaci citrátu). Za těchto podmínek se získá oxidací glukózy pouze 14 ATP/glukózu, zatímco za úplné oxidace se získá 38 ATP/glukózu. Tím pádem se maligní buňky stávají více energeticky efektivními než běžné periferní buňky. Větší množství získané energie u maligních buněk je využito pro jejich růst a aktivitu. Tento proces nazýváme metabolický efekt. Pokles koncentrace zinku má za následek zvýšený růstový efekt buněk, který v kombinaci s metabolickým účinkem má za následek proliferaci (množení) nádorových buněk. Koncentrace zinku v buňce má totiž také vliv na její apoptózu. Ve většině savčích buněk zinek zabraňuje apoptóze, ale v případě buněk akumulujících zinek dojde při kontaktu s médiem bohatým na zinek k inhibici buněčného růstu, který vede až ke smrti buňky. Tento efekt byl pozorován u řady lidských normálních prostatických buněk a u krysích centrálních prostatických epitelových buněk (jednalo se o buňky, které byly schopny akumulace zinku), které přišly do kontaktu s médiem bohatým na zinek. Naproti tomu, u

buněčných linií např. spinocelulárního karcinomu (jedná se o druh rakoviny kůže), které nejsou zinek akumulující buňky, při léčbě zinkem k apoptóze nedošlo. Proto se usuzuje, že apoptický účinek zinku je specifický pro buňky akumulující zinek. Tento efekt vyplývá z přímého působení zinku na mitochondrie, což vede k uvolnění cytochromu c a ten je prekurzorem událostí, vedoucích až k apoptóze. Tato spojitost vysvětluje, proč při rakovině prostaty nemůžeme najít žádné maligní, zinek akumulující buňky. Možná ztráta schopnosti maligních buněk ukládat zinek souvisí s útlumem exprese genu ovlivňujícím ZIP1 (zinkový transportér, který slouží k přenosu zinku přes buněčnou membránu dovnitř do buňky) a to vede k menšímu zásobování buňky zinkem a ke snížení koncentrace zinku uvnitř buňky.



Obrázek 3: Vstup a působení zinku v prostatické buňce [15]

Opakem ZIP1 je zinkový transportér ZnT1 sloužící k přenosu zinku z buňky.

Výše popsané spojitosti vedly k hlavním myšlenkám při léčbě rakoviny prostaty. V současné době se začaly provádět pokusy na laboratorních myších s hlavním cílem vytvořit lepší podmínky pro příjem a ukládání zinku v maligních nádorech (při léčbě) a nemaligních buňkách (prevenci). Tato studie pracuje

na dvou hlavních principech. První princip se snaží zvýšit množství zinku v

plasmě (především ve formě vhodné k přenosu do buňky přes buněčnou membránu). Druhý princip je tzv. hormonální. Hormonální způsob je založen na principu zlepšení případně obnovení příjmových transportních procesů buňky a využít by se mohly především hormony testosteron a prolaktin, které ovlivňují expresi výše zmíněného ZIP1 a celkově zlepšují příjem zinku buňkou. Kombinace obou metod zatím vypadá velmi slibně. Myším byla pod kůži implantována dávka roztoku ZnCl_2 . Léčba se projevila výrazným zvýšením koncentrace zinku v plasmě. O pár týdnů později se u zvířat léčených zinkem projevilo 50 % snížení růstu nádoru. Současně došlo k výraznému nárůstu množství zinku a citrátu v nádorových buňkách tzn., že se rakovinné buňky začaly měnit na normální citrát produkující buňky. Také došlo ke zvýšení apoptózy v nádorech, čímž se ukázalo, že apoptogenní efekt je lepší při testování *in vivo* než *in vitro*. Pokusy byly zatím provedeny pouze na zvířatech.[15, 16, 17]

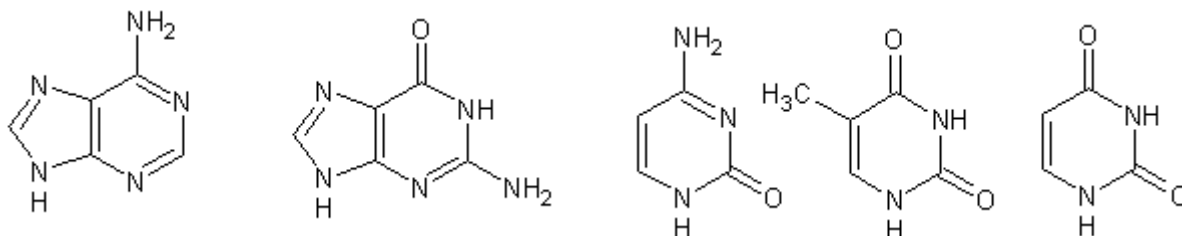
3. Purinové deriváty

Purin je heterocyklická molekula, která má ve své struktuře 4 atomy dusíku. Purin je bazická látka a jeho deriváty hrají v biologických procesech velmi významnou roli. Mezi nejdůležitější deriváty purinu patří především heterocyklické dusíkaté báze adenin a guanin, které jsou součástí nukleových kyselin. Na tyto báze se přes dusík N9 naváže pomocí *N*-glykosidové vazby ribóza (přes uhlík C1) a vytvoří se tzv. nukleosidy, které se tedy skládají z purinové báze a sacharidu (v případě RNA se jedná o D-ribózu a u DNA o 2-deoxy-D-ribózu). D-ribóza má na rozdíl od 2-deoxy-D-ribózy na uhlíku C2 vázanou OH skupinu. U RNA tedy vznikne ribonukleosid a u DNA 2-deoxy-ribonukleosid. U pyrimidinových bází (cytosin, thymín a uracil) dojde k navázání ribózy přes atom dusíku N1. Volné OH skupiny těchto ribonukleosidů mohou být fosforylovány za vzniku fosforylovaných nukleosidů, které nazýváme nukleotidy. Nukleotidy jsou tedy tvořeny z purinové nebo pyrimidinové báze, obecně D-ribózy a fosfátové skupiny. Nukleotidy jsou klíčové ve struktuře deoxyribonukleové kyseliny (DNA), kde se pomocí vodíkových můstků párují purinové nukleotidy s pyrimidinovými nukleotidy (adenin-thymín a guanin-cytosin). V případě ribonukleové kyseliny (RNA) je cytosin nahrazen uracilem. Nukleotidy mají v organismu více rolí:

1. Jsou součástí DNA a RNA a jejich pořadí kóduje genetickou informaci.
2. Plní roli koenzymů v energetickém metabolismu – koenzymy jsou transportní metabolity a jejich úkolem je přenášet jednotlivé elektrony, vodíky nebo chemické skupiny mezi jednotlivými enzymatickými drahami tzn. že, se účastní např. oxidace nebo redukce látek v organismu. Mezi takové koenzymy patří např. nikotinamid adenin dinukleotid NAD^+ (po redukci NADH), jehož úkolem je přenášení elektronů do dýchacího řetězce, kde se také regeneruje zpátky na NAD^+ .
3. Vystupují jako tzv. druhý posel v signálních drahách – hlavní funkcí druhých poslů je allosterická inhibice nebo aktivace enzymů. Příkladem může být cyklický adenosinmonofosfát cAMP, který se uvolní po interakci hormonu (první posel) s receptorem a aktivuje enzym proteinkinázu.

Purinové deriváty mohou tedy být výrazně biologicky aktivní látky a v současné době je jich známo velké množství. Purinové deriváty se mohou např. začlenit do struktury DNA na místo přirozeně používaných nukleotidů a způsobit tím cytotoxický efekt. Příkladem takového derivátu je např. 6-merkaptopurin, který se metabolizuje na 6-thioguaninové nukleotidy a ty

se začlení do struktury DNA (viz. kapitola 3.1 Merkaptopurin a azathioprin). Purinové deriváty mohou dále vystupovat např. jako inhibitory kináz, inhibitory nukleosidového transportu do buňky, inhibitory růstu mikrotubulů atd. Jen v článku věnujícímu se souhrnu důležitých purinových derivátů je jich k roku 2005 uvedeno 127.[18]



Obrázek 4: Struktury purinových a pyrimidinových bází - adenin, guanin, cytosin, thymin a uracil

3.1 Merkaptopurin a azathioprin

3.1.1 Obecné vlastnosti

Mezi významnou skupinu purinových derivátů patří merkaptopuriny. Mezi představitele této skupiny patří 6-merkaptopurin (6-MP) a jeho deriváty jako 6-[(1-methyl-4-nitro-1H-imidazol-5-yl)sulfanyl]-7H-purin, který je známý pod triviálním názvem azathioprin (AZA). 6-MP byl poprvé syntetizován v roce 1950 a od té doby našel využití především jako imunosupresivní léčivo, dále se používá především k léčbě leukémie, zánětlivých onemocnění střev, např. Crohnovy nemoci, a při transplantaci orgánů. Způsob účinku AZA spočívá v ovlivňování více faktorů, jako je konverze na 6-MP (který působí jako antimetabolit purinu), možná blokáce thiolových skupin alkylací, inhibice některých důležitých mezikroků při biosyntéze nukleových kyselin a poškození DNA prostřednictvím začlenění thiopurinových analogů. Dále AZA a 6-MP ovlivňují funkci lymfocytů (inhibují množení T a B-lymfocytů) a snižují počet buněk v lamina propria (vrstva sliznice tvořena vazivem). Nejcitlivější jsou buňky intenzivně se množící, proto je účinek zaměřen na ně a ne na ostatní buňky.

3.1.2 Metabolismus a účinky azathioprinu a 6-merkaptopurinu

Zkratka	Název látky
6-MeMP	6-methylmerkaptopurin
6-metTIDT	6-methylthionosin difosfát
6-metTIMP	6-methylthionosin monofosfát
6-metTITT	6-methylthionosin trifosfát
6-MMPN	6-methylmerkaptopurin nukleotidy
6-MP	6-merkaptopurin
6-TGDP	6-thioguanin difosfát
6-TGMP	6-thioguanin monofosfát

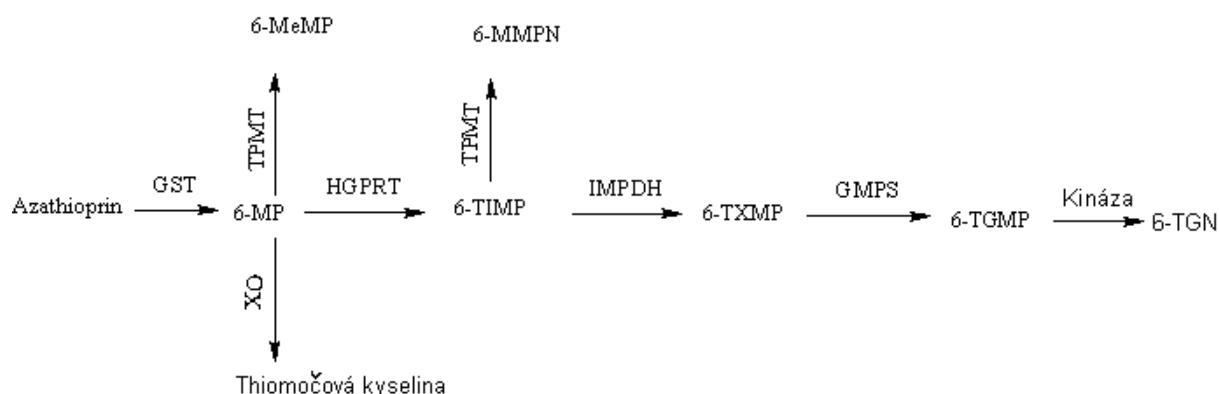
6-TGN	6-thioguaninové nukleotidy
6-TGTP	6-thioguanin trifosfát
6-TIMP	6-thioinosin monofosfát
6-TXMP	6-thioxantin monofosfát
AZA	Azathioprin
GMPS	Guanosin monofosfát syntetázy
GST	Glutation-S-transferáza
HGPRT	Hypoxantin guanin fosforibosyltransferáza
IMPDH	Inosin monofosfát dehydrogenázy
SAM	S-adenosylmethionin
TPMT	Thiopurin-S-methyltransferáza
TUA	Thiomočová kyselina
XO	Xantin oxidáza

Tabulka 2: Tabulka popisující použité zkratky látek

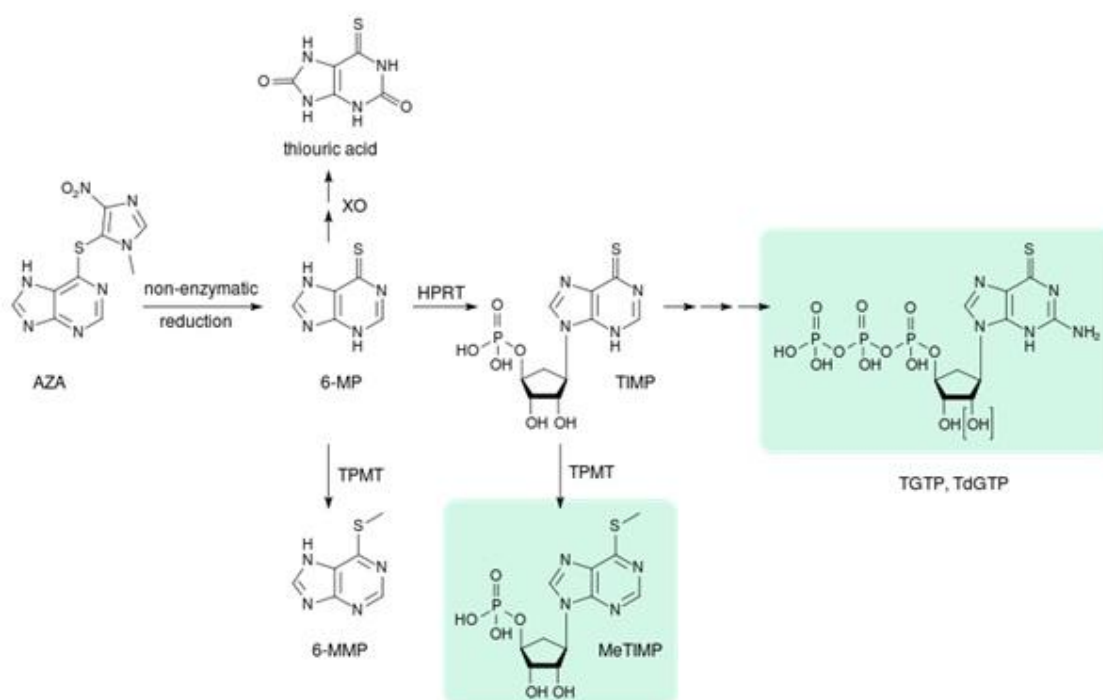
Absorpce AZA je u zdravých lidí 15-50 % a snižuje se u lidí se střevním zánětlivým onemocněním. To je způsobeno především tím, že AZA prochází střevy rychleji při exacerbaci (zhoršení zdravotního stavu, případně návrat nemoci). AZA vystupuje jako prekurzor, který je rychle štěpen v játrech pomocí enzymu glutation-S-transferázou (GST) na 6-MP, který je poté metabolizován v játrech a střevech jedním ze tří enzymů*:

1. Thiopurin-S-methyltransferáza (TPMT) → enzym katalyzující metylaci 6-MP na 6-methylmerkaptopurin (6-MeMP). Tato reakce vyžaduje ke svému průběhu vhodný donor methylové skupiny a to je S-adenosylmethionin (SAM)
2. Xantin oxidáza (XO) → katalyzuje přeměnu 6-MP na thiomočovou kyselinu (TUA- přeloženo z anglického originálu thiouric acid)
3. Hypoxantin guanin fosforibosyltransferáza (HGPRT) → katalyzuje přeměnu 6-MP na 6-thioinosin monofosfát (6-TIMP), který je dále metabolizován na 6-thioxantin monofosfát (6-TXMP) pomocí enzymu inosin monofosfát dehydrogenázy (IMPDH) a dále pomocí guanosin monofosfát syntetázy (GMPS) na 6-thioguanin monofosfát (6-TGMP). 6-TGMP může být dále fosforylován pomocí enzymu kinázy na 6-thioguanin di nebo trifosfát (6-TGDP nebo 6-TGTP). Soubor těchto tří možných fosfátů thioguaninu označujeme jako 6-thioguaninové nukleotidy (6-TGN)

* Je nutné zmínit, že přesný mechanismus metabolismu a účinku 6-MP není dosud přesně znám. Proto některé články uvádí, že k odstranění imidazolového kruhu z AZA dochází neenzymatickým způsobem pomocí glutathionu. Další metabolické kroky jsou již popsány stejně.[19]



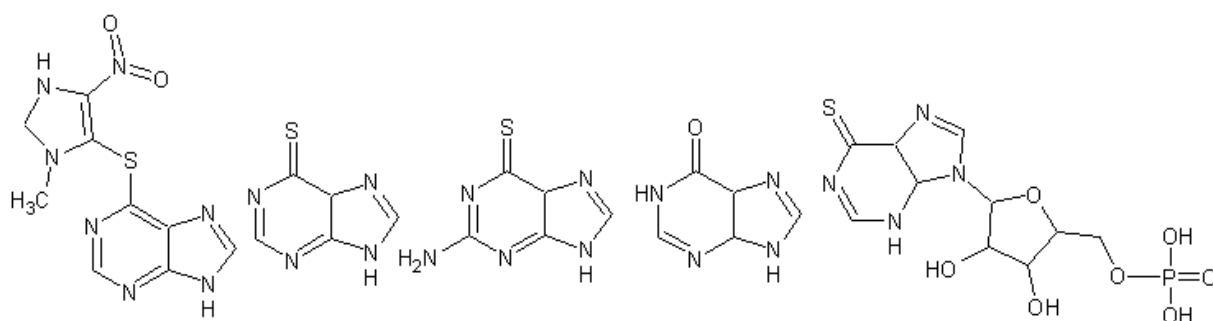
Obrázek 5: Schéma metabolismu azathioprinu (zkratky látek jsou uvedeny v Tabulce 2)



Obrázek 6: Stručné funkční schéma metabolismu Azathioprinu [19]

To znamená, že ve střevech probíhá metabolizace 6-MP třemi možnými způsoby, které si mezi sebou vzájemně konkurují. Po zahájení terapie se 6-TGN (vznikající v metabolické přeměně 3) pomalu ukládají v tkáních a to je pravděpodobně příčinou jejich pozitivního efektu při léčbě nemoci. Tato intracelulární akumulace 6-TGN je částečně zodpovědná za cytotoxické účinky 6-MP a to z toho důvodu, že 6-TGN se začlení do struktury DNA na místo purinových bází a to způsobí zastavení buněčného cyklu a vede k apoptóze. 6-TIMP, který slouží také jako substrát pro enzym TPMT, se může dále také methylovat na 6-methylthionosin monofosfát (6-metTIMP). Ten může být dále fosforylován na di a tri fosfát (6-metTIDT a 6-metTITT). Tento soubor tří možných látek opět označujeme jako 6-

methylerkaptopurin nukleotidy (6-MMPN). Methylerkaptopurin negativně ovlivní expresi genů a inhibuje syntézu purinu a to má za následek také cytotoxický efekt. Nicméně syntéza 6-MMPN probíhá v daleko menším měřítku než syntéza 6-TGN, proto je primární cytotoxický efekt způsoben 6-TGN. Koncentrace 6-TGN je nepřímo úměrná rychlosti metabolismu v TPMT dráze (tzn., že čím více bude vnikat produktu v metabolické přeměně 1, tím méně vznikne produktu v metabolické přeměně 2) a souvisí s odpovědí organismu např. v případě dětské leukémie (primární cytotoxický efekt bude opět způsoben 6-TGN). Podobný vztah existuje také v případě zánětlivých onemocnění. Nicméně, zvýšená produkce 6-TGN, která je spojena s útlumem TPMT dráhy, vede k toxické hladině v krevních buňkách, což má za následek pancytopenii (úbytek všech druhů krvinek) a izolovanou leukopenii (snížení počtu leukocytů v krvi). Snížení výsledků aktivity TPMT v metabolismu AZA a 6-MP pomocí jiných enzymatických cest (2,3) vede tedy ke zvýšení koncentrace 6-TGN a thiomocové kyseliny. U akumulace thiomocové kyseliny nejsou pozorovány žádné vedlejší účinky, zatímco akumulace 6-TGN nukleotidů v myeloidních buňkách představuje riskantní faktor pro thiopurinová léčiva – vyvolává myelosupresi (jedná se o pokles tvorby krevních buněk). Rozhodující je tedy najít ideální intracelulární koncentraci 6-TGN. Koncentrace, která je příliš vysoká, vede k myelosupresi, zatímco nízké koncentrace vedou k nedostatečnému účinku.[20] [21]



Obrázek 7: Znárodnění nejdůležitějších struktur zleva doprava - AZA, 6-MP, 6-thioguanin, hypoxantin, 6-TIMP

3.1.3 Leukémie

Leukemie je nádorové onemocnění krvetvorby. Ačkoliv je několik typů krvinek (bílé, červené a krevní destičky), všechny vznikají v kostní dřeni z jednoho typu buněk, které se nazývají kmenové buňky. Ty tvoří jen malou část buněk dřene. U leukemie dochází k poruše krvetvorby a kmenové buňky začnou tvořit velké množství jednoho typu krvinek, který nedostatečně vyžívá. Nezralé krvinky nejsou schopny plnit úkol, který v těle mají, začínají postupně vyplňovat kostní dřeň a jsou vyplavovány do krve. Leukemické buňky se mohou

shromažďovat v různých tělních orgánech. Kostní dřeň není nadále schopna tvořit dostatečné množství normálních krvinek a rovnováha krvetvorby je porušena. Leukemii můžeme rozdělit podle druhu množených buněk do 4 základních skupin a to – akutní myeloidní leukemie (AML), chronická myelodní leukemie (CML), akutní lymfoblastická leukemie (ALL) a chronická lymfoblastická leukemie (CLL). Akutní druhy leukemií mají rychlý průběh a pacient během poměrně krátké doby umírá. U lymfoblastických druhů leukemie jsou výrazně zmnoženy jedny z nejčasnějších buněk vývojové řady tzv. blasty. Právě při tomto druhu leukemie (ALL) se využívá 6-MP. Oproti tomu chronické formy leukémie se projevují pomaleji a pacient s touto formou leukemie může žít i několik let. U chronické leukemie dochází ke zmnožení zralejších buněk, které však nemají normální funkci. Co je však příčinou vzniku nemoci? Je velmi pravděpodobné, že vznik většiny leukemií je výsledkem působení řady faktorů, které vedou k poruše normálního vyžívání buněk kostní dřene, z něhož se pak stává nekontrolovaný proces. Jako rizikové faktory pro vznik leukemie jsou udávány např. kouření, styk s některými chemikáliemi (např. benzen), radioaktivní záření, zaměstnání v energetice. Někdy se leukemie objeví u pacienta, který byl již v minulosti léčen pro jiné nádorové onemocnění. K léčbě leukémie se velmi často využívá chemoterapie. Cytostatika ale působí nejen na nádorové buňky, ale i na jiné rychle se množící buňky lidského těla, a proto je nutné najít jejich ideální dávku (jak již bylo výše zmíněno, nízká dávka by znamenala malý účinek, zatím co vysoká dávka by zabila i velké množství zdravých buněk). Většinou se užívají kombinace různých cytostatik, z nichž každé působí v různých fázích života leukemické buňky. Tím se zabrání vzniku rezistence nádoru. Po podání cytostatik je ale výrazně dočasně utlumena normální krvetvorba a proto dochází po podání chemoterapie k poklesu počtu veškerých krvinek. Pokles bílých krvinek zapříčiňuje výrazný pokles obranyschopnosti organismu proti infekci. Další způsoby jak leukémii léčit je terapie steroidy, radioterapie a v nynější době často využívaná transplantace kostní dřene.[22]

3.2 Zn(II) komplexy s deriváty purinu

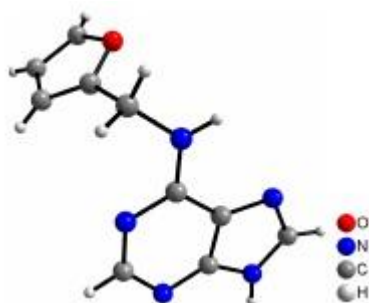
Jak již bylo zmíněno v úvodu bakalářské práce, cílem syntézy potenciálně biologicky aktivních komplexů, je navýšení jejich biologické aktivity oproti samotnému organickému biologicky aktivnímu ligandu. Kromě komplexů vykazujících cytotoxickou aktivitu, byly připraveny i Zn(II) komplexy vykazující antifungální a antibakteriální aktivitu o složení $[Zn(XCH_2COO)_2(Kof)_2] \cdot 2H_2O$ (Kof=kofein, X=H, Cl, Br, I).[23] Dobré výsledky byly i u testování antivirové aktivity, konkrétně u Zn(II) komplexů s acyclovirem (acyclovir je

antivirotikum používané proti virům *Herpes simplex* a *Herpes varicella-zoster*) o složení např. $[\text{Zn}(\text{Acv})_2\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$. Tyto komplexy vykazovaly aktivitu i proti virům, které byly proti samotnému acycloviru rezistentní.[24, 25] U mnoha připravených komplexů je skutečně znatelný pozitivní rozdíl, mezi připraveným komplexem a samotným ligandem. Známých $\text{Zn}(\text{II})$ komplexů s purinovými deriváty vykazujících biologickou aktivitu je v roce 2014 podle vědecké databáze SciFinder 57. Dále se tedy v teoretické části věnuji připraveným $\text{Zn}(\text{II})$ komplexům s purinovými deriváty, které vykazují biologickou aktivitu, jako Kinetin, Olomoucín, Bohemin. Tyto komplexy byly připraveny na Univerzitě Palackého v Olomouci. Právě syntéze a charakterizaci $\text{Zn}(\text{II})$ komplexů s deriváty 6-merkaptopurinu se věnuji v praktické části své bakalářské práce.

3.2.1 Kinetin

3.2.1.1 Objev a vlastnosti kinetinu

Mezi purinové deriváty, s kterými byly připraveny komplexy zinku, patří i kinetin. Kinetin nebo-li 6-furfurylaminopurin byl izolován již v roce 1955 z autoklávované DNA spermatu mořského sledě jako první cytokinin. Cytokininy představují skupinu rostlinných růstových hormonů, které ovlivňují diferenciaci buněk, transkripci DNA, stimulují buněčné dělení, podílí se na regeneračních procesech, a tak na zpomalení stárnutí, a jiných fyziologických procesech rostlin. Právě díky těmto vlastnostem se kinetin, stejně jako ostatní cytokininy, stal atraktivní pro výzkum stimulace rostlinného růstu, zpomalení stárnutí listů a ovlivnění reakcí rostlin na stresové stimuly z okolního prostředí.[26]



Obrázek 8: Struktura kinetinu.[26]

V současné době bylo připraveno velké množství různě substituovaných derivátů kinetinu. U některých z nich jako např. 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu byla zjištěna výrazně vyšší aktivita proti stárnutí fibroblastů (buňky, které syntetizují kolagen) než u samotného kinetinu.

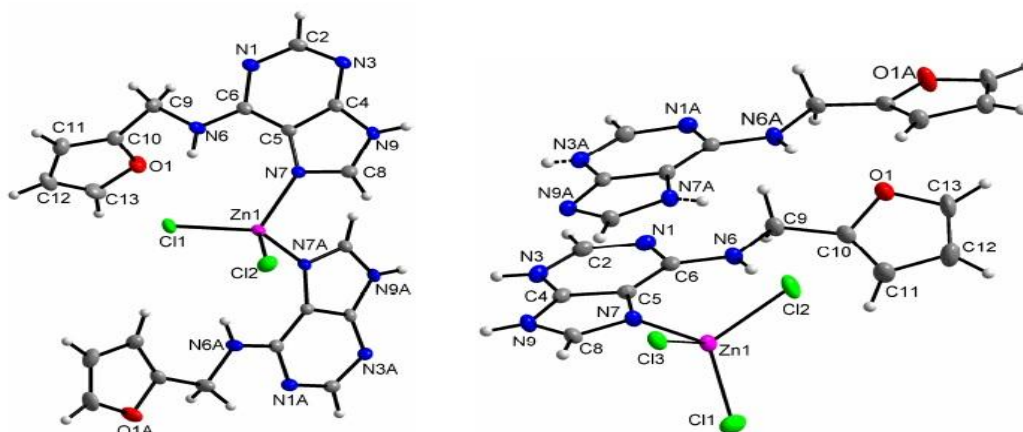
Této vlastnosti se využívá především v kosmetickém průmyslu, kde se tato látka využívá proti vráskám.

3.2.2 $\text{Zn}(\text{II})$ komplexy s kinetinem

V současné době bylo připraveno dvanáct $\text{Zn}(\text{II})$ komplexních sloučenin s deriváty kinetinu. Komplexy měly dva základní typy složení:

1. První typ je $[\text{Zn}(\text{HL}^n)_2\text{Cl}_2] \cdot x\text{Solv}$ (HL^n = molekula kinetinu nebo jeho derivátu). Pomocí monokrystalové rentgenové strukturní analýzy se podařilo určit krystalovou strukturu komplexu $[\text{Zn}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}_2] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (HL^1 = kinetin). Tento komplex obsahuje komplexní částici a jednu molekulu metanolu mimo koordinační sféru.
2. Druhý typ je $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}^n)\text{Cl}_3] \cdot n\text{HL}^n$ (H_2L^n = protonizovaná molekula kinetinu nebo jeho derivátu). Stejným způsobem jako v předešlém případě se podařilo určit strukturu $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{Cl}_3] \cdot \text{HL}_1$

Barva $\text{Zn}(\text{II})$ komplexů připravených s deriváty kinetinu byla od bílé po béžovou a všechny tyto komplexy byly málo rozpustné v methanolu, ethanolu a butanolu za laboratorní teploty. Naopak velmi dobře rozpustné byly v dimethylsulfoxidu (DMSO) a *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Geometrie připravených komplexních sloučenin nejvíce odpovídá tvaru deformovaného tetraedru. V případě typu 1 jsou na centrální atom $\text{Zn}(\text{II})$ koordinovány dvě molekuly kinetinu přes atom N7 a dva chlorido ligandy v chromoforu ZnN_2Cl_2 . U typu 2 je na centrální atom $\text{Zn}(\text{II})$ vázána jedna molekula protonizovaného kinetinu opět přes N7 a tři chloridové anionty (chromofor ZnNCl_3).



Obrázek 9: Molekulové struktury komplexů $[\text{Zn}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}_2] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ a $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L}^1)\text{Cl}_3] \cdot \text{HL}_1$ [27]

3.2.3 Biologická aktivita

Antiflogistické vlastnosti (protizánětlivé) $\text{Zn}(\text{II})$ komplexů byly zjišťovány na základě produkovaných prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ u lipopolysacharidem aktivovaných makrofágů buněčné linie THP-1 (lidské monocyty leukemie). Vzniklé cytokiny byly detekovány ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metodou. ELISA test je typem imunologické metody se sendvičovým uspořádáním protilátek. Čím méně se při testování uvolnilo cytokinů, tím lepší má léčivo protizánětlivé vlastnosti. Testované komplexy prvního

typu zvyšovaly produkci cytokinu TNF- α pouze mírně, zatímco komplexy druhého typu uvolňovaly cytokinu TNF- α výrazně více. Tato zvýšená prozánětlivá aktivita komplexů druhého typu by mohla být způsobena přítomností molekuly krystalově vázaného ligandu. Pozitivní bylo testování obou druhů komplexů na cytokinech IL-1 β , kde se podařilo snížit sekreci tohoto cytokinu až na hodnotu odpovídající protizánětlivému léčivu prednisonu. Rozdílné ovlivňování uvolňování cytokinů TNF- α a IL-1 β pomocí testovaných komplexů, je nejspíše způsobeno rozdílnými mechanismy post-translační regulace produkce. Další možností, jak určit protizánětlivé vlastnosti látek, je měření aktivity matrix-metaloproteináz (MMP), což jsou Zn-dependentní proteinázy, které degradují extracelulární matrix a tím jsou odpovědné za remodelaci pojivové tkáně. Podílejí se na ontogenetickém vývoji, morfogenezi (vývoj tvaru), angiogenezi (vývoj a růst nových krevních cév), růstu a hojení ran. Jejich koncentrace se tedy zvyšuje při zánětlivých, degenerativních a maligních procesech. Provedené experimenty prokázaly, že připravené komplexy neovlivňují aktivitu MMP. Jak již bylo zmíněno výše (kapitola 2.2.2) zinek hraje velkou roli při léčbě a prevenci rakoviny prostaty. Připravené komplexy Zn(II) s kinetinem vykazovaly pozitivní cytotoxický efekt na lidské rakovinné prostatické linie PC-3 a 22Rv1 a to díky inhibici růstu rakovinných buněk. Proti rakovině prostaty jsou nejčastěji využívaná kancerostatika cisplatina a karboplatina málo účinné. Proti ostatním nádorovým liniím nevykazovaly tyto komplexy významnější cytotoxické vlastnosti.[27]

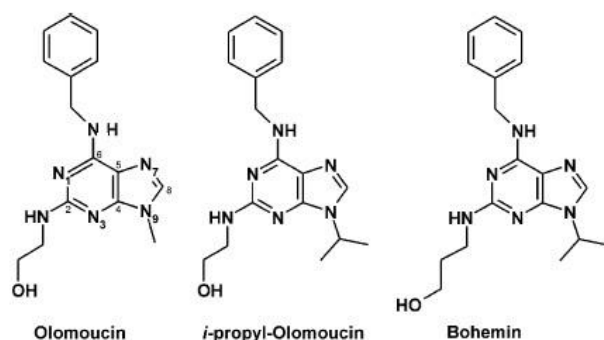
3.3 Olomoucín

3.3.1 Objev a vlastnosti

2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin známý pod názvem Olomoucín byl objeven na Univerzitě Palackého v Olomouci v roce 1993 a podle města Olomouc byl také pojmenován. Olomoucín patří stejně jako kinetin mezi cytokininy. Vystupuje jako inhibitor cyklin-dependentní kinázy (CDKI). Mezi cyklin-dependentní kinázy (CDK) patří Serin/Threonin dependentní protein kinázy. Cykliny jsou proteiny, které se tvoří v buňkách a regulují jejich buněčné dělení. Buněčné dělení probíhá v opakujících se cyklech, odtud název cykliny. Kinázy jsou skupina enzymů, které přenášejí fosfátovou skupinu z vysokoenergetické molekuly (typický příklad ATP) na substrát. Cykliny působí na CDK jako aktivátor a vytvoří s nimi komplex. Až vytvořením komplexu cyklin-kináza dojde k odkrytí katalyticky aktivního místa enzymu a enzym začne být biologicky aktivní. S takto aktivním komplexem začne interagovat ATP a pomocí CDK-aktivační kinázy (CAK) dojde k fosforylaci. Enzym je nyní plně aktivní a může fosforylovat další proteiny, které se podílí na buněčném dělení. CDK

začínají být tedy biologicky aktivní až po navázání cyklinu, a proto jsou na cyklinech závislé (dependentní). Interakce cyklinů s kinázami je stěžejní pro buněčné dělení, a proto je potlačení aktivity CDK pomocí vhodných inhibitorů velmi efektivní proti nádorovým buňkám. Při inhibici CDK dochází k řízené apoptóze buňky. Inhibitory se vážou na CDK v místě, kde se váže ATP a tím zabrání fosforylaci proteinů.[28, 29]

Strukturně je Olomoucín derivát *N*6-benzyladeninu. Dále byly připraveny i další deriváty *i*-propyl-Olomoucín a Bohemin. Aktivita těchto látek je založena na stejném principu a to je inhibice aktivity CDK.



Obrázek 10: Struktury Olomoucínu, *i*-propyl-Olomoucínu a Boheminu.[30]

3.3.2 Připravené Zn(II) komplexy

Byly připraveny čtyři Zn(II) komplexy reakcí 1 mmol $\text{ZnCl}_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ s 1 mmol CDKI v roztoku ethanolu nebo 0,1 M HCl.

1. $[\text{Zn}(\text{Olo})\text{Cl}_2]$
2. $[\text{Zn}(\text{iprOlo})\text{Cl}_2]$
3. $[\text{Zn}(\text{iproOloH}^+)\text{Cl}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$
4. $[\text{Zn}(\text{BohH}^+)\text{Cl}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Výsledné krystaly pro rentgenovou strukturní analýzu byly získány pomalým odpařováním rozpouštědla při pokojové teplotě. Komplexy byly dále analyzovány pomocí prvkové analýzy, IČ spektrometrie, konduktometrie, hmotnostní spektrometrie, NMR a termogravimetrickou analýzou. Komplexy 1 a 2 tvořily 1D-polymerní řetězce. Komplexy 3, 4 měly monomerní strukturu a chromofor ZnCl_3N . Vazba Zn-N byla přes atom N7 purinového skeletu.

3.3.3 Biologická aktivita

Cytotoxicita připravených komplexů byla testována na lidských rakovinných buněčných liniích G-361 (lidský maligní melanom), MCF7 (lidský prsní adenokarcinom), HOS (lidský osteosarkom) a K-652 (lidské chronické myeloidní leukemické buněčné linie). Z provedených

pokusů byly získány hodnoty IC_{50} (koncentrace léčiva, při které zahyne 50% nádorových buněk, nebo je inhibováno 50% kinázy). Inhibice CDK byla testována na CDK_2 /cyklin kináze. U komplexů 1, 2, 3 byla prokázána vyšší schopnost inhibice CDK_2 /cyklin kinázy než u volných CDKI. Zn(II) komplex s Boheminem vykazuje přibližně stejnou inhibici jako volný Bohemin, a proto je tedy málo efektivní. U komplexu 1 se sice výrazně zvýší schopnost inhibovat CDK_2 /cyklin kinázu než u samotného Olomoucínu, ale ve srovnání s ostatními komplexy je jeho hodnota IC_{50} vyšší. Výrazně vyšší aktivita monomerních komplexů 3 a 4 oproti komplexu 1 je pravděpodobně způsobena odlišnou strukturou (v případě 1 se jedná o 1D-polymerní řetězec). Nicméně se nepodařilo objasnit, proč je tak odlišná inhibice komplexy 1 a 2. Výraznější rozdíly nebyly také pozorovány mezi komplexy připravenými s i-propyl-Olomoucínem a Boheminem (3 a 4). Celkově se tedy podařilo prokázat, že Zn(II) komplexy (kromě 4) byly výrazně efektivnější než samotné CDKI a měly tedy vyšší cytotoxicitu.[30]

Sloučenina	Hodnoty IC_{50} (μM) komplex/volný ligand				
	G-361	HOS	K-562	MCF7	CDK2
1. $[Zn(Olo)Cl_2]$	107/150	45/145	74/167	57/130	2,8/5,0
2. $[Zn(iprOlo)Cl_2]$	86/167	89/167	100/167	75/167	0,4/2,8
3. $[Zn(iproOloH^+)Cl_3] \cdot H_2O$	65/167	67/167	100/167	54/167	0,5/2,8
4. $[Zn(BohH^+)Cl_3] \cdot H_2O$	64/46	95/58	88/93	27/28	0,4/0,6

Tabulka 3: Tabulka hodnot IC_{50} pro syntetizované komplexy a volné ligandy.[30]

4. Praktická část

Cílem praktické části mé bakalářské práce je syntéza potenciálně biologicky aktivních Zn(II) komplexů s ligandy odvozenými od skeletu 6-MP a jejich následná charakterizace pomocí dostupných analytických metod (EA, NMR, IČ, konduktometrie, MS atd.), které jsou popsány dále. Celkem bylo provedeno velké množství syntéz, ale bohužel někdy nešlo výslednou látku separovat nebo se z výsledků prvkové analýzy nepodařilo určit složení látky. Podrobněji zde uvedu pouze ty látky, které mají výsledky odpovídající teoretickým předpokladům. Syntéze Zn(II) komplexů s deriváty 6-MP se ještě nikdo nevěnoval.

4.1 Přehled použitých analytických metod

4.1.1 Elementární analýza

Elementární analýza nebo-li prvková analýza je metoda, pomocí které určíme procentuální obsah C, H, N ve vzorku. Některé přístroje dokáží stanovit i další prvky jako např. S. Vzorek se umístí do cínové kapsle, která je spálena v atmosféře bohaté na kyslík při teplotě cca 1800°C a vzniklé plynné produkty jsou vedeny nosným plynem (He) do trubice. Trubice se skládá z oxidační (WO_3) a redukční části (Cu), kde se vzniklé oxidy převádí na jeden druh (tento proces je nutný, protože z jednoho prvku může vzniknout více oxidů jako např. u N). Vznikají tedy CO_2 , H_2O , N_2 a případně také SO_2 . Plyny poté postupují dále do chromatografické části, kde dojde k jejich oddělování. Jako detektor slouží detektor tepelné vodivosti. Měření byla provedena na analyzáru *Flash 2000 (ThermoScientific)*. [31]

4.1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která slouží ke stanovení poměru hmotnosti/náboje (m/z). Hmotnostní spektrometr se zjednodušeně skládá ze zaváděcího zařízení, iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Zaváděcí zařízení jsou zásobníky pro plynné a těkavé vzorky nebo sondy pro přímý vstup do iontového zdroje (pro méně těkavé a pevné vzorky). Iontové zdroje převádí neutrální molekuly vzorku na ionty. Známe základní dva druhy ionizace – elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). U elektronové ionizace dochází k interakci proudu elektronů s molekulami vzorku, ze kterých vyřazuje valenční elektrony a tím vznikají kladně nabitě molekulové ionty. Nevýhoda EI je, že se molekula rozpadne na fragmenty, takže ve výsledném spektru často chybí molekulový ion. Při CI dochází k interakci proudu elektronů s reakčním plynem, jehož molekuly ionizuje. Tyto

molekuly ionizovaného plynu reagují se vzorkem a ionizují ho. U tohoto způsobu tedy vidíme ve výsledném spektru molekulový ion. Jako iontový zdroj se často používá elektrospej (ES). Použitím elektrospreje dochází k malé fragmentaci a v kladném módu vznikají molekulové ionty $[M + H]^+$ a adukty $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$. V záporném módu dochází k deprotonizaci molekuly. Jako hmotnostní analyzátor se používá kvadrupól nebo iontová past a jako detektor fotonásobič. Pomocí MS tedy dostaneme informace o molekulové hmotnosti a složení molekuly. Výsledné spektrum je tedy závislost intenzity signálu na m/z . Měření byla provedena na přístroji *LCQ Fleet ion trap (ThermoScientific)*. [32]

4.1.3 NMR

Nukleární magnetická rezonance je analytická metoda využívající vlastnosti jader atomů (magnetický moment). Podmínka aktivity jádra v NMR je, aby neutrony a protony v jádře nebyly spárovány a jádro tedy vykazovalo nenulový magnetický moment. Velký význam mají atomy vodíku. Pokud nejsou jádra vodíku 1H umístěna v magnetickém poli, tak mají stejnou energii. Jakmile se na tato jádra začne působit vnějším magnetickým polem, tak dojde k rozštěpení energetické hladiny na 2 různé hladiny (vyšší $- \frac{1}{2}$ a nižší $+ \frac{1}{2}$). K přechodu mezi těmito hladinami dojde absorpcí nebo emisí vhodné energie. Tyto procesy probíhají paralelně. Počet jader v jednotlivých energetických stavech není stejný (nepatrně více jader je v nižším energetickém stavu, a proto bude převládat absorpce). energii vhodnou pro absorpci dodáme pomocí působení radiofrekvenčního záření, kolmo na směr vnějšího magnetického pole. Při měření měníme tedy buď intenzitu vnějšího magnetického pole, nebo frekvenci radiofrekvenčního pole. Výsledné spektrum je tedy závislost intenzity elektromagnetického záření (EMG) na frekvenci magnetického pole nebo radiokfrekvenčního pole. Všechna jádra ve vzorku nejsou samozřejmě rovnocenná a kladně nabitá jádra atomů jsou v molekule obklopena elektrony a interagují s nimi. Rozložení elektronů závisí na okolí atomu tzn. na vazebných partnerech. Stínění elektronů má za důsledek různý chemický posun ve spektru např. pro molekulu benzeny jsou jádra atomů vodíků rovnocenná a ve spektru uvidíme pouze jeden peak. U nitrobenzeny jsou vlivem skupiny NO_2 tři neekvivaletní jádra atomů vodíků a ve spektru budou tedy 3 peaky. Dalším parametrem je tzv. spin-spinová interakce, kdy dochází k vzájemnému ovlivňování magnetických momentů sledovaných jader, takže některá jádra nebudou resonovat při jedné frekvenci, ale při více (vznikají dublety, triplety atd.). Výsledná spektra NMR jsou důležitá např. pro určení struktury sloučenin a pro studium reakční kinetiky. Měření byla provedena na přístroji NMR spektrometru *Varian-400MR*.

Měření probíhalo v deuterovaném *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) při teplotě 25°C. Jako standard byl pro měření ¹H a ¹³C použit tetramethylsilan.[33]

4.1.4 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie (IČ) je analytická metoda založená na absorpci infračerveného záření molekulami a souvisí s vibracemi a rotacemi molekul. Infračervená oblast spektra se rozděluje do tří základních skupin – blízká infračervená oblast (near- IR) 13000-3300 cm⁻¹, střední infračervená oblast (mid-IR) 3300-400 cm⁻¹ a vzdálená infračervená oblast (far-IR) 400-10 cm⁻¹. Známe dva základní druhy vibrací. Při valenčních vibracích dochází ke změně vazebných délek mezi atomy. U deformačních vibrací dochází ke změně vazebných úhlů mezi atomy. Aby byla molekula aktivní v IČ, tak musí při vibraci docházet ke změně jejího dipólového momentu. Výsledné IČ spektrum je tedy závislost intenzity signálu na vlnočtu a můžeme jej opět rozdělit do dvou skupin. První je oblast skupinových vibrací (charakteristických vibrací), kde v rozmezí 4000-1500 cm⁻¹ nacházíme absorpční pásy vibrací různých funkčních skupin a tuto oblast tedy využijeme pro identifikaci funkčních skupin v molekule. U vlnočtů 1500-670 cm⁻¹ pozorujeme tzv. oblast otisku palce. Zde pozorujeme deformační vibrace skupin, které jsou ovlivněny strukturou molekuly. Tato oblast slouží tedy k identifikaci látek. Pro komplexního chemika má IČ důležitý význam, protože podle výsledných spekter můžeme mimo jiné určit, zdali je v molekule přítomna vazba mezi centrálním atomem a ligandem. Měření byla provedena v rozsahu 150-4000 cm⁻¹ na přístroji *Nexus 670 FT-IR (ThermoNicolet)*. [34]

4.1.5 Konduktometrie

Konduktometrie je analytická metoda založena na měření vodivosti roztoků. Vodivost je schopnost elektrolytu vést elektrický proud a je způsobena nabitými ionty. Jednotkou vodivosti je *Siemens* (S). Látky můžeme podle vodivosti rozdělit do tří základních skupin – silné elektrolyty, slabé elektrolyty a neelektrolyty. Silné elektrolyty vedou elektrický proud velmi dobře a tyto látky jsou v roztocích zcela disociovány. Střední elektrolyty jsou v roztoku přítomny ve své disociované, ale i nedisociované formě. Neelektrolyty jsou látky, které nevedou elektrický proud a v roztoku disociují pouze minimálně. Měřením vodivosti se dá zjistit např. stupeň disociace látek nebo v případě komplexů nám dá měření vodivosti informaci o tom, jestli jsou ionty mimo koordinační sféru centrálního atomu (komplex by vedl

elektrický proud a byl by elektrolyt) nebo jestli jsou uvnitř koordinační sféry (komplex by nevedl proud a jednalo by se o neelektrolyt). Měření molární vodivosti byla provedena při koncentraci látky 10^{-3} mol/l a jako rozpouštědlo byl použit DMF nebo acetonitril. Pracovalo se při $T=25^{\circ}\text{C}$ a měření byla provedena na přístroji *Conductivity meter OK-102/1*. [32]

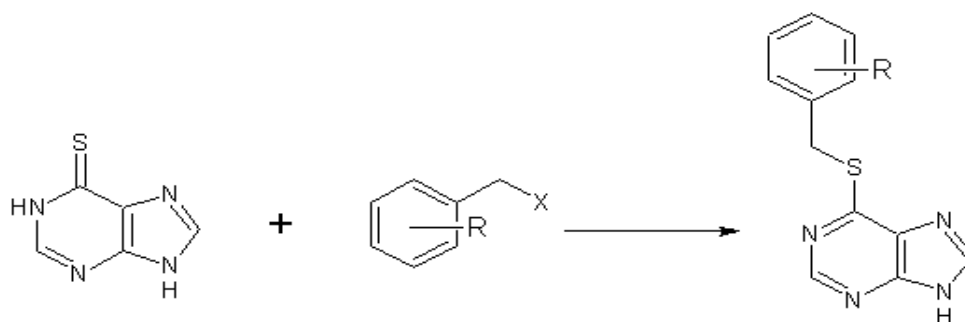
4.1.6 Termická analýza

Jako termická analýza se označuje soubor metod, které analyzují změny složení a vlastností látek a jejich směsí působením definovaných teplotních změn, a jejichž důsledky jsou zaznamenány společně s teplotou. Mezi metody termické analýzy patří termogravimetrie (TG), která je založená na měření změny hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě. Vzorek je umístěn na termováhy, kde dochází k navyšování teploty a k sledování závislosti změny hmotnosti vzorku na teplotě. Výsledkem TG je termogravimetrická křivka, která graficky tuto závislost znázorňuje. Pokud nebude docházet ke změně složení vzorku, bude závislost vodorovná přímka (tzv. plata). Při úbytku hmotnosti se na křivce objeví sestupný schod. Derivační termogravimetrie (DTG) nám doplňuje informace o TG křivce a to tím způsobem, že zjistíme první derivaci TG křivky závislosti změny hmotnosti na teplotě. Diferenční termická analýza (DTA) studuje rozdíl teplot mezi studovaným a inertním materiálem. Ve výsledné DTA křivce vidíme exotermické (např. oxidace a krystalizace) a endotermické efekty (desolvatace, tání, termický rozklad atd.). Termická analýza se využívá pro určení obsahu solvátomolekul, procentový obsah anorganických částí studovaných molekul a nepřímé určení molekulové hmotnosti vzorku. Měření byla provedena do 850°C při teplotním gradientu $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na termickém analyzátoru *Exstar (Seiko Instruments)*. [35]

4.2 Experimentální část

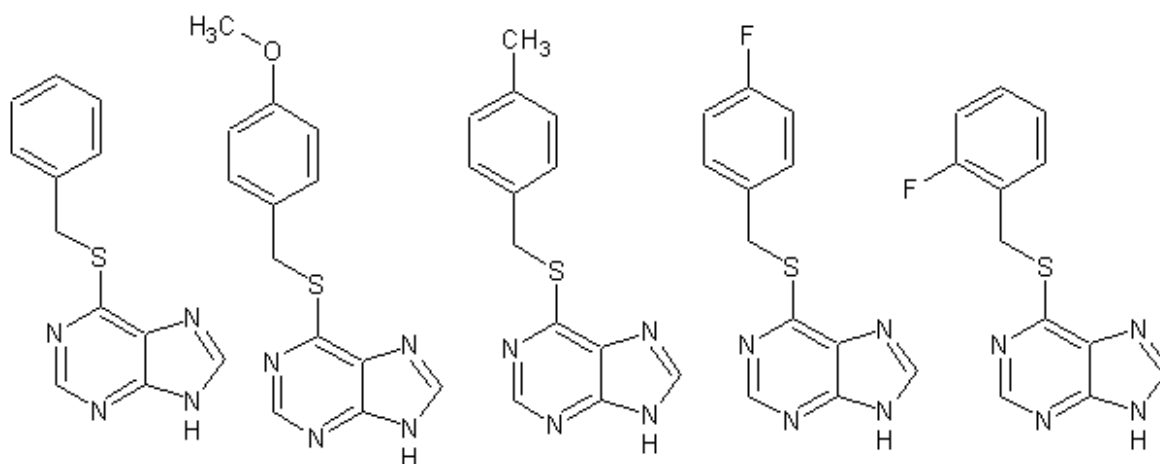
4.2.1 Syntéza ligandů

Jako výchozí látka při přípravě ligandů byl použit 6-MP, který je běžně komerčně dostupný a jeho syntéza podléhá patentové ochraně. [36] Všechny použité látky byly nakoupeny u firem jako Sigma-Aldrich, Fisher Scientific a Lachema. Reaktanty byly použity bez jakékoliv purifikace. Příprava ligandů probíhala podle postupů publikovaných ve vědeckých časopisech *Journal of the American Chemical Society* a *Journal of Medicinal Chemistry*. [37, 38]



Obrázek 11: Schéma syntézy derivátů 6-MP.

Postup syntézy: 1 g (0,006 mol) monohydrátu 6-merkaptopurinu byl rozpuštěn v připraveném roztoku NaOH (0,5 g NaOH v 38 ml MeOH/H₂O, 1:1). Po rozpuštění 6-MP bylo do roztoku během dvou hodin přikapáváno zhruba 800 μ l substituovaného benzylbromidu nebo benzylchloridu (objem přidávané látky se mírně lišil v závislosti na substituentu). Směs poté byla ve varné baňce a pod zpětným chladičem po dobu 5 hodin míchána a zahřívána na teplotu 50°C. Roztok byl přefiltrován a filtrát byl okyselen 2M HCl na pH 5. Při okyselení filtrátu docházelo k vysrážení světle žlutého produktu, který byl odfiltrován a vysušen pod infralampou. Postup nebylo nutné upravovat a syntéza probíhala bez problémů. Čistota výsledného ligandu byla ověřena pomocí elementární analýzy (EA), hmotnostní spektrometrie (MS) a NMR. Nebyla nutná rekrystalizace. Samotný 6-MP byl dostupný a nebylo nutné jej syntetizovat. Celkově bylo připraveno 5 druhů ligandů (označení Lig 1 - Lig 5). Lig 1 = 6-benzylmerkaptopurin, Lig 2 = 6-(*p*-methoxybenzylmerkapt)purin, Lig 3 = 6-(*p*-methylmerkapt)purin, Lig 4 = 6-(*p*-fluorobenzylmerkapt)purin, Lig 5 = 6-(*o*-fluoro benzylmerkapt)purin.



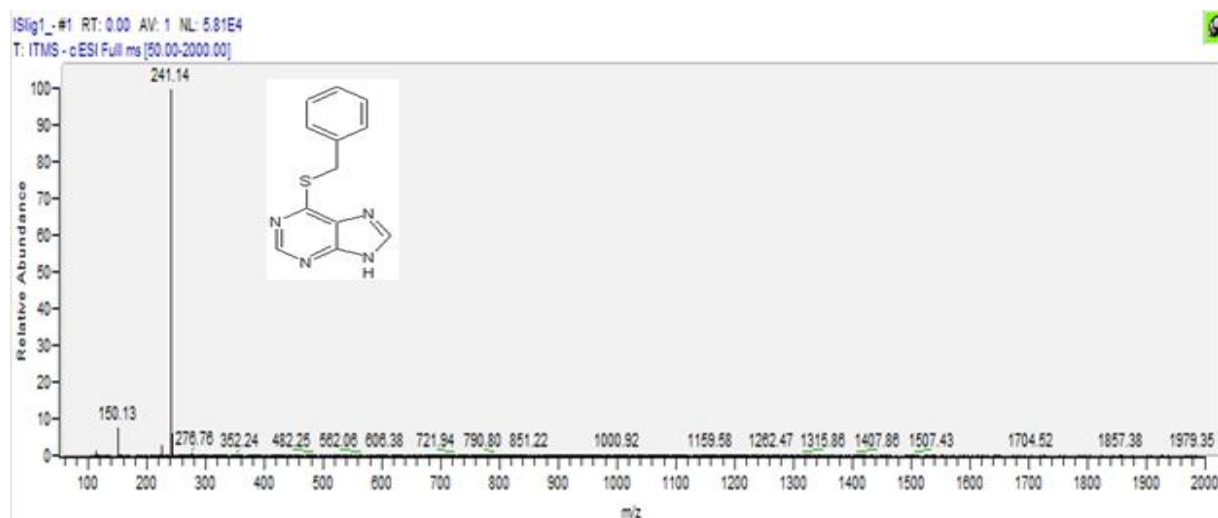
Obrázek 12: Přehled připravených ligandů (Lig 1 – Lig 5).

EA - čistota připravených ligandů odpovídala teoretickým předpokladům a nebylo nutné provádět rykrystalizaci. Výsledky elementární analýzy jsou uvedeny v následující tabulce.

Ligand	C %	N %	H %	
Lig 1	59,48	23,12	4,16	Teoretické hodnoty
	59,24	22,86	3,86	Naměřené hodnoty
Lig 2 (CH ₃ O)	57,34	20,57	4,44	Teoretické hodnoty
	56,91	20,16	4,12	Naměřené hodnoty
Lig 3 (CH ₃)	60,91	21,86	4,72	Teoretické hodnoty
	60,67	21,37	4,46	Naměřené hodnoty
Lig 4 (p-F)	55,27	21,52	3,49	Teoretické hodnoty
	54,82	21,39	3,29	Naměřené hodnoty
Lig 5 (o-F)	55,27	21,52	3,49	Teoretické hodnoty
	54,98	20,07	3,26	Naměřené hodnoty

Tabulka 4: Tabulka teoretických hodnot a výsledků EA. Teoretické hodnoty očekávaného výsledku byly spočítány pomocí programu ChemSketch

MS - připravené ligandy Lig 1, Lig 2 (OCH₃) a Lig 4 (p-F) byly analyzovány pomocí MS. Ve výsledném spektru byly tyto látky charakterizovány velmi intenzivním peakem. ESI- MS: m/z 241,14 [Lig 1]⁻, 271,21 [Lig 2]⁻, 259,9 [Lig 4]⁻.



Obrázek 13: Výsledné spektrum závislosti intenzity signálu na m/z pro Lig 1.

NMR - byly analyzovány všechny připravené ligandy Lig 1, Lig 2 (OCH₃), Lig 3 (CH₃), Lig 4 (*p*-F), Lig 5 (*o*-F).

Lig 1 - ¹H NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 13.55 (bs, 1H, N9H); 8.77 (s, 1H, C2H); 8.55 (s, 1H, C8H); 7.55 (d, 7.5 Hz, 2H, C12H, C16H); 7.35 (m, 2H, C13H, C15H); 7.28 (m, 1H, C14H); 4.74 (s, 2H, C10H).

¹³C NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 158.43 (C6); 151.90 (C2); 150.93 (C4); 143.57 (C8); 138.65 (C11); 129.98 (C5); 129.46 (C12,16); 128.84 (C13,15); 127.52 (C14); 32.26 (C10).

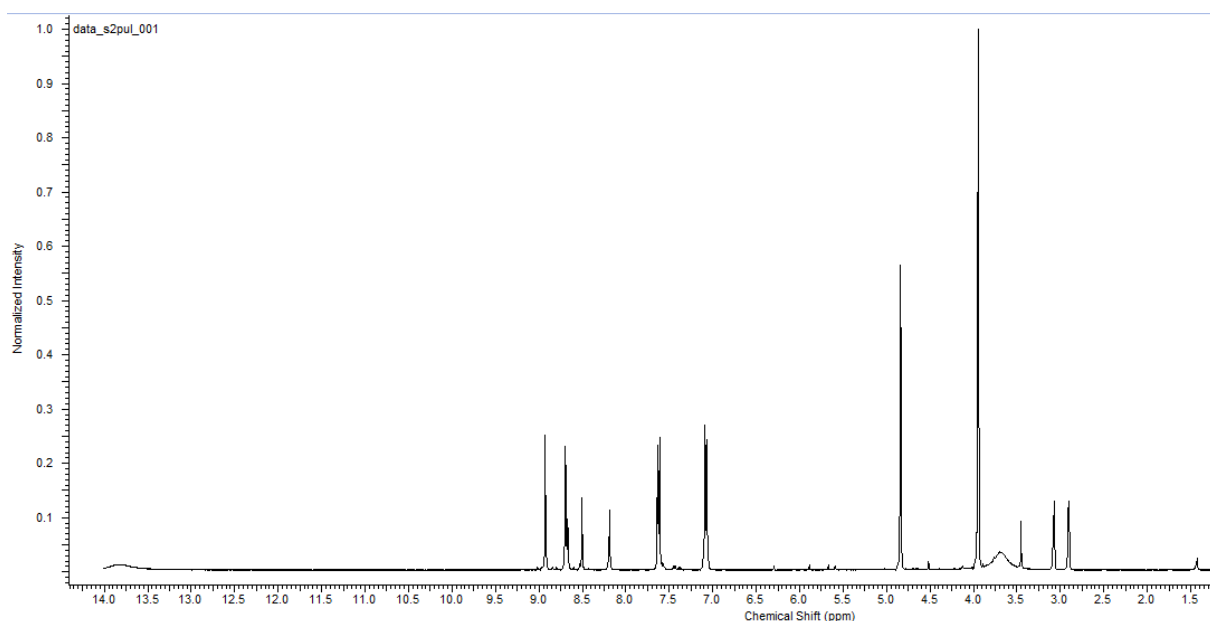
Lig 2 (OCH₃) – ¹H NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 13.55 (bs, 1H, N9H); 8.77 (s, 1H, C2H); 8.53 (s, 1H, C8H); 7.47 (m, 2H, C12H, C16H); 6.92 (m, 2H, C13H, C15H); 4.68 (s, 2H, C10H); 3.79 (s, 3H, CH₃).

Lig 3 (CH₃) - ¹H NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 13.55 (bs, 1H, N9H); 8.76 (s, 1H, C2H); 8.54 (s, 1H, C8H); 7.42 (m, 2H, C12H, C16H); 7.16 (m, 2H, C13H, C15H); 4.59 (s, 2H, C10H); 2.29 (s, 3H, CH₃).

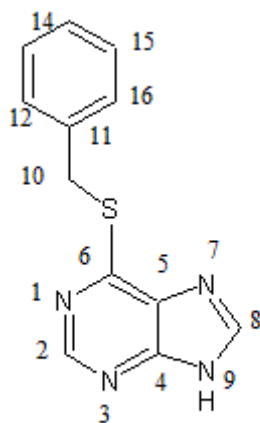
Lig 4 (*p*-F) – ¹H NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 13.35 (bs, 1H, N9H); 8.77 (s, 1H, C2H); 8.55 (s, 1H, C8H); 7.61 (m, 2H, C12H, C16H); 7.17 (m, 2H, C13H, C15H); 4.74 (s, 2H, C10H).

¹³C NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 163.34 (C14); 160.91 (C6); 151.94 (C2); 150.96 (C4); 143.62 (C8); 134.98 (C11); 131.43 (C12,16); 130.06 (C5); 115.42 (C13,15); 31.37 (C10).

Lig 5 (*o*-F) - ¹H NMR (dmf-*d*₇, TMS, ppm): δ 13.63 (bs, 1H, N9H); 8.78 (s, 1H, C2H); 8.55 (s, 1H, C8H); 7.67 (m, 1H, C16H); 7.37 (m, 1H, C14H); 7.21 (m, 2H, C13H, C15H); 4.77 (s, 2H, C10H).



Obrázek 14: NMR spektrum pro Lig 2.



Obrázek 15: Číslování v derivátu 6-MP.

4.2.2 Komplex 1

Postup syntézy: 1,4 mmol $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve směsi 15 ml triethylorthoformiátu a 35 ml methanolu. Roztok byl zahříván na teplotu 60°C a míchán 2 hodiny. Potom bylo přidáno 2,5 mmol Lig 1 a roztok se nechal refluxovat 2 dny. Poté byl komplex separován, promyt vodou, methanolem, diethyletherem a vysušen pod infralampou. Komplex byl světle žlutý prášek, který byl rozpustný v DMF, DMSO a nadbytku acetonitrilu.[39]

EA - očekávané hodnoty: C, 38.07; N, 14.8; H, 2.66. Naměřeno: C, 37.63; N, 14.46; H, 2.31.

Konduktometrie - jako rozpouštědlo byl použit acetonitril ($\Lambda = 0,5 \text{ S} \cdot \text{cm}^2$). Naměřená hodnota $\Lambda_M = 2,5 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

MS - ESI- MS: m/z 375 $[\text{ZnCl}_2(\text{Lig } 1)]^+$, 241 $[\text{Lig } 1]^+$

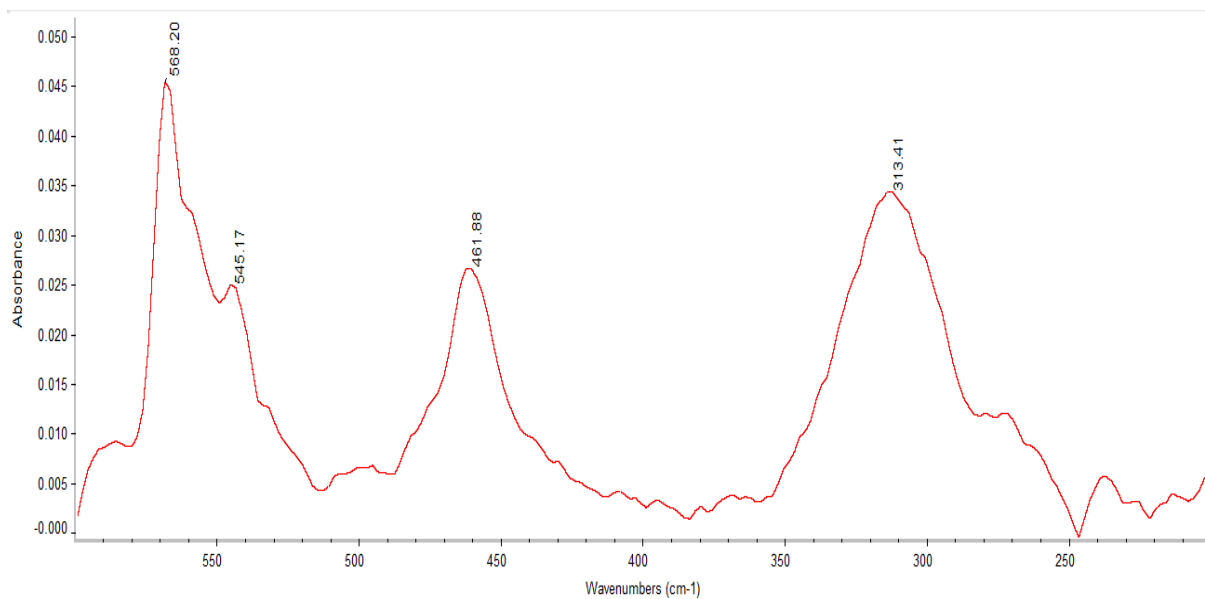
NMR – ^1H NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 13.63 (bs, 1H, N9H); 9.29 (s, 1H, C8H); 8.63 (s, 1H, C2H); 7.45 (m, 2H, C12H, C16H); 7.27 (m, 2H, C13H, C15H); 7.23 (m, 1H, C14H); 4.70 (s, 2H, C10H).

^{13}C NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 161.68 (C6); 153.32 (C2); 151.67 (C4); 149.67 (C8); 138.30 (C11); 133.83 (C5); 129.33 (C12,16); 128.73 (C13,15); 127.40 (C14); 32.92 (C10).

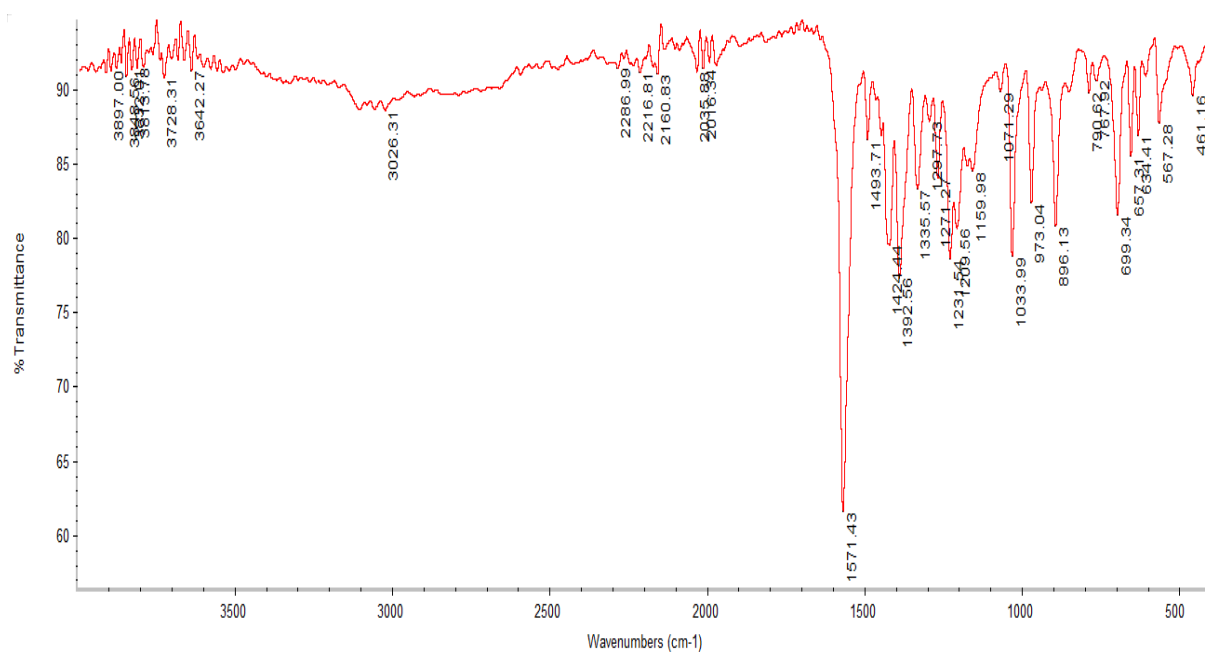
Komplex	^1H NMR			^{13}C NMR					
	N9H	C8H	C2H	C2	C4	C5	C6	C8	C10
1	0,08	0,74	-0,14	1,42	0,74	3,85	3,25	6,02	0,66

Tabulka 5: Vybrané koordinační posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$) pro komplex 1 vypočítané z ^1H and ^{13}C NMR spekter.

IČ – 313 cm^{-1} $\nu(\text{Zn}-\text{Cl})$ a $\nu(\text{Zn}-\text{N})$, 461 cm^{-1} $\nu(\text{Zn}-\text{S})$, 1565 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{N})$ a $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{AROM}}$, 3104 - 3018 cm^{-1} $\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{AROM}}$.



Obrázek 16: Infračervené spektrum komplexu 1 ve FAR oblasti.



Obrázek 17: Infračervené spektrum pro komplex 1 v MID oblasti.

4.2.3 Komplex 2

Postup syntézy: 0,7 mmol $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bylo rozpuštěno ve směsi 15 ml triethylorthoformiátu a 35 ml methanolu. Roztok byl zahříván na teplotu 60°C a míchán 2 hodiny. Potom bylo přidáno 1,25 mmol Lig 1 a roztok se nechal refluxovat 2 dny. Poté byl komplex separován, promyt vodou, methanolem, diethyletherem a vysušen pod infralampou. Komplex byl světle žlutý prášek, který byl rozpustný v DMF a DMSO.

EA - očekávané hodnoty: C, 45.13; N, 13.16; H, 3.79. Naměřeno: C, 45.09; N, 12.66; H, 3.44.

Konduktometrie - jako rozpuštědlo byl použit DMF ($\Lambda = 1,7 \text{ S}\cdot\text{cm}^2$). Naměřená hodnota $\Lambda_M = 8 \text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$.

MS – ESI+ MS: m/z 447 $[\text{Zn}(\text{Lig1})(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{Na}]^+$, 265 $[\text{Lig 1} + \text{Na}]^+$

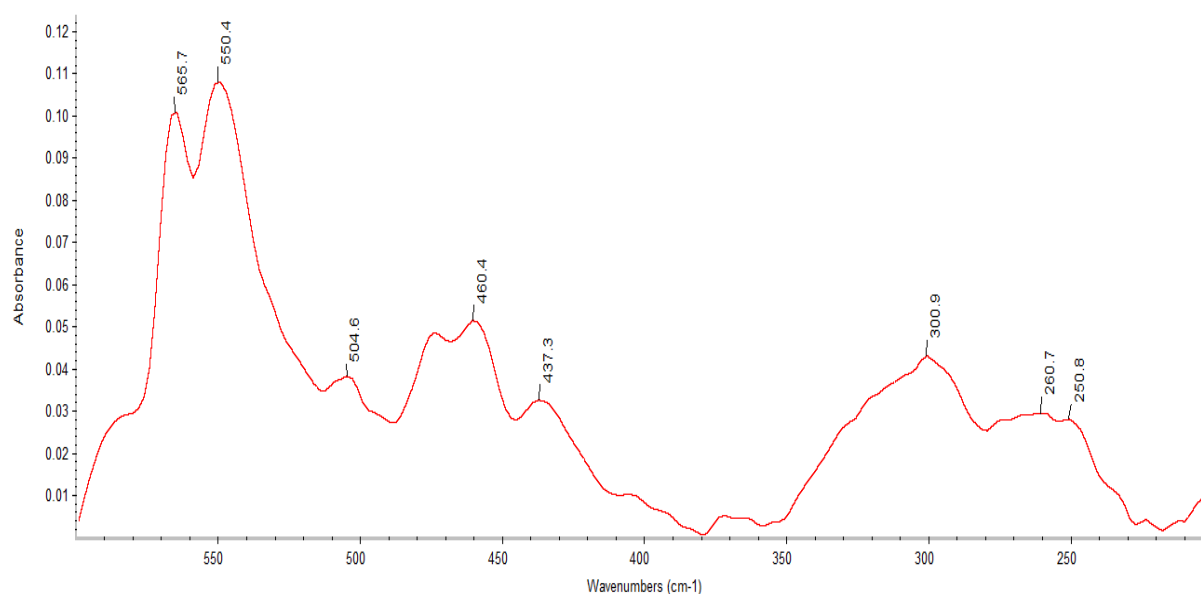
NMR – ^1H NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 13.57 (bs, 1H, N9H); 9.31 (bs, 1H, C8H); 8.83 (bs, 1H, C2H); 7.49 (m, 2H, C12H, C16H); 7.31 (m, 2H, C13H, C15H); 7.24 (m, 1H, C14H); 4.72 (s, 2H, C10H); 2.01 (bs, 6H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

^{13}C NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 174.54 (COO-Ac); 163.12 (C6); 153.27 (C2); n.d. (C4); 149.95 (C8); 138.47 (C11); 133.18 (C5); 129.40 (C12,16); 128.79 (C13,15); 127.46 (C14); 32.66 (C10); 21.27 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$).

Komplex	^1H NMR			^{13}C NMR					
	N9H	C8H	C2H	C2	C4	C5	C6	C8	C10
2	0,02	0,76	0,06	1,37	-	3,20	4,69	6,38	0,40

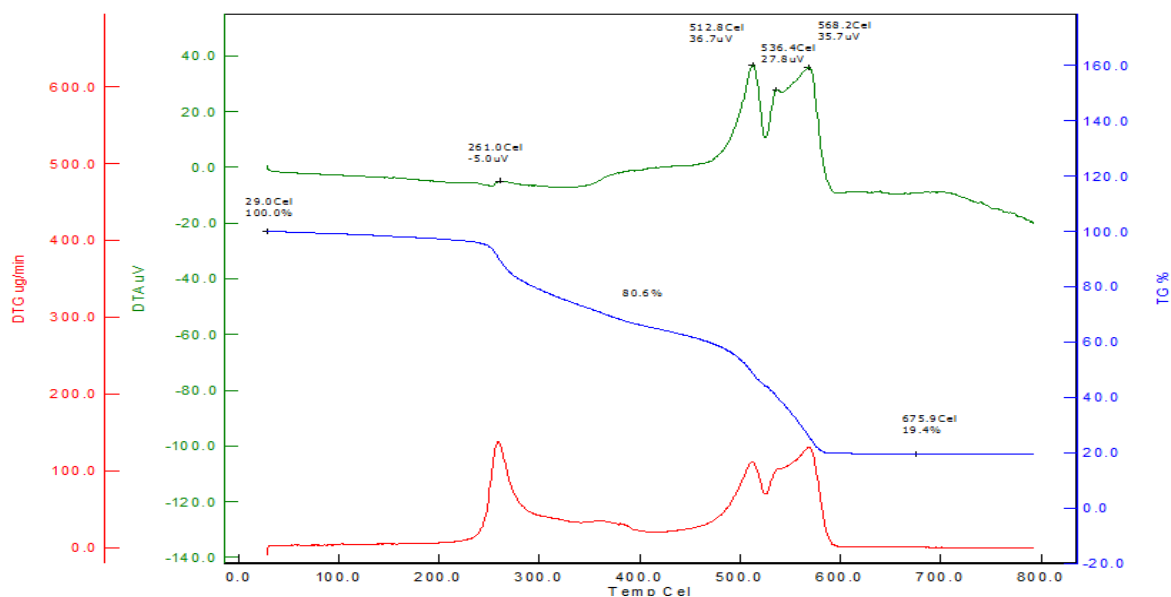
Tabulka 6: Vybrané koordinační posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$) pro komplex 2 vypočítané z ^1H and ^{13}C NMR spekter.

IČ – 250 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-O})$, 303 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-N})$, 461 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-S})$, $1586\text{-}1565 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$, $3085\text{-}3010 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$, 2962 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})_{\text{Alif}}$.



Obrázek 18: Infračervené spektrum ve FAR oblasti pro komplex 2.

TA – Termický rozklad: $200\text{-}600^\circ\text{C}$, exo-efekty: 261°C , 512°C , 568°C .



Obrázek 19: Graficky znázorněný průběh termické analýzy. Modrá křivka – TG, červená křivka – DTG, zelená křivka – DTA.

4.2.4 Komplex 3

Postup syntézy: 0,7 mmol $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve směsi 15 ml triethylorthoformiátu a 35 ml methanolu. Roztok byl zahříván na teplotu 60°C a míchán 2 hodiny. Potom bylo přidáno 1,25 mmol Lig 1 a roztok se nechal refluxovat 2 dny. Poté byl komplex separován, promyt vodou, methanolem, diethyletherem a vysušen pod infralampou. Komplex byl světle žlutý prášek, který byl rozpustný v DMF a DMSO.

EA - očekávané hodnoty: C, 42.77; N, 20.78; H, 2.99. Naměřeno: C, 4.43; N, 20.62; H, 2.74.

Konduktometrie - jako rozpuštědlo byl použit DMF ($\Lambda = 1,7 \text{ S} \cdot \text{cm}^2$). Naměřená hodnota $\Lambda_M = 2,7 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

MS – ESI+ MS: m/z 711 $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{NO}_3)_2 + \text{K}]^+$, 265 $[\text{Lig 1} + \text{Na}]^+$.

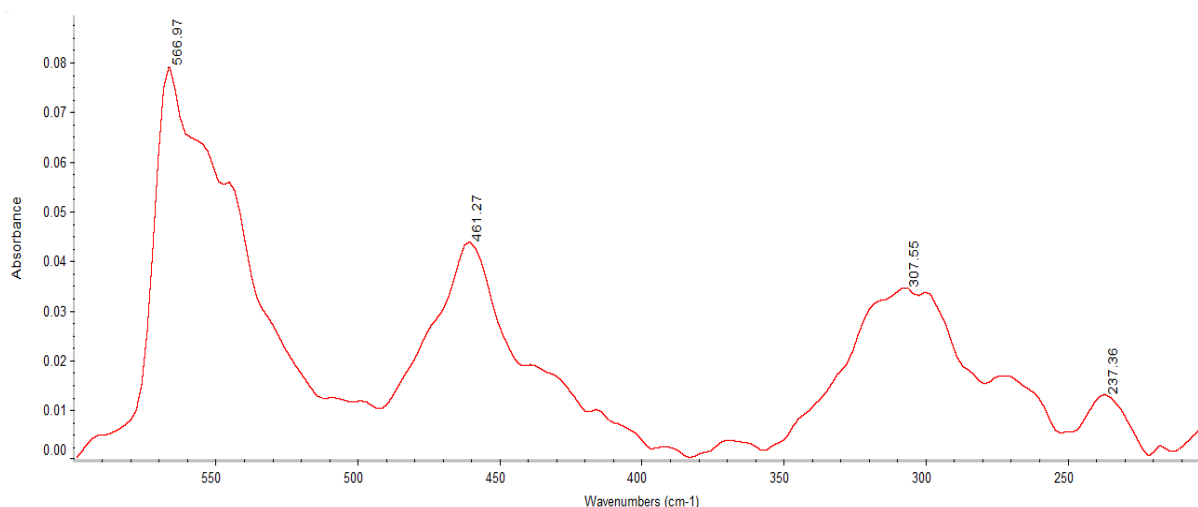
NMR – ^1H NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 13.63 (bs, 1H, N9H); 9.31 (bs, 1H, C8H); 8.75 (bs, 1H, C2H); 7.51 (m, 2H, C12H, C16H); 7.32 (m, 2H, C13H, C15H); 7.26 (m, 1H, C14H); 4.73 (s, 2H, C10H).

^{13}C NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 161.51 (C6); 153.26 (C2); 151.93 (C4); 149.71 (C8); 138.61 (C11); 134.19 (C5); 129.43 (C12,16); 128.81 (C13,15); 127.48 (C14); 33.31 (C10).

Komplex	^1H NMR			^{13}C NMR					
	N9H	C8H	C2H	C2	C4	C5	C6	C8	C10
3	0,08	0,76	-0,02	1,36	1.00	4.21	3,08	6,14	1.05

Tabulka 7: Vybrané koordinační posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$) pro komplex 3 vypočítané z ^1H and ^{13}C NMR spekter.

IČ - 237 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-O})$, 307 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-N})$, 461 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-S})$, $1586\text{-}1565\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$, $3060\text{-}3028\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$.



Obrázek 20: Infračervené spektrum ve FAR oblasti pro komplex 3.

4.2.5 Komplex 4

Postup syntézy: 0,35 mmol $\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve směsi 15 ml triethylorthoformiátu a 35 ml methanolu. Roztok byl zahříván na teplotu 60°C a míchán 2 hodiny. Potom bylo přidáno 0,65 mmol Lig 1 a roztok se nechal refluxovat 2 dny. Poté byl komplex separován, promyt vodou, methanolem, diethyletherem a vysušen pod infralampou. Komplex byl světle žluté prášek, který byl rozpustný v DMF a DMSO.

EA - očekávané hodnoty: C, 44.62; N, 17.34; H, 3.22. Naměřeno: C, 43.86; N, 17.14; H, 3.11.

Konduktometrie - jako rozpuštědlo byl použit DMF ($\Lambda = 1,7\text{ S}\cdot\text{cm}^2$). Naměřená hodnota $\Lambda_{\text{M}} = 2,7\text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$.

MS - ESI- MS: m/z 739 $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{SO}_4)_2]^-$, 241 $[\text{Lig 1}]^-$.

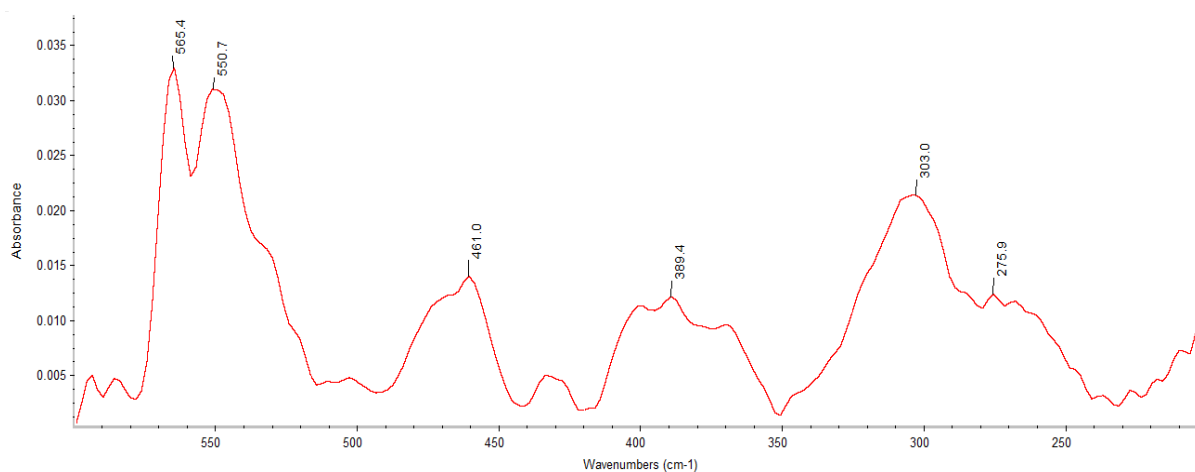
NMR – ^1H NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 13.62 (bs, 1H, N9H); 9.30 (bs, 1H, C8H); 8.76 (bs, 1H, C2H); 7.52 (m, 2H, C12H, C16H); 7.32 (m, 2H, C13H, C15H); 7.26 (m, 1H, C14H); 4.73 (s, 2H, C10H).

^{13}C NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 161.54 (C6); 153.28 (C2); 151.68 (C4); 149.60 (C8); 138.61 (C11); 134.16 (C5); 129.43 (C12,16); 128.81 (C13,15); 127.47 (C14); 32.68 (C10).

Komplex	^1H NMR			^{13}C NMR					
	N9H	C8H	C2H	C2	C4	C5	C6	C8	C10
4	0,07	0,75	-0,01	1,38	0.78	4.18	3,11	6.03	0.42

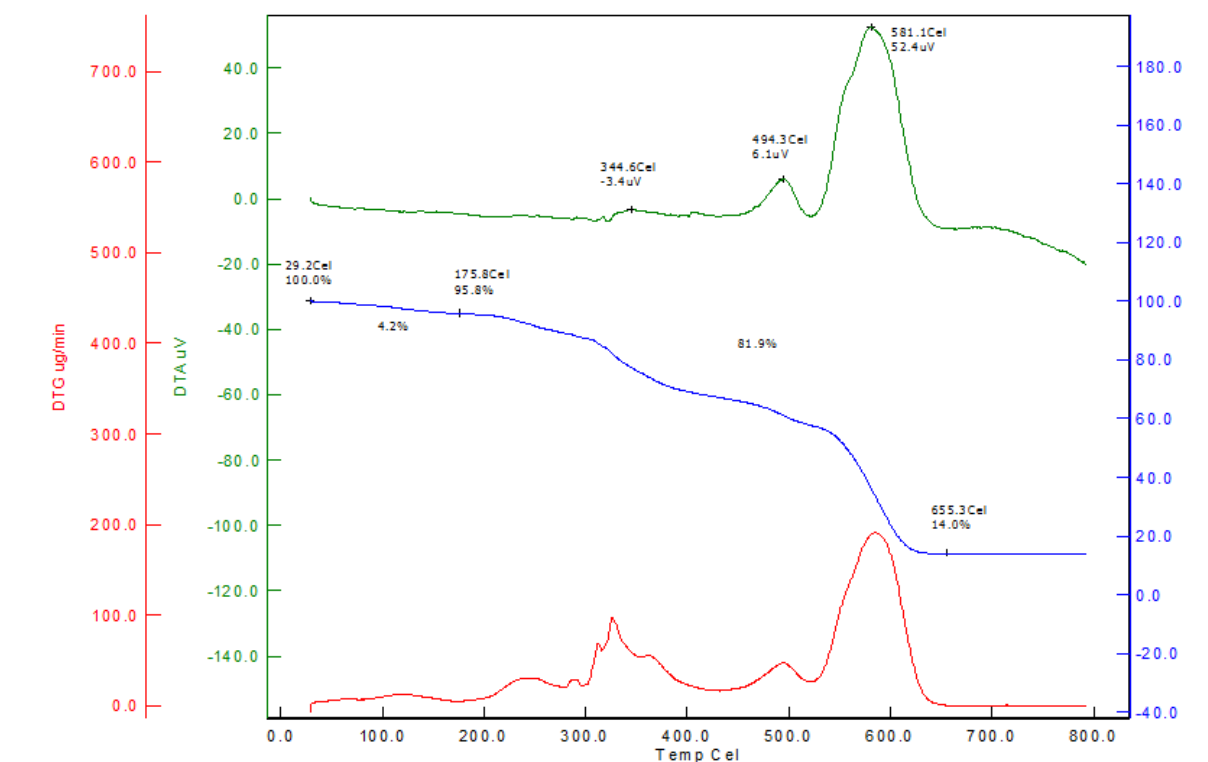
Tabulka 8: Vybrané koordinační posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$) pro komplex 4 vypočítané z ^1H and ^{13}C NMR spekter.

İÇ - 303 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-N})$, 461 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-S})$, 1586-1565 cm^{-1} $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$, 3085-2962 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$.



Obrázek 21: Infračervené spektrum ve FAR oblasti pro komplex 4.

TA – Termický rozklad: 200-600°C, exo-efekty: 344°C, 494°C, 581°C.



Obrázek 22: Graficky znázorněný průběh termické analýzy. Modrá křivka – TG, červená křivka – DTG, zelená křivka – DTA.

4.2.6 Komplex 5

Postup syntézy: 0,7 mmol $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve směsi 15 ml triethylorthoformiátu a 35 ml methanolu. Roztok byl zahříván na teplotu 60°C a míchán 2 hodiny. Potom bylo přidáno 1,25 mmol Lig 4 (p-F) a roztok se nechal refluxovat 2 dny. Poté byl komplex

separován, promyt vodou, methanolem, diethyletherem a vysušen pod infralampou. Komplex byl světle žlutý prášek, který byl rozpustný v DMF a DMSO.

EA - očekávané hodnoty: C, 42.71; N, 16.6; H, 2.99. Naměřeno: C, 42.3; N, 16.08; H, 2.81.

Konduktometrie - jako rozpouštědlo byl použit DMF ($\Lambda = 1,7 \text{ S}\cdot\text{cm}^2$). Naměřená hodnota $\Lambda_M = 38 \text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$.

MS - ESI- MS: m/z 653 $[\text{Zn}(\text{Lig})_2\text{Cl}_2]^-$, 259 $[\text{Lig } 4]^-$.

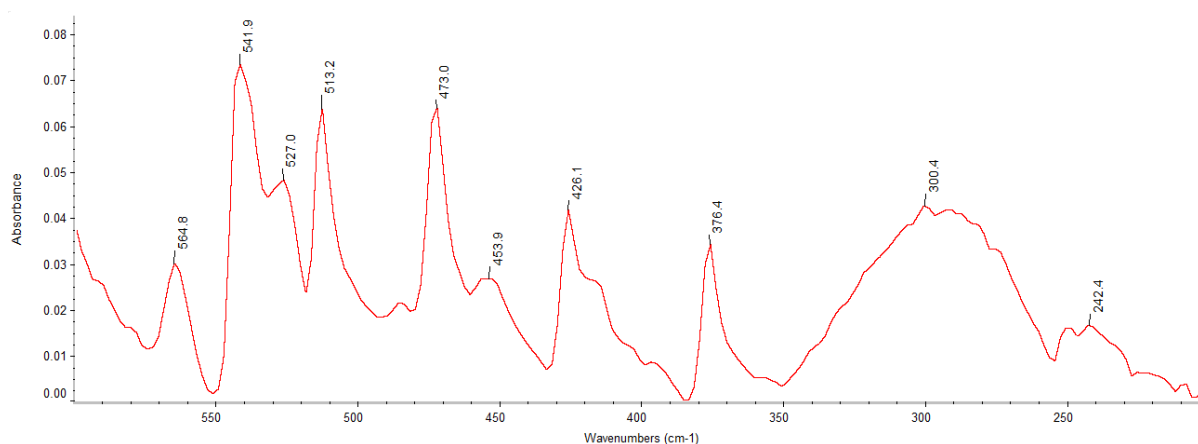
NMR – ^1H NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 13.58 (bs, 1H, N9H); 8.78 (bs, 1H, C2H); 8.69 (bs, 1H, C8H); 7.56 (m, 2H, C12H, C16H); 7.13 (m, 2H, C13H, C15H); 4.70 (s, 2H, C10H).

^{13}C NMR (dmf- d_7 , TMS, ppm): δ 163.15 (C14); 157.72 (C6); 152.64 (C2); 151.69 (C4); 148.02 (C8); 134.69 (C11); 132.50 (C5); 131.32 (C12,16); 115.31 (C13,15); 31.53 (C10).

Komplex	^1H NMR			^{13}C NMR					
	N9H	C8H	C2H	C2	C4	C5	C6	C8	C10
5	0,03	0,14	0,01	0,70	0.73	2.44	-3,19	4.40	0.16

Tabulka 9: Vybrané koordinační posuny ($\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$) pro komplex 5 vypočítané z ^1H and ^{13}C NMR spekter.

IČ – 300 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-N})$ a $\nu(\text{Zn-Cl})$, 454 cm^{-1} $\nu(\text{Zn-S})$, $1567\text{-}1675 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$, $3085\text{-}3024 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$, 2974 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})_{\text{Alif}}$.



Obrázek 23: Infračervené spektrum ve FAR oblasti pro komplex 5.

TA – Termický rozklad: $200\text{-}600^\circ\text{C}$, exo-efekty: 353°C , 482°C , 596°C .

4.2.7 Ostatní provedené syntézy

Celkem bylo provedeno velké množství syntéz s 5 různými druhy ligandů odvozenými od 6-MP (všechny ligandy jsou popsány v kapitole 4.2.1). Jako výchozí látky byly použity $\text{ZnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Při postupu syntéz podle výše uvedeného návodu, byl ve filtrátu většinou přítomen ligand, a proto se

upravoval poměr látkových množství (1:1, 1:2, 1,4:2,5, 1:4).[39] Nicméně ideální poměr látkových množství byl značně individuální pro každou výchozí látku. Většina připravených látek byly prášky, ale byly připraveny i látky konzistence lepidla. Ani rekrytalizací a difuzní krytalizací se u žádné připravené látky nepodařilo získat monokrytal pro rentgenostrukturní analýzu, pokud ke krytalizaci došlo, tak se jednalo o krytalky ligandu. Typické zbarvení připravených sloučenin bylo světle žluté, ale bylo připraveno několik sloučenin lišících se zbarvením (světle hnědá, tmavě žlutá). Dále byla provedena reakce s cílem zjistit, zdali se dá připravit Zn(II) komplex s Lig 1 v okyseleném prostředí. Lig 1 byl rozpuštěn v 40 ml methanolu. Roztok byl okyselen na pH pomocí 0,1 M HCl a zahříván pod refluxem při $t=60^{\circ}\text{C}$. Do roztoku byl přidán 1 mmol $\text{ZnCl}_2 \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$, roztok byl udržován při $t=60^{\circ}\text{C}$ a míchán po 2 dny. Tato syntéza neměla úspěch a pravděpodobně vlivem rozkladu roztoku vznikla zapáchající hnědá lepkavá látka, kterou se nepodařilo separovat. Výtěžky všech provedených syntéz byly různé.

4.3 Diskuze a výsledky

4.3.1 Komplex 1

EA - Výsledky poskytly první odhadnutí složení komplexu na $[\text{Zn}(\text{Lig1})\text{Cl}_2]$. Odchylka od očekávaných hodnot byla $< 0,5\%$.

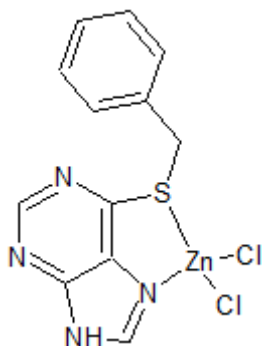
Konduktometrie - Podle výsledku měření $\Lambda_{\text{M}}=2,5 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lze usoudit, že komplex je neelektrolyt tzn., že nemá ionty mimo koordinační sféru.

MS - Ve výsledném hmotnostním spektru byla při 375 m/z potvrzena přítomnost predikovaného komplexu $[\text{Zn}(\text{Lig1})\text{Cl}_2]$. Samotný Lig 1 byl pozorován velmi intenzivním peakem při 241 m/z .

NMR – V případě ^1H a ^{13}C NMR spekter komplexu 1 byly identifikovány všechny signály organické molekuly Lig 1. Vlivem koordinace měly ale některé signály jiný chemický posun. Tyto změny vyjádřené koordinačním posunem $\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$ (Tabulka č.5) byly v případě protonových spekter nejvýraznější pro signál C8H (0,74 ppm). Nejvíce posunuty byly v ^{13}C spektrech signály uhlíků C8 (6,02 ppm) a C5 (3,85 ppm), což nasvědčuje tomu, že se organický ligand na zinek koordinuje přes dusíkový atom N7 purinového skeletu. Navíc ale došlo k výrazným posunům i v případě uhlíků C6 (3,25 ppm) a C10 (0,66 ppm), které jsou v přímé blízkosti atomu síry. Na základě těchto výsledků můžeme navrhnout bidentátní koordinaci Lig 1 přes atomy síry a dusíku N7.

IČ – Infračervená spektra byla měřena ve FAR i MID oblasti pro samotný Lig 1 a připravený Zn(II) komplex. Ve FAR oblasti byl pozorován velmi široký intenzivní vibrační pás při 313 cm^{-1} . Tento vibrační pás můžeme přiřadit vibracím $\nu(\text{Zn-Cl})$ a $\nu(\text{Zn-N})$, jejichž vibrace jsou si velmi blízké (vibrace vazby Zn-N můžeme podle literatury pozorovat při 286-297 cm^{-1} a vibrace vazby Zn-Cl při 302-330 cm^{-1}). Výrazný intenzivní vibrační pás při 461 cm^{-1} je typický pro všechny připravené komplexy a v samotném ligandu se nenachází. S velkou pravděpodobností se tedy jedná o vibraci $\nu(\text{Zn-S})$. Bohužel v dostupné literatuře a odborných publikacích, se nepodařilo vyhledat oblast vibrací $\nu(\text{Zn-S})$, kromě jediného zdroje, který uvádí oblast vibrace této vazby při 370 cm^{-1} , ale v podstatně odlišném chemickém systému.[40] V MID oblasti byl pozorován intenzivní vibrační pás při 1565 cm^{-1} vibrací $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$. Slabé vibrační pásy v oblasti 3104-3018 cm^{-1} jsou způsobeny vibrací $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$. IČ spektra jednoznačně potvrdila přítomnost Lig 1 v komplexu. Ze získaných výsledků naměřených spekter lze usoudit, že ligand se na centrální atom koordinuje bidentátně (přes atomy N a S).[41]

Závěr – Podle výsledků provedených analýz můžeme navrhnout pravděpodobnou strukturu komplexu 1 $[\text{Zn}(\text{Lig1})\text{Cl}_2]$. Stěžejní byly výsledky NMR, podle kterých můžeme usoudit, že Lig 1 se na Zn(II) koordinuje bidentátně přes atomy N7 a S. Tento návrh bidentátní koordinace Lig 1 potvrdily také výsledky IČ, kde se podařilo s velkou pravděpodobností určit vibraci vazby $\nu(\text{Zn-S})$. Ligand 1 se tedy na Zn(II) koordinuje bidentátně, a to přes atomy N7 a S. Centrální atom má koordinační číslo 4, komplex neobsahuje žádné solvátomolekuly ani vodivé ionty mimo koordinační sféru a chromofor připraveného komplexu je ZnSNCl_2 . Nicméně se nepodařilo získat monokrystal komplexu pro rentgenostrukturní analýzu, která by pravděpodobnou strukturu komplexu jednoznačně potvrdila. Připravený komplex měl žluté zbarvení a byl dobře rozpustný v DMF a DMSO.



Obrázek 24: Pravděpodobná struktura komplexu 1.

4.3.2 Komplex 2

EA - Výsledky EA poskytly první odhadnutí složení komplexu na $[\text{Zn}(\text{Lig1})(\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Odchylka od očekávaných hodnot byla $< 0,5\%$.

Konduktometrie – Podle výsledku měření $\Lambda_M = 8 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lze usoudit, že komplex je neelektrolyt tzn., že nemá ionty mimo koordinační sféru.

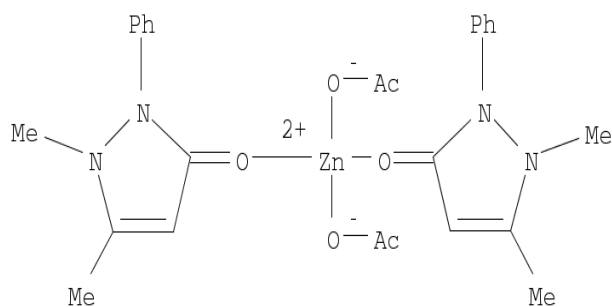
MS – Ve výsledném hmotnostním spektru byla při 447 m/z potvrzena přítomnost predikovaného komplexu $[\text{Zn}(\text{Lig1})(\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Samotný Lig 1 byl pozorován při 265 m/z .

NMR – V případě ^1H a ^{13}C NMR spekter komplexu 2 byly pozorovány všechny signály organické molekuly Lig 1 kromě uhlíku C4, který nebyl detekován (n.d.). Koordinační posuny $\Delta\delta = \delta_{\text{komplex}} - \delta_{\text{ligand}}$ byly velmi podobné těm vypočítaným pro komplex 1, tedy byly nejvýznamnější pro signál C8H (0,76 ppm); nejvíce posunuty byly v ^{13}C spektrech signály uhlíků C8 (6,38 ppm), C6 (4,69 ppm) a C5 (3,20 ppm), což nasvědčuje tomu, že se organický ligand na Zn(II) koordinuje přes dusíkový atom N7 purinového skeletu a atom síry.

IČ – Infračervená spektra byla měřena ve FAR i MID oblasti pro samotný Lig 1 a připravený Zn(II) komplex. Ve FAR oblasti se analýzou podařilo určit při 303 cm^{-1} vibraci $\nu(\text{Zn-N})$. Opět byl pozorován výrazný peak při 461 cm^{-1} , který můžeme přiřadit vibraci $\nu(\text{Zn-S})$. V MID oblasti byly pozorovány silné vibrační pásy $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$ při 1586-1565 cm^{-1} , slabé vibrační pásy $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$ v oblasti 3085-2962 cm^{-1} a středně intenzivní vibrační pás při 2962 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})_{\text{Alif}}$. IČ spektra jednoznačně potvrdila přítomnost Lig 1 v komplexu. Z výsledků infračerveného spektra lze usoudit, že Lig 1 se váže na Zn(II) bidentátně (přes atomy S a N).

TA – Termický rozklad začal kolem 200°C a skončil při 600°C. Celkový úbytek hmotnosti činil 80,6 %. Finální produkt termického rozkladu byl vypočten jako ZnO. Rozdíl naměřené a vypočítané hodnoty 19,4 % / 19,1 %. Odchylka od ideální hodnoty je tedy 0,3 %. Z průběhu TG křivky můžeme usoudit, že v komplexu nejsou žádné solvátomolekuly a vypočítané složení komplexu je $[\text{Zn}(\text{Lig1})(\text{CH}_3\text{COO})_2]$.

Závěr – Z výsledků provedených analýz lze usoudit, že pravděpodobná struktura komplexu 2 je $[\text{Zn}(\text{Lig1})(\text{CH}_3\text{COO})_2]$. Stěžejní byly opět výsledky NMR a IČ, kdy se podařilo ze získaných výsledků navrhnout koordinaci Lig 1 přes atomy N7 a S. Ligand 1 se na Zn(II) tedy koordinuje bidentátně přes atomy N7 a S. Acetát se na centrální atom koordinuje pravděpodobně monodentátně.[42] Zn(II) má tedy koordinační číslo 4 a chromofor je ZnSNO_2 . Nepodařilo se získat monokrystal pro rentgenostrukturní analýzu, která by jednoznačně určila strukturu komplexu.



Obrázek 25: Obrázek ukazuje strukturu ukázkového Zn(II) komplexu.[42]

4.3.3 Komplex 3

EA – Výsledky EA poskytly první odhadnutí složení komplexu na $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{NO}_3)_2]$. Odchylka od očekávaných hodnot byla $< 0,5\%$.

Konduktometrie – Podle výsledku měření $\Lambda_M = 2,7 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lze usoudit, že komplex je neelektrolyt tzn., že nemá ionty mimo koordinační sféru.

MS – Ve výsledném hmotnostním spektru byla při 711 m/z potvrzena přítomnost predikovaného komplexu $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{NO}_3)_2]$. Samotný Lig 1 byl pozorován při 265 m/z .

NMR – V NMR spektrech komplexu 3 byly detekovány všechny signály organické molekuly Lig 1. Závěry plynoucí z provedené NMR studie jsou analogické k předchozím komplexům, tedy nejvýznamnější koordinační posuny vykazovaly signály C8H ($0,76 \text{ ppm}$) v protonovém spektru a C8 ($6,14 \text{ ppm}$), C5 ($4,12 \text{ ppm}$), C6 ($3,08 \text{ ppm}$) a také C10 ($1,05 \text{ ppm}$), což opět nasvědčuje tomu, že se organický ligand na Zn(II) koordinuje přes dusíkový atom N7 purinového skeletu a atom síry.

IČ - Infračervená spektra byla měřena ve FAR i MID oblasti pro samotný Lig 1 a připravený Zn(II) komplex. Ve FAR oblasti se analýzou podařilo určit při 307 cm^{-1} vibraci $\nu(\text{Zn-N})$. Opět byl pozorován výrazný peak při 461 cm^{-1} , který můžeme přiřadit vibraci $\nu(\text{Zn-S})$. Středně výrazný vibrační pás $\nu(\text{Zn-O})$ v oblasti 237 cm^{-1} . V MID oblasti byly pozorovány silné vibrační pásy $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$ při $1586\text{--}1565 \text{ cm}^{-1}$ a slabé vibrační pásy $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$ v oblasti $3060\text{--}3028 \text{ cm}^{-1}$. IČ spektra jednoznačně potvrdila přítomnost Lig 1 v komplexu. Z infračerveného spektra můžeme usoudit, že Lig 1 se váže na Zn(II) bidentátně (přes atomy S a N).

Závěr – Podle výsledků provedených analýz lze usoudit, že připravený komplex má pravděpodobně strukturu $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{NO}_3)_2]$. Stejně jako v případě předešlých komplexů byly velmi důležité výsledky především NMR a IČ, z kterých se podařilo určit bidentátní koordinaci Lig 1 na Zn(II) přes atomy N7 a S. Zn(II) má koordinační číslo 6, komplex

neobsahuje žádné solvátomolekuly ani ionty mimo koordinační sféru centrálního atomu, je dobře rozpustný v DMF i DMSO a chromofor komplexu je $\text{ZnN}_2\text{S}_2\text{O}_2$. Nepodařilo se získat monokrystal komplexu pro rentgenostrukturní analýzu, která by jednoznačně potvrdila navrhovanou strukturu.

4.3.4 Komplex 4

EA – Výsledky EA poskytly první odhadnutí složení komplexu na $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{SO}_4)]$. Odchylka od očekávaných hodnot byla $< 0,5\%$.

Konduktometrie – Podle výsledku měření $\Lambda_M = 2,7 \text{ S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lze usoudit, že komplex je neelektrolyt tzn., že nemá ionty mimo koordinační sféru.

MS – Ve výsledném hmotnostním spektru byla při 739 m/z potvrzena přítomnost predikovaného komplexu $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{SO}_4)]$. Samotný Lig 1 byl pozorován při 241 m/z .

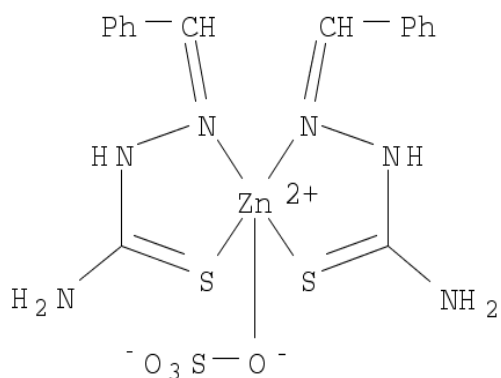
NMR – V NMR spektrech komplexu 4 byly pozorovány všechny signály organické molekuly Lig 1. Stejně jako u dříve diskutovaných komplexů, výsledky NMR studie souhlasí s navrženou bidentátní koordinací Lig 1 na atom zinku přes atomy S a N7, protože nejvýznamnější koordinační posuny vykazovaly signály C8H (0,75 ppm) v protonovém spektru a C8 (6,03 ppm), C5 (4,18 ppm), C6 (3,11 ppm) v ^{13}C spektru.

IČ – Infračervená spektra byla měřena ve FAR i MID oblasti pro samotný Lig 1 a připravený Zn(II) komplex. Ve FAR oblasti se analýzou podařilo určit při 303 cm^{-1} vibraci $\nu(\text{Zn-N})$. Opět byl pozorován výrazný peak při 461 cm^{-1} , který můžeme přiřadit vibraci $\nu(\text{Zn-S})$. V MID oblasti byly pozorovány silné vibrační pásy $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$ při $1586\text{--}1565 \text{ cm}^{-1}$ a slabé vibrační pásy $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$ v oblasti $3085\text{--}2962 \text{ cm}^{-1}$. Z infračerveného spektra můžeme usoudit, že Lig 1 se váže na Zn(II) bidentátně (přes atomy S a N).

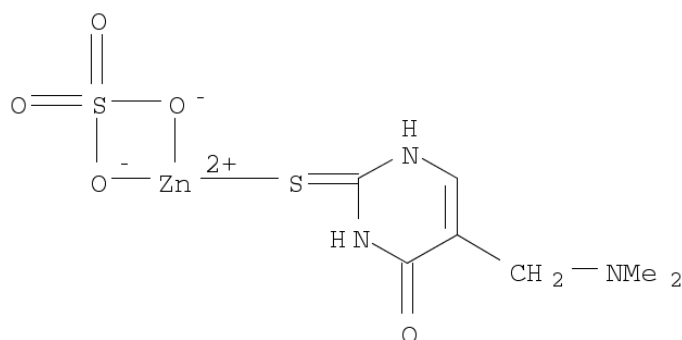
TA – Termický rozklad začal kolem 180°C a skončil při 620°C . Celkový úbytek hmotnosti činil 86 %. Finální produkt termického rozkladu byl vypočten jako ZnO. Rozdíl naměřené a vypočítané hodnoty 14 % / 12,59 %. Odchylka od ideální hodnoty je tedy 1,41 %. Z průběhu TG křivky můžeme usoudit, že v komplexu nejsou žádné solvátomolekuly a vypočítané složení komplexu je $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{SO}_4)]$.

Závěr - Podle výsledků provedených analýz lze usoudit, že připravený komplex má složení $[\text{Zn}(\text{Lig1})_2(\text{SO}_4)]$. Podle výsledků NMR a IČ se dá usoudit, že Ligand 1 se na Zn(II) koordinuje bidentátně přes atomy N7 a S. Rozdíl oproti jiným komplexům je, že SO_4^{2-} se na Zn(II) může koordinovat třemi základními způsoby. První způsob je monodentátní koordinace.[43] Zn(II) by měl v tomto případě koordinační číslo 5. Druhá možnost je bidentátní koordinace přes dva atomy kyslíku.[44] Zn(II) by tedy měl koordinační číslo 6, což

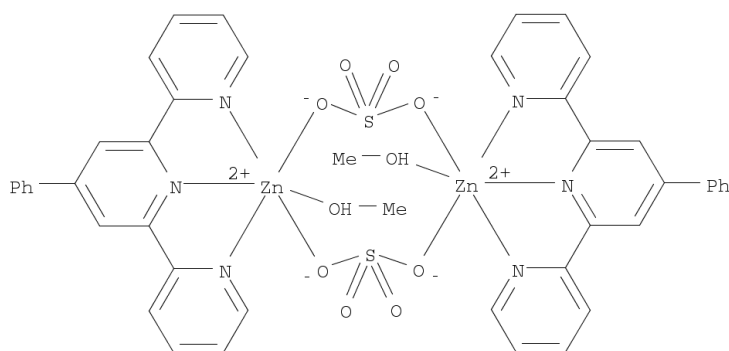
je velmi pravděpodobné. Poslední možností je, že SO_4^{2-} vystupuje jako můstek mezi dvěma centrálními atomy.[45] Bohužel se nepodařilo získat monokrystal komplexu pro rentgenostrukturní analýzu, která by jednoznačně potvrdila strukturu komplexu. Komplex neobsahuje žádné solvátomolekuly ani ionty mimo koordinační sféru centrálního atomu a je dobře rozpustný v DMF i DMSO.



Obrázek 26: Příklad monodentátní koordinace SO_4^{2-} na Zn(II).[43]



Obrázek 27: Příklad bidentátní koordinace SO_4^{2-} na Zn(II).[44]



Obrázek 28: Příklad Zn(II) komplexu, kde vystupuje SO_4^{2-} jako můstek mezi dvěma centrálními atomy.[45]

4.3.5 Komplex 5

EA – Výsledky EA poskytly první odhadnutí složení komplexu na $[\text{Zn}(\text{Lig}4)_2\text{Cl}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Odchylka od očekávaných hodnot byla $< 0,5\%$.

Konduktometrie – Tento komplex měl výrazně vyšší $\Lambda_M=38 \text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ než ostatní komplexy, ale i přesto se jedná o neelektrolyt.

MS – Ve výsledném hmotnostním spektru byla při 653 m/z potvrzena přítomnost predikovaného komplexu $[\text{Zn}(\text{Lig}4)_2\text{Cl}_2]$. Samotný Lig 4 byl pozorován při 259 m/z .

NMR – V případě ^1H a ^{13}C NMR spekter komplexu 5 byly pozorovány všechny signály organické molekuly Lig 4 ($p\text{-F}$). V tomto případě byly hodnoty koordinačních posunů odlišné od předchozích diskutovaných komplexů, což pravděpodobně souvisí s přítomností atomu fluoru v para-poloze na benzenovém jádru organického ligandu. Nicméně opět byly $\Delta\delta$ v případě protonových spekter nejvýraznější pro signál C8H (0,14 ppm). Největší změny chemického posunu byly v ^{13}C spektrech pozorovány pro signály uhlíků C8 (4,40 ppm), C6 (-3,18 ppm) a C5 (2,44 ppm), což opět nasvědčuje tomu, že se organický ligand na zinek koordinuje přes dusíkový atom N7 purinového skeletu a atom síry.

IČ – Na rozdíl od ostatních charakterizovaných komplexů, byl u tohoto komplexu použit jiný ligand Lig 4 ($p\text{-F}$). Infračervené spektrum bylo jako u ostatních komplexů změřeno ve FAR i MID oblasti pro samotný Lig 4 a Zn(II) komplex. Tento komplex nevykazoval tak výrazný vibrační pás $\nu(\text{Zn-S})$, jako ostatní komplexy, ale v oblasti 454 cm^{-1} můžeme pozorovat vibrační pás menší intenzity. Drobná odchylka od ostatních komplexů je nejspíše způsobena jiným ligandem ($p\text{-F}$). Velmi široký vibrační pás v oblasti kolem 300 cm^{-1} je způsoben velmi blízkými vibracemi $\nu(\text{Zn-N})$ a $\nu(\text{Zn-Cl})$. V MID oblasti byly jednotlivé vibrační pásy ligandu takřka totožné s vibračními pásy komplexu. Byly pozorovány silné vibrační pásy $\nu(\text{C=N})$ a $\nu(\text{C-C})_{\text{AROM}}$ při $1567\text{--}1675 \text{ cm}^{-1}$, slabé vibrační pásy $\nu(\text{C-H})_{\text{AROM}}$ v oblasti $3085\text{--}3024 \text{ cm}^{-1}$ a slabý vibrační pás při 2974 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})_{\text{Alif}}$. IČ spektra jednoznačně potvrdila přítomnost Lig 4 v komplexu. Z infračerveného spektra můžeme usoudit, že Lig 4 se váže na Zn(II) také bidentátně (přes atomy S a N).

TA – Termický rozklad komplexu začal kolem 170°C a skončil při 630°C . Celkový úbytek hmotnosti činil 90,5 %. Finální produkt termického rozkladu byl vypočten jako ZnO. Rozdíl naměřené a vypočítané hodnoty 9,5 % / 12,4 %. Odchylka od ideální hodnoty 2,9 %. Z průběhu TG křivky můžeme usoudit, že komplex obsahuje jednu molekulu vody mimo koordinační sféru centrálního atomu a navrhovaná struktura komplexu je $[\text{Zn}(\text{Lig}4)_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Lig= $p\text{-F}$).

Závěr – Z výsledků provedených analýz lze usoudit, že pravděpodobná struktura komplexu je $[\text{Zn}(\text{Lig}4)_2\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$. Na rozdíl od ostatních charakterizovaných komplexů byl použit jiný Ligand 4 ($p\text{-F}$) a komplex obsahuje navázanou jednu molekulu vody mimo koordinační sféru centrálního atomu. Stěžejní opět byly výsledky NMR a IČ, z kterých můžeme usoudit na

bidentátní koordinaci Lig 4 na Zn(II) přes atomy N7 a S. Zn(II) má koordinační číslo 6 a chromofor je $\text{ZnS}_2\text{N}_2\text{Cl}_2$. Komplex je dobře rozpustný v DMF a DMSO. Nicméně stejně jako v případě ostatních charakterizovaných komplexů, se nepodařilo získat monokrystal pro rentgenovou strukturní analýzu, která by jednoznačně určila strukturu komplexu.

5. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla provedena literární rešerše o obecných vlastnostech zinku a jeho funkce v lidském organismu. Dále zde byla popsána funkce a metabolismus 6-merkaptopurinu a připravené Zn(II) komplexy s ligandy odvozenými od purinového skeletu vykazující biologickou aktivitu (deriváty kinetinu a olomoucínu).

Praktická část se věnovala syntéze Zn(II) komplexů s deriváty 6-MP (konkrétně bylo použito 5 různých derivátů) a jejich následné analýze pomocí dostupných analytických metod. Celkem se podařilo charakterizovat 5 připravených komplexů. Stěžejní byly výsledky NMR a IČ. Z výsledků NMR můžeme usoudit (podle vypočítaných koordinačních posunů), že použité ligandy se na Zn(II) koordinují bidentátně přes atomy N7 a S. Tato predikce byla dále potvrzena výsledky IČ. Společným znakem charakterizovaných komplexů, byl hlavně velmi intenzivní vibrační pás v oblasti kolem 461 cm^{-1} . Tato vibrace se nenacházela v samotném ligandu, ale pouze v připravených komplexech. Z toho lze usoudit, že se jedná o v literatuře málo popsanou vibraci vazby $\nu(\text{Zn-S})$. Lig 1 (6-benzylmerkaptopurin) a Lig 4 {6-(p-fluorobenzylmerkapt)purin} se na Zn(II) nekoordinují tedy jen přes atom N7, ale i přes atom S. Zn(II) měl v připravených komplexech koordinační číslo 4 a 6. V případě komplexu 4, kde byl jako výchozí látka použit $\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, není struktura komplexu zcela jasná, protože SO_4^{2-} má více možností jak se na Zn(II) koordinovat. Další společnou charakteristikou připravených komplexů bylo, že se ani opakovanou rekrystalizací nepodařilo získat monokrystaly, které by pomocí rentgenové strukturní analýzy potvrdily navrhované struktury. Komplexy měly žluté zbarvení, neměly žádné ionty mimo koordinační sféru centrálního atomu (jednalo se tedy o neelektrolyty) a byly dobře rozpustné v DMF a DMSO. Nicméně jejich špatná rozpustnost v klasických rozpouštědlech snižuje jejich potenciální biologickou dostupnost.

Nakonec bych rád poděkoval především mé školitelce Mgr. Radce Křikavové, Ph.D. za odborné rady a konzultace během řešení bakalářské práce.

-
- [1] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, 1993, nakl.Praha, str. 1490-1496
- [2] Zinc biochemistry, *Chem Biol*, 1998, str. 125-127
- [3] I. Lukeš, Z. Mička, *Anorganická chemie II systematická část*, 1998, nakl.Praha, str. 196-199
- [4] H. Tapiero, K.D. Tew, Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins, *Biomed Pharmacother*, 2003, review
- [5] M. Bastow, C.L. Kriedt, S.J. Baldassare, M. Shah, C. Klein, *J. Exp. Therapeut. Oncol*, 2011, 9, str. 175-181
- [6] S. Frassinetti, G. Bronzetti, L. Caltavuturo, M. Cini, C.D. Croce, The role of Zinc in Life, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2006, 25, str. 597-610
- [7] Cu/Zn Superoxide Dismutase: A Key Player in the Antioxidant Defense System, University of Maryland, Spring, 2003
- [8] Cu/Zn Superoxide Dismutase <<http://www.riverbendds.org/index.htm?page=sod.html>>
- [9] E.K. Duncan, Sutherland, M.J. Stillman, *Brain Diseases and Metalloproteins*, 2012, Pan Stanford Publishing, str. 81-135,
- [10] J.H. Laity, B. M. Lee, P.E. Wright, Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, 2001, review
- [11] E. Mocchegiani, C.B. Freddari, F. Marcellini, M. Malavolta, Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability, *Progr. Neurobiol.*, 2005, 75, str. 367-390
- [12] M.P. Cuajungco, G.J. Lees, Zinc Metabolism in the Brain: Relevance to Human Neurodegenerative Disorders, *Neurobiol. Dis.*, 1997, 4, str. 137-168
- [13] M.P. Cuajungco, G. J. Lees, Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link?, *Brain Res. Rev.*, 1997, 23, str. 219-236
- [14] Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, internetové skriptum, <<http://psych.lf1.cuni.cz/bp/8.2.htm>>
- [15] J. Gumulec, M. Masařík, S. Křížková, P. Babula, R. Hrabec, A. Rovný, M. Masaříková, R. Kizek, Klinická onkologie, *The Journal of the czech and slovak oncological societies*, 2011, 24 (4), str. 251
- [16] L.C. Costello, P. Feng, B. Milon, M. Tan, R.B. Franklin, Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer- critical issues to resolve, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 7, str. 111-117
- [17] R.B. Franklin, L.C. Costello, Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 463, str. 211-217
- [18] M. Legraverend, D.S. Grierson, The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, str. 3987-4006
- [19] P. Karran, N. Attard, Thiopurines in current medical practice: Molecular mechanisms and contribution to therapy-related cancer, 2008, review
- [20] O. H. Nielsen, B. Vainer, J. Rask-madsen, Review: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine, *Aliment. Pharmacol. Therapeut.*, 2001, 15, str. 1699-1708
- [21] T.A. De Beaumais, E. Jacqz-Aigrain, Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2012, vol. 68, str. 1233-1242
- [22] M. Krahulová, J. Vorlíček, Akutní leukemie, 1998, Brno
- [23] V. Zelenák, K. Gyoryová, D. Mlynářčík, *Metal-Based Drugs*, 2002, 8
- [24] T. Varadinova, N. Vilhelmova, F. Badenas, A. Terrón, J. Fiol, A. Garcia-Raso, P. Genova, *Acta Virologica*, 2005, 49

-
- [25] R. Novotná, Disertační práce, Syntéza a studium komplexů vybraných přechodných kovů s heterocyklickými deriváty odvozenými od purinového skeletu, 2012
- [26] S. Procházka, I. Macháčková, J. Krekule, J. Šebánek, *Fyziologie rostlin*, 1998, Academia, Praha
- [27] R. Novotná, I. Popa, Z. Trávníček, Zinc(II) chlorido complexes of protonated kinetin and its derivatives: Synthesis, properties and X-ray structure of $[Zn(Hkinetin)Cl_3] \cdot \text{kinetin}$, *Inorg. Chim. Acta.*, 2011, 365, str. 113-118
- [28] <<http://rustreg.upol.cz/olomoucine/>>
- [29] T. Bárta, Biologické a molekulární efekty inhibice aktivity cyklin-dependetních kináz u lidských embryonálních kmenových buněk, *Bakalářská písemná práce*, Masarykova univerzita, Brno, 2006
- [30] Z. Trávníček, V. Kryštof, M. Šipl, Zinc (II) complexes with potent cyclin-dependent kinase inhibitors derived from 6-benzylaminopurine: Synthesis, characterization, X-ray structures and biological activity, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100, str. 214-225
- [31] W. J. Kirsten, Organic Elemental Analysis: Ultramicro, Micro and Trace Methods, 1982, New York
- [32] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, 2003, nakl. Pavel Klouda
- [33] R. Novotná, T. Štarha, Z. Trávníček, Spektrální metody studia chemických látek, Univerzita Palackého v Olomouci, 2011
- [34] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Application in Inorganic Chemistry*, 2009, John Wiley and Sons
- [35] P. Štarha, Z. Trávníček, Internetová skripta, Termická analýza, Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, < http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka_analyza.pdf>
- [36] G. B. Elion, G. H. Hichings, L. E. Mackay, patent US3019224A
- [37] L.R. Lewis, C.W. Noell, A.G. Beaman, R.K. Robins, The preparation and antitumor activity of certain derivatives of 6-Mercaptopurine, *J. Med. Chem.*, 1962, 5, str. 607-617
- [38] M. W. Bullock, J. J. Hand, E. L. R. Stokstad, Syntheses of 6-substituted purines, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, str. 3693-3696
- [39] R. Novotná, Z. Trávníček, I. Popa, Synthesis and characterization of the first zinc(II) complexes involving kinetin and its derivatives: X ray structure of 2-chloro-N6-furfuryl-9-isopropyladenine and $[Zn(kinetin)_2Cl_2] \cdot CH_3OH$, *Inorg. Chim. Acta.*, 2010, 363, str. 2071-2079
- [40] B. Narayana, M. R. Gajendragad, Complexes of Zn(II), Pd(II), Hg(II), Pb(II), Cu(I), Ag(I) and Tl(I) with 4-Amino-5-Mercapto-3-(o-Tolyloxymethyl)-1,2,4-Triazole, *Tr. J. of Chemistry*, 1997, 21, str. 71-76
- [41] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Application in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic chemistry*, 2009, John Wiley and Sons
- [42] E. Szunyogova, D. Mudronova, K. Gyoeryova, R. Nemcova, J. Kovarova, L. Piknova-Findorakova, The physicochemical and biological properties of Zn(II) complexes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2007, 88, str. 355-361
- [43] Larsen, Sine, Nielsen, S. Finn, The crystal and molecular structure of sulfatobis(thiosemicarbazide)zinc(II), *Acta. Chem. Scand. Phys. Inorg. Chem.*, 1958, str. 441
- [44] P. Kamalakannan, D. Venkappayya, Spectral, Thermal, and Antimicrobial Studies on the Copper(II), Zinc(II), Cadmium(II) and Mercury(II) Chelates of a New Antimetabolite-5-Dimethylaminomethyl-2-Thiouracil, *Russ. J. Coord. Chem.*, 2002, 26, str. 423-433
- [45] Ma Zhen Cao, Yiqun Li, Qingshan, Guedes da Silva, M. Fatima, Frausto da Silva, J. R. Joao, Pombeiro, J.L. Armando, Synthesis, characterization, solid-state, photoluminescence

and antitumor activity of Zn(II) 4'-phenylterpyridine compounds, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 104, str. 704-711