



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Deriváty purinu modifikované thiofenem a jejich
biologické vlastnosti**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Ryšavá
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	10. května 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Ryšavá
Název práce	Deriváty purinu modifikované thiofenem a jejich biologické vlastnosti
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů / Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH, PřF UPOL
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývá studiem aromatických cytokininů, především jejich anti-senescenčními a případnými toxickými vlastnostmi. Teoretická část práce shrnuje dosud zjištěné poznatky o cytokininech, zejména kinetinu, a o známých derivátech purinu, nesoucích v poloze C6 molekulu thiofenu. V experimentální části je popsána příprava osmi takovýchto látek, substituovaných jak v poloze C6, tak v poloze N9. U těchto derivátů byla provedena charakterizace pomocí fyzikálně-chemických metod. Následně byla testována jejich anti-senescenční aktivita a toxicita na lidských fibroblastech.</p>
Klíčová slova	cytokininy, kinetin, thiofen, biologická aktivita
Počet stran	59
Počet příloh	3
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Ryřavá
Title of thesis	Derivatives of thiophene-modified purine and their biological activities
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators / Department of Chemical Biology and Genetics, CRH, PrF UPOL
Supervisor	Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	The bachelor thesis deals with the study of aromatic cytokinins, especially their anti-senescence and potential toxic properties. Theoretical part summarizes the findings of cytokinins, especially kinetin, and known purine derivatives bearing the thiophene molecule at the C6 position. The preparation of eight such substances, substituted in both the C6 and the N9 positions, has been described in the experimental part. Characterization of these derivatives was performed by using physicochemical methods. Subsequently, their antisenescence activity and human fibroblast toxicity were tested.
Keywords	cytokinins, kinetin, thiophene, biological activities
Number of pages	59
Number of appendices	3
Language	Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 9. 5. 2019

Kateřina Ryšavá

Poděkování

V této části bych chtěla obzvlášť poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D. za odborné vedení, podporu a vstřícnost při sepisování bakalářské práce a Mgr. Martinovi Hönigovi za cenné rady a připomínky, zejména při plnění praktické části v laboratoři.

Mé poděkování patří také Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D. a paní Kateřině Fakové za pomoc s testováním cytotoxicity látek a za následné vyhodnocení testu, Mgr. Haně Omámikové za měření a zpracování dat a paní Jarmile Balonové za pomoc a vyhotovení senescenčního biotestu.

Tato bakalářská práce byla vypracována za finanční podpory z grantového projektu IGA PrF 2019 018.

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 CYTOKININY.....	11
2.1.1 Významné cytokininy.....	11
2.1.2 Kinetin.....	13
2.1.3 N9-substituované cytokininy.....	14
2.2 THIOFEN.....	16
2.2.1 Deriváty thiofenu a jejich biologické vlastnosti.....	16
2.2.2 Deriváty purinu modifikované thiofenem	17
2.3 SENESCENČNÍ BIOTEST NA USTRŽIŽENÝCH LISTECH PŠENICE	18
2.4 TESTOVÁNÍ TOXICITY NA LIDSKÝCH BUŇKÁCH.....	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1 MATERIÁL A METODY	20
3.1.1 Použité chemikálie.....	20
3.1.2 Metody a přístrojové vybavení	20
3.2. SYNTÉZA LÁTEK	22
3.2.1. Syntéza 6-[(5-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (1).....	22
2.2.2. Syntéza 6-[(3-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (2).....	23
2.2.3. Syntéza 6-(2-thiofenmethyl)aminopurinu (3).....	24
2.2.4. Syntéza 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (4).....	25
2.2.5. Syntéza 6-(2-thiofenethyl)aminopurinu (5).....	26
2.2.6. Syntéza 6-(2-thiofenethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (6)	27

2.2.7. Syntéza 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (7).....	28
2.2.8. Syntéza 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (8)	29
3.3 SENESCENČNÍ BIOTEST NA USTRŽENÝCH LISTECH PŠENICE	30
3.4 TESTOVÁNÍ TOTOXICITY – RESAZURINOVÝ TEST	30
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1 PŘIPRAVENÉ LÁTKY.....	32
4.2 VÝSLEDKY SENESCENČNÍHO BIOTESTU	33
4.3 VÝSLEDKY RESAZURINOVÉHO TESTU	35
5 ZÁVĚR	37
POUŽITÁ LITERATURA.....	38
PŘÍLOHY.....	43
PŘÍLOHA A: HMOTNOSTNÍ SPEKTRA LÁTEK	43
PŘÍLOHA B: ¹ H NMR SPEKTRA.....	47
PŘÍLOHA C: VÝSLEDNÉ GRAFY RESAZURINOVÉHO TESTU	55

CÍLE PRÁCE

1. Rešerše dosud zjištěných poznatků o derivátech purinu, zejména o purinových derivátech modifikovaných thiofenem.
2. Syntéza derivátů 6-(2-thiofen-2-ylmethyl)aminopurinu (thiokinetinu) a následná analýza připravených látek.
3. Senescenční biotest na ustřižených listech pšenice pro připravené látky a interpretace výsledků.
4. Stanovení toxicity nově připravených sloučenin na lidských buňkách.

SEZNAM ZKRATEK

6CIP	6-chlorpurin
6CIP9THP	6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin
ArCK	aromatické cytokininy
BAP	6-benzylaminopurin
CDK	cyklin-dependentní kinasa
DIPEA	diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOAc	ethylacetát
Et ₃ N	triethylamin
EtOH	ethanol
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IsCK	isoprenoidní cytokininy
Kin	kinetin (N6-furfurylamin)
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NMR	nukleární magnetická resonance
PBA	6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-ylpurin
ROS	reactive oxygen species (volné kyslíkové radikály)
THF	tetrahydrofuran-2-yl
THP	tetrahydropyran-2-yl
thio-Kin	thiokinetin (6-(2-thiofen-2-ylmethyl)aminopurin)
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstvá kapalinová chromatografie)

1 ÚVOD

Rostlinné hormony jsou přirozeně se vyskytující organické látky, které již při nízkých koncentracích ovlivňují fyziologické procesy v rostlinách (Davies, 2010). Od živočišných hormonů se ty rostlinné liší svou nízkou specifitou a komplexností působení. Fytohormony se navzájem ovlivňují, a v závislosti na vnějších a vnitřních podmínkách může být docíleno rozdílného výsledného efektu jejich účinku (Procházka et al., 1998). Jelikož jsou fytohormony v rostlinách obsaženy jen v nepatrném množství, při jakékoliv odchylce jejich rovnovážného stavu dochází v rostlině k citlivé reakci (Harrison, 2012). Dle své struktury a funkce se fytohormony dělí do několika skupin. Mezi tyto skupiny patří například auxiny, gibbereliny, ethylen, kyselina abscisová, brasinosteroidy a hlavně cytokininy, kterými se zabývá tato bakalářská práce.

V roce 1955 byl objeven první aromatický cytokinin, který byl pojmenován kinetin. Byl to N6-substituovaný derivát adeninu s navázaným furfurylem (Miller et al., 1955). Díky svým anti-senescenčním a antioxidačním vlastnostem (Barciszewski et al., 1999) se stal předmětem zkoumání použití ve tkáňových kulturách a byl zjištěn jeho pozitivní vliv na živočišné buňky včetně lidských (Rattan et Clark, 1994). Kinetin má vliv na růst keratinocytů a zabraňuje celé řadě projevů stárnutí lidské pokožky (Othman et al., 2016). Jak samotný kinetin, tak jeho N9-substituovaný derivát Pyratine, jsou v současnosti používány jako účinné látky kosmetických výrobků, jenž mají zmírňující vliv na projevy stárnutí pleti a její hydrataci (Szüčová et al., 2008).

Vzhledem k výše uvedeným účinkům byl kinetin dále strukturně modifikován za účelem výzkumu nových derivátů s podobnými či lepšími vlastnostmi. Díky terapeutickému vlivu thiofenu na živočišné buňky (Mishra et al., 2011) byly vytvořeny také látky, ve kterých byl kyslíkový atom furanového kruhu nahrazen sírou (Hönig et al., 2018).

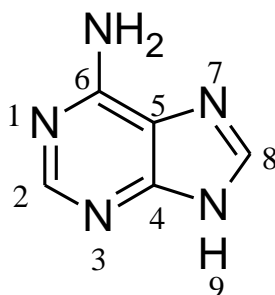
Má bakalářská práce se zabývá syntézou zcela nových, nebo optimalizací syntézy již připravených thiofenových derivátů purinu. Látky byly modifikovány zejména v poloze C6, přičemž purinová molekula zůstala bez strukturní změny. Charakterizace daných derivátů byla prováděna pomocí HPLC/MS, NMR spektrometrie a měření bodu tání, což je důležitá identifikační vlastnost chemických individuů organických pevných látek. Následně byla testována cytokininová aktivita a toxicita nových látek vůči lidským buňkám. Předmětem diskuze bylo zejména porovnávání biologické aktivity derivátů nesoucích v poloze N9 tetrahydropyran-2-yl a derivátů bez této strukturní modifikace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CYTOKININY

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které mají vliv na dělení buněk a jejich diferenciaci, ovlivňují apikální dominanci, oddalují senescenci, působí při reakci rostlin na stresové faktory a mnoho dalších. Cytokininy působí přímo nebo za účasti jiných rostlinných hormonů (Davies, 2004). Například při vyšším poměru auxinů a ethylenu v rostlině dochází ke stimulaci růstu kořenů, zatímco při změně poměru auxinů k nižším hodnotám vůči cytokininům dochází ke stimulaci růstu nadzemní části rostliny (Davies, 2010). S kyselinou abscisovou zase cytokininy interagují při odpovědi rostliny na environmentální stres (Tran et al., 2010).

Základem molekuly přirozeně se vyskytujících cytokininů je purin, heterocyklická sloučenina skládající se ze dvou kondenzovaných heterocyklů, pyrimidinu a imidazolu. Pokud je na purinu v poloze C6 navázána aminoskupina, pak této látce říkáme adenin (Obr. 1). Na aminoskupině v poloze N6 lze adenin substituovat, což má za následek dělení cytokininů na dvě hlavní skupiny: isoprenoidní cytokininy (IsCK) s navázaným isoprenoidním řetězcem, jako je například *trans*-zeatin, a aromatické cytokininy (ArCK), nesoucí v poloze N6 aromatický kruh. ArCKs se od IsCK liší jak chemicky, tak svou biologickou aktivitou (Strnad, 1997).



Obr. 1: Strukturální vzorec adeninu s očíslovanými atomy

2.1.1 Významné cytokininy

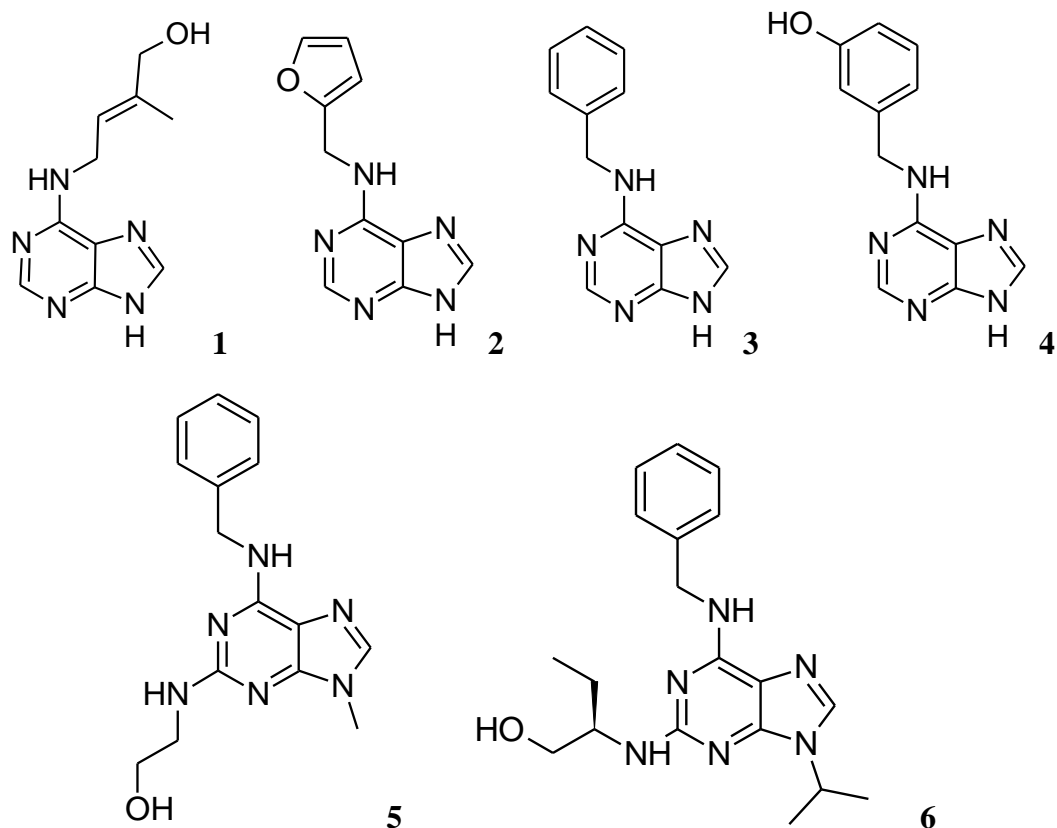
Prvním objeveným, přirozeně se vyskytujícím, cytokininem v rostlinném materiálu byl isoprenoidní derivát 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin (Obr. 2) izolovaný z kukuřice seté (*Zea mays*), díky čemuž dostal svůj triviální název *trans*-zeatin (Letham, 1963). Nicméně první cytokinin, ačkoliv s aromatickým substituentem v N6, byl izolován a testován mnohem dříve. V roce 1955 Miller a spolupracovníci experimentovali

s kokosovým mlékem a za pomoci UV spektrální analýzy v něm prokázali obsah adeninových sloučenin (Miller et al., 1955). Po několika následujících pokusech izolovali z DNA autoklávovaného sledího spermatu bílou krystalickou látku. Pomocí chromatografické analýzy určili, že se jedná o aromatický N6-furfuryladenin (*Obr. 2*) a díky jeho schopnosti dělit buňky (cytokinezi) v pletivu tabáku (*Nicotiana tabacum*) odvodili pro látku triviální název kinetin (Miller et al., 1955).

Dalším významným cytokininem s aromatickým postranním řetězcem je 6-benzylaminopurin (BAP; *Obr. 2*). Tato látka byla syntetizovaná ve stejné laboratoři jako kinetin a byly u ní také prokázány účinky, jako je stimulace buněčného dělení (Miller et al., 1956). Dnes jde o poměrně snadno dostupný, jednoduše připravitelný aromatický cytokinin, který se používá ve tkáňových kulturách rostlin. Používáním se zjistilo, že má bohužel i negativní vedlejší efekty na pěstované explantáty. Jde především o nekrózu růstového vrcholu (Li et al., 2016) nebo o inhibici zakořeňování (Othman et al., 2016), což bylo také jedním z důvodů rozvoje syntézy nových cytokininových derivátů, které by mohly být bez těchto vlastností.

Mezi významné ArCK patří také celá řada látek izolovaná z rostlin týmem profesora Strnada. Tito vědci vyvinuli analytickou screeningovou metodu HPLC-ELISA, díky které objevili sloučeninu 6-(3-hydroxybenzylamino)purin (*meta-topolin*; *Obr. 2*) a další aktivní aromatické cytokininy, zejména deriváty hydroxybenzyladeninu v topolových listech (Strnad et al., 1997).

Některé připravené trisubstituované cytokininové deriváty, fungují jako nespecifické inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK), které ovlivňují buněčný cyklus živočišných buněk (Veselý et al., 1994; Edamatsu et al., 2000). Dále byly stejným týmem objeveny sloučeniny 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin (*Obr. 2*), triviálně nazvaný olomoucín, a 6-(benzylamino)-2(*R*)-[1-(hydroxymethyl)propylamino]-9-isopropylpurin (*Obr. 2*) neboli roscovitin (Veselý et al., 1994). Tyto trisubstituované aromatické cytokininové deriváty již v mikromolárních koncentracích inhibují cyklin-dependentní kinasy 2 (CDK2) a tím zastavují buněčný cyklus (Veselý et al., 1994). Díky této skutečnosti jsou v současnosti dané látky testovány v klinických testech jako možná protinádorová léčiva (De Azevedo et al., 1997).



Obr. 2: 1 – *trans*-zeatin, 2 – kinetin, 3 – BAP, 4 – *meta*-topolin, 5 – olomoucín, 6 – roscovitín

2.1.2 Kinetin

N6-furfuryladenin, neboli kinetin (Kin), je biologicky aktivní sloučenina, která již v nepatrných koncentracích ovlivňuje rostlinné i živočišné buňky (Barciszewski et al., 2007). V případě rostlinných buněk například podporuje buněčné dělení a diferenciaci, patří mezi iniciátory transkripce a do jisté míry ovlivňuje buněčný cyklus. Důležitou roli však hraje v procesu senescence, kdy s postupným stárnutím rostliny dochází k přirozenému úbytku cytokininů. Dodáním těchto fytohormonů dochází k inhibici degradace chlorofylu a podpoře diferenciaci chloroplastů, což senescenci rostliny značně zpomalí (Gan et Amasino, 1997).

Kin má ale kromě rostlinných buněk také účinky na buňky živočišné. Mimo to, že Kin prodlužuje délku života octomilek (*Zaprionus paravittiger*, Sharma 1995), účinkuje jako antioxidant lidských fibroblastů *in vitro*, při koncentracích od 40 μ M (Rattan et Clark, 1994). Reaktivní kyslíkové radikály (ROS), které za normálních okolností vznikají v buňkách při buněčném dýchání, jsou jednou z příčin poškození DNA. Při vystavení buněk stresu např. poškozením či vytvořením extrémních životních podmínek, dochází ke vzniku ROS ve větší míře a pravděpodobnost poškození DNA je vyšší. Kin stimuluje antioxidantní enzymy jako

jsou například katalasa a glutathionperoxidasa. Tyto enzymy snižují stupeň peroxidace membrán fibroblastů vyvolanou v důsledku působení oxidativního stresu (Jabłońska-Trypuć et al., 2016). Již velmi nízké koncentrace Kin od 100 nmol/l chrání lidské keratinocyty buněčné linie HaCat před smrtí způsobenou kyslíkovými radikály (Othman et al., 2016). Antioxidační účinky se projevují také snížením autofluorescence, jenž je dalším důkazem stárnutí buněk. Jde o druh oxidativního poškození buněk, neboť nastává díky hromadění lipofuscinu, žlutohnědého pigmentu, který je produktem oxidace nenasycených mastných kyselin (Rattan et Clark, 1994).

Syntéza kinetinu v laboratoři byla zveřejněna rok po objevení v roce 1956 (Miller et al., 1956). Autor popisuje syntézu jako kondenzaci furfurylchloridu s adeninem v alkalickém prostředí, za přítomnosti hydrogenuhličitanu sodného, kdy reakční čas dosahuje až 9 hodin (Miller et al., 1956). Inovovaná metoda syntézy dle Whiteheada, která spočívá v reakci 6-methylmercaptapurinu s furfurylaminem (Whithead et Traverso, 1960) se s několika modifikacemi používá dodnes. V současnosti se kinetin a jeho deriváty nejčastěji připravují nukleofilní substitucí 6-chlorpurinu furfurylaminem (*Schéma 1*) nebo jiným příslušným aminem v alkalickém prostředí (Mik et al., 2011), a reakční čas byl zkrácen zhruba na 3 hodiny.

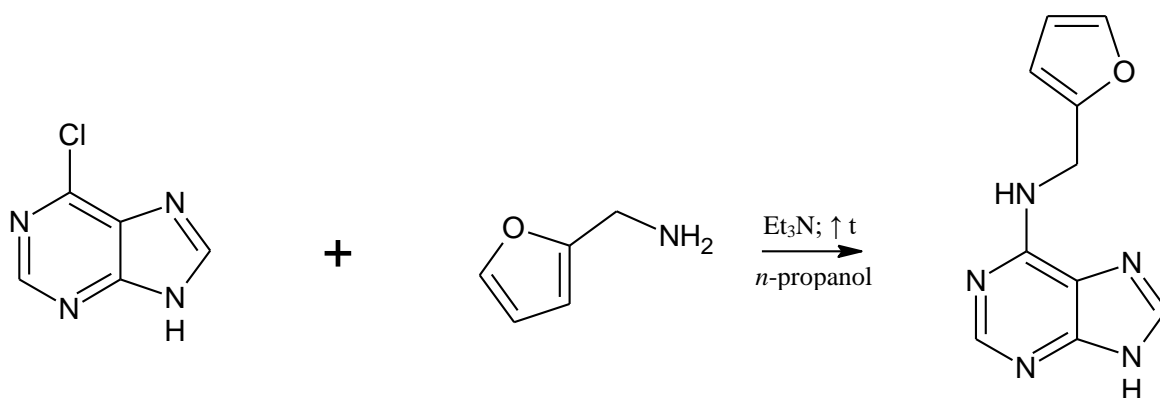


Schéma 1: Reakce 6-chlorpurinu s furfurylaminem za vzniku kinetinu

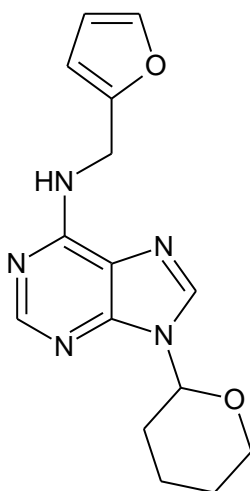
2.1.3 N9-substituované cytokininy

V minulosti byly připraveny N9-substituované cytokininové deriváty např. 6-benzylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (PBA) a bylo zjištěno, že mohou mít vyšší anti-senescenční aktivitu než originální báze, jak bylo otestováno na sójových discích (Zhang et al., 1987). U látky PBA se také projevily její pozitivní účinky na diploidní lidské fibroblasty (Zhang et al., 1987; Szüčová et al., 2008). Jako spojitost lepších účinku

s N9-modifikací byla navržena schopnost těchto sloučenin uvolňovat volné báze, díky čemuž jsou udržovány potřebné koncentrace látek po delší dobu (Zhang et Letham, 1989). V roce 2009 připravila a popsala Szüčová a spolupracovníci sérii různých cytokininů substituovaných tetrahydropyran-2-ylem (THP) a tetrahydrofuran-2-ylem (THF) v poloze N9. Výsledky experimentu ukazují na vyšší anti-senescenční aktivitu cytokininů nesoucích THP oproti těm s THF (Szüčová et al., 2009).

Ačkoliv substituce N9 atomu cytokininu ribosou zřetelně zvyšuje cytotoxicitu proti lidským buňkám, také v mnoha případech velice zvyšuje anti-senescenční aktivitu volných cytokininových bází (Holub et al., 1998; Doležal et al., 2007), při substituci skupinami THP či THF není takto cytotoxicita pozorována (Szüčová et al., 2009). V MTT testu na lidských diploidních fibroblastech buněčné linie BJ, se projeví THP a THF-purinové deriváty netoxické nebo jen okrajově toxické ve vysokých koncentracích (Szüčová et al., 2009).

V roce 2008 byla látka 6-furfurylamino-N9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (*Obr. 3*) patentována pro ošetření lidských kožních buněk, licencována a zaregistrována firmou Senetek PLC pod názvem Pyratine-6® (Szüčová et al., 2008). V klinické studii ženy ve věku 30 až 65 let testovaly přípravek s účinnou látkou 6-furfurylamino-N9-(tetrahydropyran-2-yl)purinem o koncentraci 0,1 % po dobu 12 týdnů. Bylo prokázáno, že Pyratine zpomaluje stárnutí lidské pokožky (McCullough et al., 2008), neboť u žen došlo k viditelné redukci jemných vrásek. Po ukončení studie bylo pozorováno zlepšení celkového stavu pokožky. Pozitivními výsledky bylo také zmírnění zarudnutí a mimo jiné redukce hyperpigmentových skvrn. Ošetřená pokožka byla méně vysušována, jelikož docházelo k menším transepidermálním ztrátám vody (Szüčová et al., 2008).



Obr. 3: *Strukturní vzorec 6-furfurylamino-N9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu, neboli Pyratinu*

2.2 THIOFEN

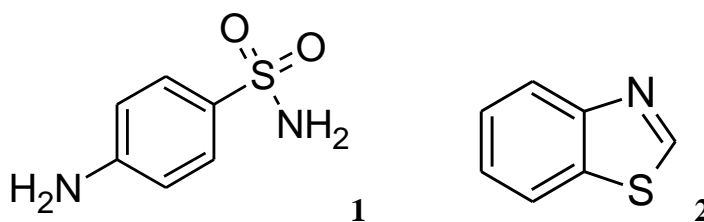
Mezi pětičlenné heterocykly s jedním heteroatomem (sírou) v pozici 1 patří thiofen. V roce 1883 byl objeven jako látka kontaminující benzen (Meyer, 1883). Thiofen je toxická a hořlavá aromatická látka, za pokojové teploty bezbarvá a kapalná. Díky své struktuře aromatického jádra je thiofen podobný svými chemickými vlastnostmi benzenovým sloučeninám. Je nerozpustný ve vodě, ale lze jej rozpouštět v organických rozpouštědlech včetně alkoholu. Jeho bod tání je $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota varu je $84\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Thiofen je často využíván ve farmaceutickém průmyslu. Při slučování thiofenu s dalšími heterocyklickými sloučeninami za vhodných podmínek vznikají nové, biologicky aktivní deriváty. Tyto látky hrají významnou roli v medicíně, jelikož mohou mít antimikrobiální (Tehranchian et al., 2005), protizánětlivé (Pillai et al., 2005) či protinádorové účinky (Chen et al., 2015).

2.2.1 Deriváty thiofenu a jejich biologické vlastnosti

Hlavní vlastnosti některých thiofenových derivátů je antimikrobiální účinek. Tato aktivita je zaměřena hlavně proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa*, ale většina derivátů má také fungicidní účinky například proti *Candida Albicans* (Shah et Verma, 2018).

V posledních několika letech bylo mnoho sloučenin testováno na protinádorovou aktivitu. Vědci syntetizovali nové thiofenové deriváty, jako je sulfonamid nebo benzothiazol (Obr. 4; Shah et Verma, 2018).



Obr. 4: 1 – sulfonamid, 2 – benzothiazol

Novou sérii těchto látek vyvinul Ghorab a jeho tým. Látky se *in vitro* projevily cytotoxicky proti lidské buněčné linii MCF7 nádoru prsu (Ghorab et al., 2014). Proti této buněčné linii a mimo jiné proti liniím NCI-H460 (karcinom plic) a SF-268 (karcinom CNS) byly vyvinuty účinné látky ethyl-5-amino-3-(4-chlorostyryl)-4-kyanothiofen-2-karboxylát, ethyl-5-amino-4-[(4-methoxyfenyl)karbamoyl]-3-methylthiofen-2-karboxylát a ethyl-5-(3-

ethoxy-3-oxopropanamid)-3-methyl-4(fenylkarbamoyl)thiofene-2-karboxylát, jenž se z dané série látek projevily nejúčinněji. Vysoký účinek u těchto látek byl zapříčiněn díky elektronegativních chloro, OCH₃ a ethoxy skupin, u níž se následně prokázal zesilující účinek cytotoxického efektu (Mohareb et al., 2016).

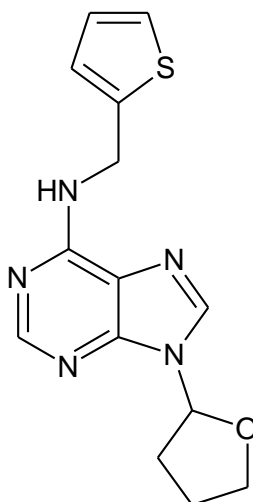
Thiopyrimidiny jsou další deriváty thiofenu výjimečné svou protizánětlivou aktivitou. Jde o sloučeniny obsahující jak pyrimidinový, tak thiofenový pětičlenný kruh. Jsou považovány za potenciální antimetabolity nukleových kyselin (Jha et al., 2012), látky strukturně podobné prekurzorům nukleových kyselin, jenž se využívají jako cytostatika. Nová skupina thiopyrimidinů vyvinuta v roce 2013 je typická vysokou protizánětlivou aktivitou z důvodu přítomnosti elektron-donorových skupin jako je hydrazin, methyl, kyanomethyl, tetrazin a amid (Flefel et al., 2013).

2.2.2 Deriváty purinu modifikované thiofenem

Vzhledem k popsaným terapeutickým účinkům thiofenových derivátů (*kapitola 2.2.1*) byl furanový kruh biologicky aktivního kinetinu nahrazen thiofenem. Přítomnost kyslíkového atomu se projevila jako strukturní motiv zpomalování degradace chlorofylu, což se prokázalo v senescenčním biotestu (Hönig et al., 2018). Náhrada kyslíkového atomu sírou či uhlíkem bylo důvodem snížení této anti-senescenční aktivity. V případě Kin versus thio-Kin bylo pozorováno snížení až o 40 %.

Oproti této skutečnosti bylo zjištěno, že substitucí N9 atomu molekuly thio-Kin (6-(2-thiofenmethyl)aminopurinu) protektivní skupinou THF se anti-senescenční aktivita zase zvýší, a to až na úroveň standardu BAP (Hönig et al., 2018). Skupiny THF a THP fungují jako ochranné skupiny v kyselém prostředí (Szüčová et al., 2008).

Látka 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)aminopurin (*Obr. 5*) prokázala nejvyšší fotoprotektivní účinky na buňkách pokožky v ochraně proti UVA a UVB záření (Hönig et al., 2019).



Obr. 5: Vzorec 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)aminopuriiu

2.3 SENESCENČNÍ BIOTEST NA USTŘIŽENÝCH LISTECH PŠENICE

Senescenční biotest na ustřižených listech pšenice patří mezi standardizované cytokininové biotesty, pomocí kterých se testují biologické vlastnosti látek (Holub et al., 1998). Principem senescenčního biotestu je měření absorbance chlorofylu po 5-7 denní kultivaci ustřižených pšeničných lístků s testovanou látkou.

Test se provádí na 7 dní starých pšeničných lístcích, u kterých po ustřižení probíhá senescence. V průběhu listové senescence dochází ke ztrátě enzymů podílejících se na fotosyntéze jako je ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa/oxygenasa neboli RUBISCO. Zároveň s tímto jevem dochází ke ztrátě integrity chloroplastů a degradaci chlorofylu. Cytokininy tyto procesy senescence inhibují a degradaci chlorofylu zpomalují. Po kultivaci se chlorofyl z lístků extrahuje do alkoholu a následně se spektrofotometricky měří absorbance tohoto zeleného barviva při 665 nm vlnové délky. Testování se opakuje pro každou látku nejméně dvakrát (Holub et al., 1998).

2.4 TESTOVÁNÍ TOXICITY NA LIDSKÝCH BUŇKÁCH

Jako standardní test při testování toxicity látek na lidských kožních buňkách se používá test resazurinové redukce. Resazurin je tmavě modré redoxní barvivo objevené Weselskym (Weselsky, 1871), které se od konce dvacátých let 20. století používá jako indikátor bakteriální kontaminace mléka. Resazurinový test je založen na intracelulární redukcí tmavě

modrého resazurinu, jenž nevykazuje téměř žádnou fluorescenci, na růžový, fluorescenční resorufin (*Schéma 2*). Redukce probíhá v životaschopných, metabolicky aktivních buňkách (O'Brien et al., 2000), tudíž mrtvé buňky žádnou fluorescenci nevykazují.

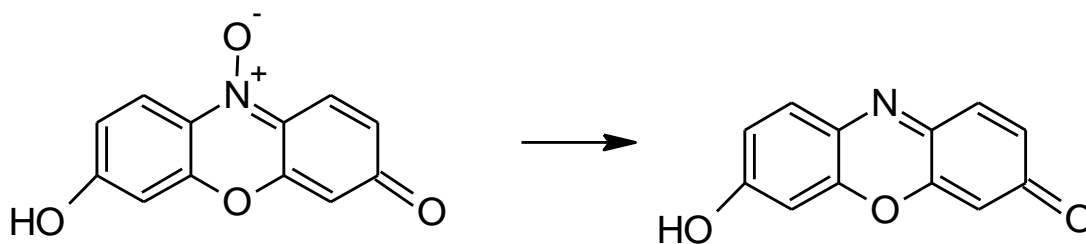


Schéma 2: Redukce resazurinu na resorufin

Aby bylo možné studovat cytotoxicitu látek, musí být buňky s resazurinem a testovanými látkami inkubovány 1 – 4 hodiny před analýzou (Hamid et al., 2004). K testování se obvykle používají fibroblasty lidské pokožky buněčné linie BJ a keratinocyty linie HaCat.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A METODY

3.1.1 Použité chemikálie

Pro přípravu látek byly použity následující chemikálie: 6-chlorpurin od firmy Honeywell Fluka, 1-(5-methylthiofen-2-yl)methylamin, 2-thiofenmethylamin, 2-thiofenethylamin, 1-(5-bromthiofen-2-yl)methylamin, 1-(3-methylthiofen-2-yl)methylamin, diisopropylethylamin a triethylamin od firmy Sigma-Aldrich, ethylacetát, ethanol, *n*-propanol a 2,5% vodný roztok amoniaku od firmy Lachner s.r.o., chloroform a diethylether od firmy VWR-chemicals, methanol od firmy Penta, 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin připraven v laboratoři Mgr. Martinem Hönigem dle dostupné literatury (Szüčová et al., 2009).

3.1.2 Metody a přístrojové vybavení

Pro organickou syntézu bylo použito běžné vybavení laboratoře pro přípravu organických sloučenin jako je digestoř, analytické váhy Radwag AS 220.R2, magnetická míchačka s ohřevem Heidolph MR Hei-Standard, sonifikační lázeň Branson 2510 a rotační vakuové odparky Buchi Rotavapor R-300 a Buchi Rotavapor R-200.

Průběh reakcí byl detekován díky tenkovrstvé kapalinové chromatografii, kdy byly použity hliníkové TLC desky Silikagel 60 W F₂₅₄ od firmy Merck. Body tání, byly měřeny na přístroji Büchi B-540 Melting Point.

Čistota a hmotnostní spektrum připravených sloučenin byly analyzovány metodou HPLC-PDA-MS. Sloučeniny byly rozpuštěny v 1% methanolu. Byla použita kolona s reverzní fází značky Symmetry C18 od firmy Waters, která měla rozměry 5 x 150 x 2,1 mm s velikostí částic 3,5 μm. Jako mobilní fáze A byl použit 15 mM mravenčan amonný s hodnotou pH upravenou na 4,0. Jako mobilní fáze B byl použit methanol (MeOH). Při průtoku 200 ml/min mravenčanu amonného byla uplatněna gradientová eluce: 0 min: 10% MeOH; 0-24 min: 90% MeOH; 25-34 min: 90% MeOH; 35-45 min: 10% MeOH za použití módu Waters Alliance 2695 Separations Module. Analyzované látky byly detekovány pomocí detektoru Waters 2996 PDA od firmy Waters se snímacím rozsahem 210-700 nm a rozlišením 1,2 nm.

Následně byly dané analyty identifikovány hmotnostním analyzátozem Q-Tof Micro Mass Spectrometer od firmy Waters. Získávání dat bylo prováděno ve full scan módu v rozsahu 50-1000 Da s časem skenování 0,5 s, kapilárním napětím 3 kV a napětím ve vstupní štěrbině fragmentátoru o velikosti 20 V. Teplota iontového zdroje byla 120 °C a teplota desolvatačního plynu 300 °C, přičemž jeho průtok činil 500 l/h a průtok zamlžovacího plynu 50 l/h. V případě desolvatačního i zamlžovacího plynu byl použit dusík. Analýzy byly prováděny v pozitivním režimu (ESI), proto byly molekulové ionty zaznamenány v jejich protonizovaných formách $[M+H]^+$.

^1H NMR spektra byla měřena na spektrometru Jeol 500 SS pracujícím při teplotě 300 K a frekvenci 500,13 MHz. Vzorky byly připraveny rozpuštěním sloučenin v deuterovaném MeOH (látky **1**, **3**, **4**, **6**, **7**) nebo v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO; látky **2**, **5**, **8**). Jako interní standard byl použit tetramethylsilan (TMS).

Látka **2** byla přečištěna na semipreparativní stanici 1290 Infinity II od firmy Agilent Technologies. 40 mg látky bylo rozpuštěno v 8 ml 25% methanolu. 1 ml vzorku byl nastříknut do proudu mobilní fáze na kolonu Agilent 5 prep-C18 (50 x 21.2 mm; velikost částic 5 μm). Mobilní fáze byla složena z vody (A) a MeOH (B). Vzorek byl eluován za průtoku 20 ml/min v gradientu mobilní fáze: 0 min: 10% MeOH; 10-12 min: 60% MeOH; 12,5-13 min: 10% MeOH. Analyty byly detekovány pomocí VWD detektoru (250 nm). Frakce obsahující danou látku byla sbírána pomocí automatického sběrače frakcí na základě retenčního času (9,2-10,2 min).

3.2. SYNTÉZA LÁTEK

3.2.1. Syntéza 6-[(5-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (**1**)

Výchozí látka 6-chlorpurin (6CIP; 80 mg; 0,66 mmol) byl spolu s (5-methylthiofen-2-yl)methylaminem (100 mg; 0,85 mmol) a diisopropylethylaminem (DIPEA; 342 μ l; 1,97 mmol) přidán do *n*-propanolu (10 ml). Vzniklá směs byla v tlakové ampuli za stálého míchání zahřívána v olejové lázni na 120 °C po dobu 6 hodin. Průběh reakce byl kontrolován dle TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 9:1). Reakční směs byla ponechána při RT na míchačce do následujícího dne, kdy z ní vykrytalizoval pevný produkt (*Schéma 3*). Reakční směs byla přes fritu zfiltrována za sníženého tlaku a promyta vychlazeným *n*-propanolem (5 ml) a vychlazenou destilovanou vodou (3 ml). Zbylý produkt po vysušení vážil 54,3 mg (výtěžek: 33,5 %) a čistota byla stanovena pomocí HPLC/MS na 99,5 %. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOH) δ 8.26 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.82 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H).

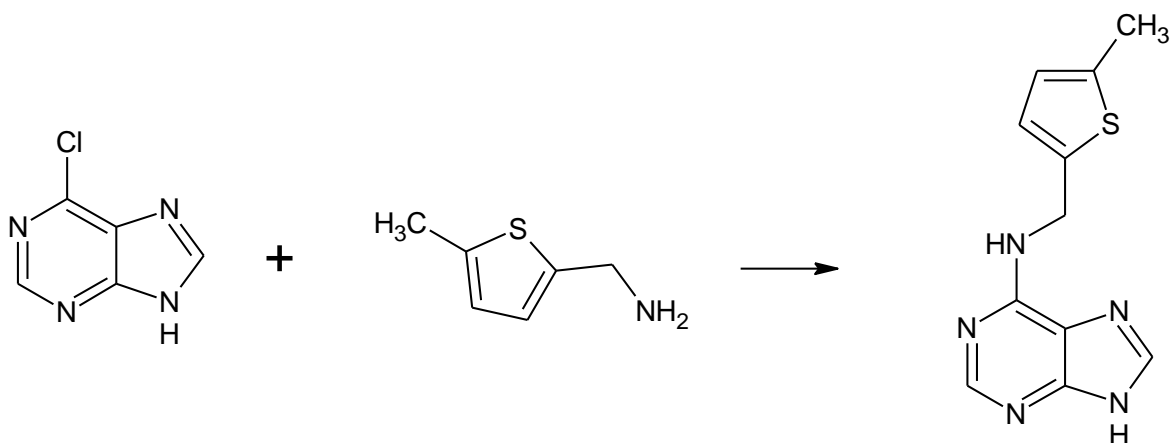


Schéma 3: Reakce 6-chlorpurinu s (5-methylthiofen-2-yl)methylaminem za vzniku 6-[(5-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu

2.2.2. Syntéza 6-[(3-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (2)

Sloučeniny 6ClP (51 mg; 0,33 mmol), (3-methylthiofen-2-yl)methylamin (50 mg; 0,39 mmol) a triethylamin (Et_3N ; 137 μl ; 0,98 mmol) byly suspendovány v *n*-propanolu (4,5 ml). Suspenze byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 5,5 h. Průběh reakce (Schéma 4) byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 9:1). Reakční směs byla při RT ponechána na míchače do následujícího dne, kdy bylo rozpouštědlo odpařeno a zbylý odparek extrahován extrakcí kapalina-kapalina (EtOAc : H_2O). Ethylacetátová fáze byla zahuštěna na vakuové rotační odparce a k odparku bylo přidáno malé množství diethyletheru, díky kterému vykristalovala pevná látka. Hmotnost produktu činila 40 mg při čistotě 92 %, což byl důvod následného čištění látky pomocí semipreparativní stanice 1290 Infinity II od firmy Agilent Technologies (kapitola 3.1.2), díky které byl po následném odpaření na odparce a vysušení získán produkt o 100 % čistotě a hmotnosti 19 mg (výtěžek: 23,5 %). ^1H NMR (500 MHz, MeOH) δ 8.27 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 2.27 (s, 1H).

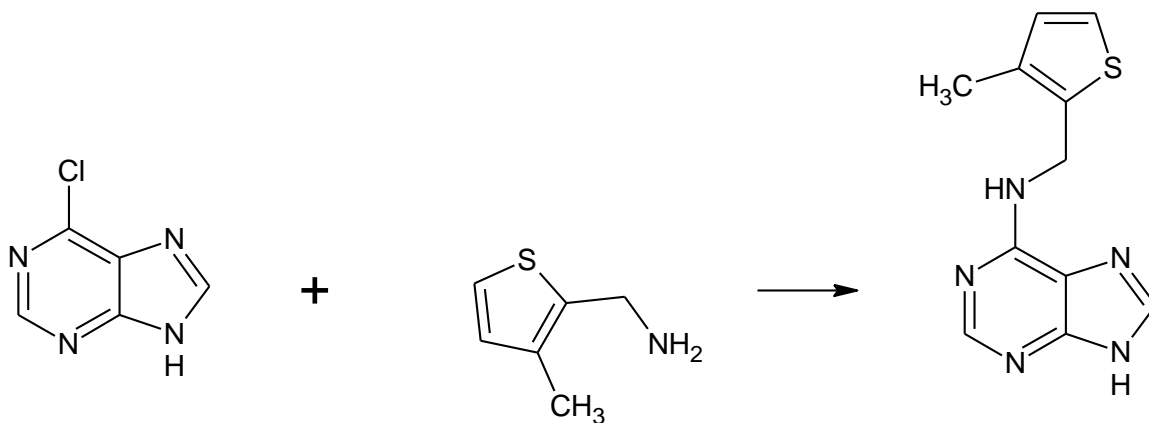


Schéma 4: Reakce 6-chlorpurinu s (3-methylthiofen-2-yl)methylaminem za vzniku 6-[(3-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu

2.2.3. Syntéza 6-(2-thiofenmethyl)aminopurinu (**3**)

Syntéza látky byla provedena dle publikované literatury (Hönig et al., 20018). Sloučeniny 6CIP (250 mg; 1,62 mmol), 2-thiofenmethylamin (199 μ l; 1,94 mmol) a Et₃N (676 μ l; 4,85 mmol) byly přeneseny do *n*-propanolu (16 ml). Vzniklá směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform: MeOH 9:1). Po 4 hodinách bylo ohřívání reakce vypnuto a směs byla na míchačce ponechána do následujícího dne, kdy vykristalizovala pevná látka (Schéma 5). Heterogenní směs byla za sníženého tlaku zfiltrována a promyta vychlazeným *n*-propanolem (8 ml) a vychlazenou destilovanou vodou (5 ml). Filtrační koláč po vysušení vážil 128 mg a čistota činila 99 %. Filtrát byl dále zahuštěn na vakuové rotační odparce a s odparkem byla provedena extrakce kapalina-kapalina (EtOAc : H₂O). Po zahuštění ethylacetátové fáze na odparce byl odparek rekrystalizován přidáním malého množství EtOH a sonifikací v sonifikační lázni po dobu 60 minut. Druhý podíl produktu byl za sníženého tlaku zfiltrován a vysušen. Hmotnost druhého podílu při čistotě 99,5 % byla 17 mg. Celkový výtěžek tedy činil 38,7 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 13.00 (s, 1H), 8.23 (s, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 4.9, 3.6 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H).

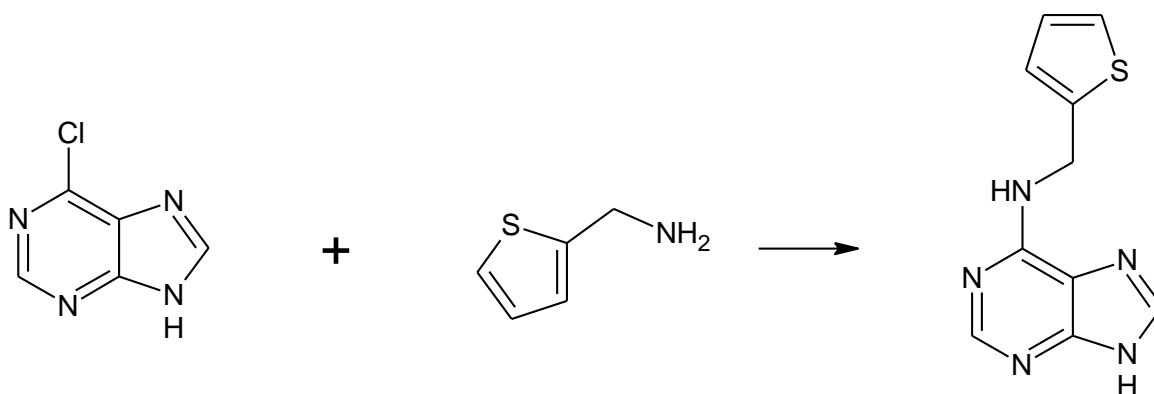


Schéma 5: Reakce 6-chlorpurinu s 2-thiofenmethylaminem za vzniku 6-(2-thiofenmethyl)aminopurinu

2.2.4. Syntéza 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (4)

Látky 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purin (6CIP9THP; 88 mg; 0,37 mmol), 2-thiofenmethylamin (45 μ l; 0,44 mmol) a Et₃N (154 μ l; 1,10 mmol) byly přeneseny do *n*-propanolu (5 ml). Směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 5 hodin. Průběh reakce (Schéma 6) byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: EtOAc : MeOH : NH₃ 34:4:2). Po 5 hodinách byl do reakce přidán 0,1 ekvivalent 2-thiofenmethylaminu (4 μ l; 0,04 mmol) a 1 ekvivalent Et₃N (51 μ l; 0,37 mmol), aby mohl zreagovat všechen 6CIP9THP. Reakce probíhala další 1,5 hodiny. Následně byla reakční směs zahuštěna na vakuové rotační odparce a odparek byl extrahován v systému kapalina-kapalina extrakcí (EtOAc : H₂O). Ethylacetátová fáze byla opět zahuštěna na odparce a byl získán odparek k němuž bylo přidáno malé množství diethyletheru pro krystalizaci. Vykrytalizovaný produkt byl za sníženého tlaku přes fritu zfiltrován a poté vysušen. Hmotnost produktu byla 48,8 mg (výtěžek: 41,8 %) a čistota 100 %. ¹H NMR (500 MHz, MeOH) δ 8.29 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.24 (dd, *J* = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 5.1, 3.5 Hz, 1H), 5.67 (dd, *J* = 10.9, 2.3 Hz, 1H), 4.11 – 4.06 (m, 1H), 3.77 (td, *J* = 11.7, 2.4 Hz, 1H), 2.20 – 2.10 (m, 1H), 2.07 – 1.99 (m, 2H), 1.83 – 1.66 (m, 2H), 1.64 – 1.57 (m, 1H).

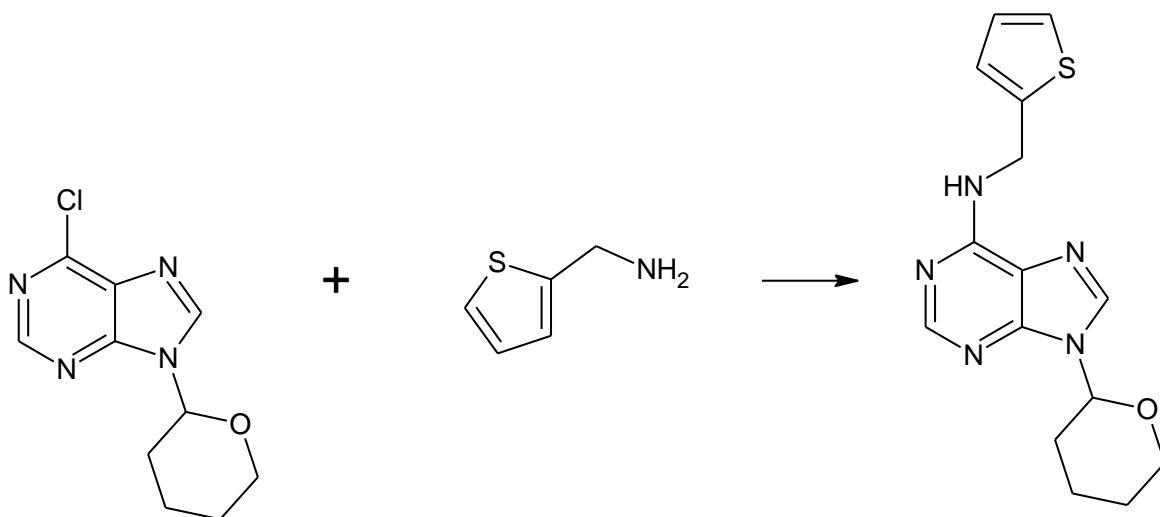


Schéma 6: Reakce 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu s 2-thiofenmethylaminem za vzniku 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu

2.2.5. Syntéza 6-(2-thiofenethyl)aminopurinu (5)

Látka byla připravena modifikací literatury (Hönig et al., 20018). Do *n*-propanolu (10 ml) byl přidán 6ClP (132 mg; 0,85 mmol), 2-thiofenethylamin (120 μ l; 1,02 mmol) a Et₃N (356 μ l; 2,55 mmol). Suspenze byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 5 hodin. Průběh reakce (*Schéma 7*) byl kontrolován dle TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 9:1). Po zahuštění reakční směsi na odparce a po přidání EtOAc (5 ml) vykristalovala pevná látka, jež byla zfiltrována za sníženého tlaku a promyta EtOAc (3 ml). Hmotnost po vysušení prvního podílu produktu činila 27,5 mg při čistotě 98,5 %. K filtrátu byla přidána voda a byla provedena extrakce kapalina-kapalina (EtOAc : H₂O). Ethylacetátová fáze byla opět zahuštěna na odparce a k odparku bylo přidáno malé množství EtOH pro vykristalizování produktu. Po následné filtraci a vysušení byla hmotnost produktu při čistotě 98,2 % 34,4 mg. Výsledný výtěžek tedy činil 29,7 %.

¹H NMR (500 MHz, MeOH) δ 8.25 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.20 (dd, *J* = 4.9, 1.4 Hz, 1H), 6.95 – 6.89 (m, *J* = 3.6, 2.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H)

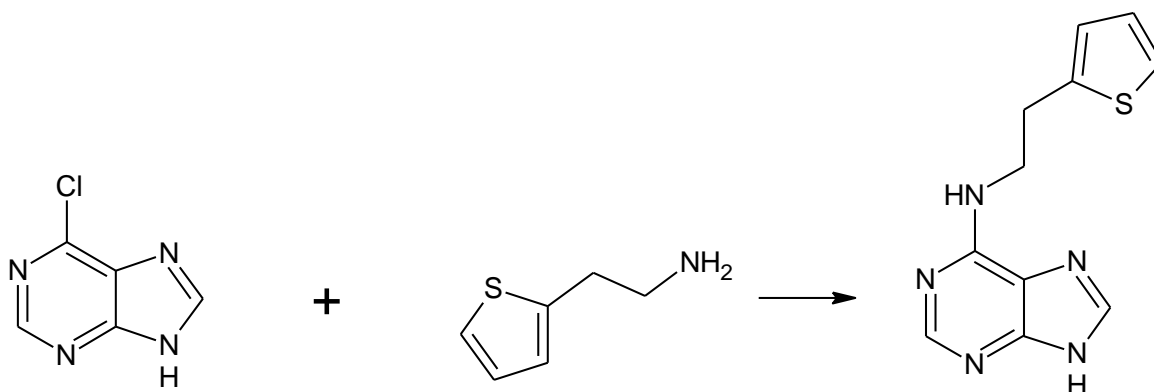


Schéma 7: Reakce 6-chlorpurinu s 2-thiofenethylaminem za vzniku 6-(2-thiofenethyl)aminopurinu

2.2.6. Syntéza 6-(2-thiofenethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (**6**)

V *n*-propanolu (5,5 ml) byly rozpuštěny látky: 6ClP9THP (156 mg; 0,66 mmol), 2-thiofenethylamin (92 μ l; 0,79 mmol) a Et₃N (274 μ l; 1,97 mmol). Směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 5 hodin. Průběh reakce (Schéma 8) byl kontrolován dle TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 18:1). Reakční směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a odparek byl extrahován kapalina-kapalina extrakcí (EtOAc : H₂O). Ethylacetátová fáze byla zahuštěna na odparce. K odparku bylo přidáno malé množství diethyletheru a po následné 10 minutové sonifikaci byl vykrytalizován produkt, jenž byl za sníženého tlaku přes fritu zfiltrován a poté vysušen. Hmotnost produktu byla 120 mg (výtěžek: 55,2 %) a čistota 100 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.28 (dd, *J* = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 5.0, 3.4 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, 1H), 5.58 (dd, *J* = 11.0, 2.1 Hz, 1H), 3.96 (ddt, *J* = 11.6, 4.2, 2.5 Hz, 1H), 3.69 (bs, 2H), 3.66 – 3.59 (m, 1H), 3.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.28 – 2.17 (m, 1H), 1.97 – 1.85 (m, 2H), 1.74 – 1.63 (m, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 2H).

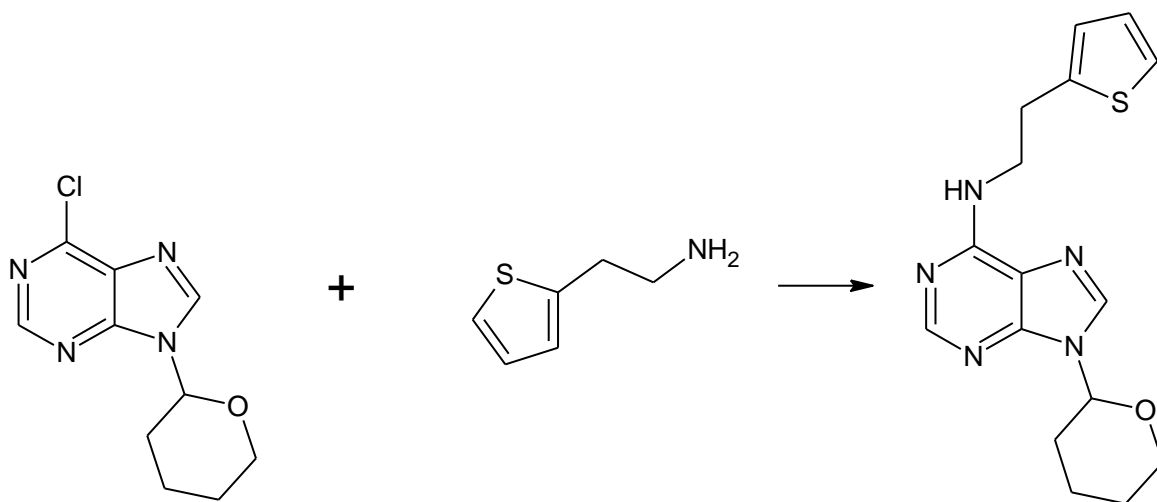


Schéma 8: Reakce 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu s 2-thiofenethylaminem za vzniku 6-(2-thiofenethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu

2.2.7. Syntéza 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (7)

Do *n*-propanolu (3,5 ml) byl přidán 6CIP (33,5 mg; 0,22 mmol), (5-bromthiofen-2-yl)methylamin (50 mg; 0,26 mmol) a Et₃N (91 μl; 0,65 mmol). Daná heterogenní směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 4 hodin. Při kontrole pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 9:1) bylo zjištěno, že látky ještě nezreagovaly. Směs tedy byla ponechána pod argonovou atmosférou, jenž výrazně zpomaluje oxidaci daných látek v reakční směsi, do dalšího pracovního dne. Následně reakce probíhala další 4 hodiny, poté byla vypnuta a míchána do následujícího dne, kdy vykrytalizoval pevný produkt (*Schéma 9*). Filtrací, promytím propanolem a vodou a vysušením bylo získáno 34,9 mg produktu (výtěžek: 51,1 %) o čistotě 97,6 %. ¹H NMR (500 MHz, MeOH) δ 12.90 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 6.92 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.65 (s, 2H).

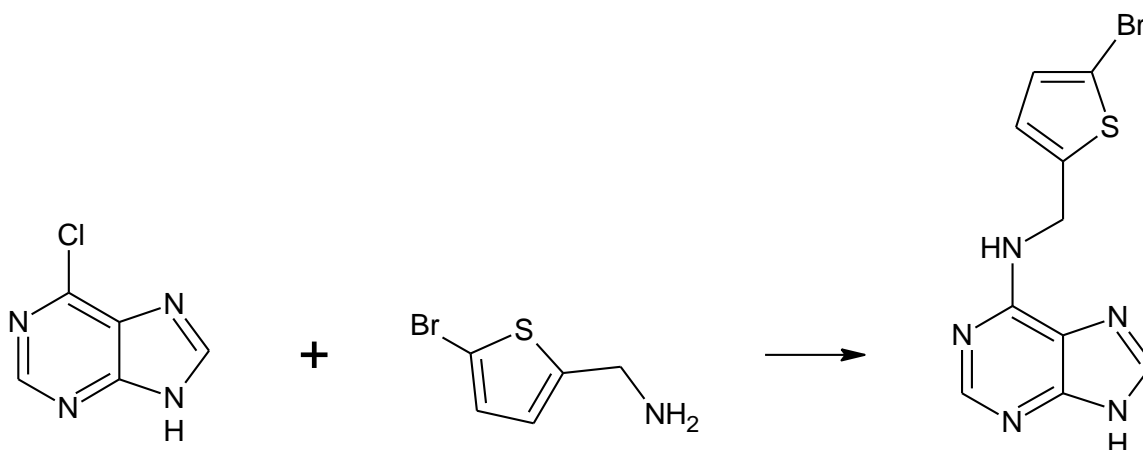


Schéma 9: Reakce 6-chlorpurinu s (5-bromthiofen-2-yl)methylaminem za vzniku 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu

2.2.8. Syntéza 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (8)

Do *n*-propanolu byly převedeny látky: 6ClP9THP (104 mg; 0,43 mmol), (5-bromthiofen-2-yl)methylamin (100 mg; 0,52 mmol) a Et₃N (181 μ l; 1,30 mmol). Suspenze byla pod zpětným chladičem a za stálého míchání zahřívána na 106 °C po dobu 7 hodin. Dle kontroly reakce pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform : MeOH 18:1) bylo patrné, že daný 6ClP9THP ještě nezreagoval. Tudíž byl k reakční směsi přidán Et₃N (121 μ l; 0,87 mmol) a reakce probíhala dalších 6 hodin. Dále byla reakce míchána při RT po dobu 24 h, kdy vykristalizoval pevný produkt (*Schéma 10*). Směs s tímto produktem byla míchána v ledové lázni pro dobu 20 minut a produkt byl následně přes fritu za sníženého tlaku zfiltrován, promyt vychlazeným *n*-propanolem a vodou a vysušen k následnému vážení. Bylo získáno 77 mg látky (výtěžek: 45,4 %) o čistotě 99,8 %. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.46 (bs, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.29 (bs, 1H), 7.02 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.63 (dd, *J* = 11.0, 2.0 Hz, 1H), 4.75 (bs, 2H), 4.02 – 3.96 (m, 1H), 3.70 – 3.64 (m, 1H), 2.32 – 2.22 (m, 1H), 2.00 – 1.90 (m, 2H), 1.77 – 1.68 (m, 1H), 1.63 – 1.52 (m, 2H).

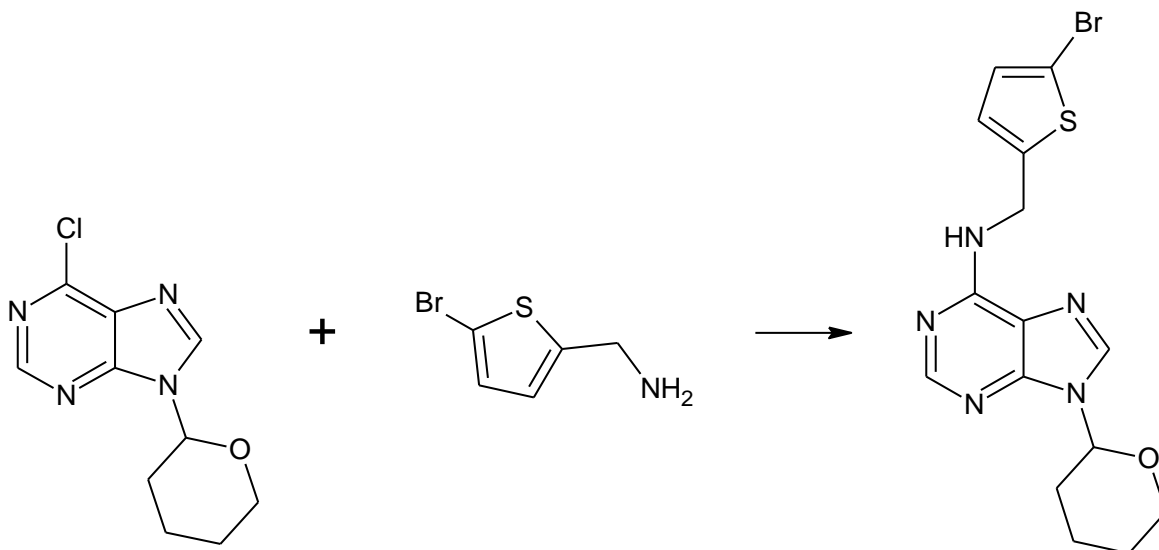


Schéma 10: Reakce 6-chlor-9-(tetrahydropyran-2-yl)purinu s (5-bromthiofen-2-yl)methylaminem za vzniku 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu

3.3 SENESCENČNÍ BIOTEST NA USTŘIŽENÝCH LISTECH PŠENICE

Senescenční biotest byl prováděn za pomoci odborného technika Jarmily Balonové. Byly použity 7 dní staré lístky pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z připravených látek byly vytvořeny 50 mM roztoky v DMSO. Do 96-jamkové desky byly pipetovány roztoky daných látek o koncentracích 10^{-3} až 10^{-9} , do nichž byly umístěny vždy 4 lístky pšenice o celkové hmotnosti 99-101 mg. Takto připravená deska byla inkubována 5 dní v temném prostředí. Po 5 denní inkubaci byly lístky přemístěny do EtOH na dobu 10 minut při 80 °C ve vodní lázni, kdy proběhla extrakce zbylého chlorofylu z lístků. Ethanolové vzorky chlorofylu jednotlivých čtveřic lístků byly opět pipetovány do 96-jamkové desky, ze které byla měřena absorbance chlorofylu při vlnové délce 665 nm.

3.4 TESTOVÁNÍ TOTOXICITY – RESAZURINOVÝ TEST

Toxicita připravených látek byla testována v laboratoři Dr. Vollera pod vedením odborného technika Kateřiny Fakové. Jako testovací materiál byly použity lidské diploidní fibroblasty buněčné linie BJ, lidské retinální pigmentové epiteliální buňky linie ARPE-19 a keratinocyty buněčné linie HaCaT. Linie BJ a HaCaT byly kultivovány v 10% DMEM médiu a linie ARPE-19 byla ve stejném 10% DMEM médiu s přídavkem glukózy.

Do 96-jamkových desek bylo pipetováno vždy 80 μ l naředěných buněčných linií tak, aby jedna jamka desky obsahovala 5 000 buněk linie BJ, popřípadě 7 000 buněk linie HaCaT nebo ARPE-19. Krajní jamky desky obsahovaly 100 μ l média pro kontrolu testování. Desky s buňkami byly inkubovány při 37 °C do následujícího dne.

Po 24 hodinové inkubaci byly přidávány testované látky. Z připravených látek byly vytvořeny 100 mM roztoky v DMSO (25 mM roztok v DMSO z látky **7** z důvodu špatného rozpouštění), které byly 200x zředěny. Postupně byly v ředící 96-jamkové desce vytvořeny koncentrace látek vždy 3x menší než koncentrace v předchozí jamce. Do připravených desek s buňkami bylo v triplicátu pipetováno vždy 20 μ l naředěné testované látky, díky čemuž se látky naředily ještě 5x. Konečné koncentrace látek jsou tedy 100 μ M, 33,33 μ M, 11,11 μ M, 3,70 μ M, 1,23 μ M a 0,41 μ M. Takto otrávené buňky byly inkubovány do dalšího dne, kdy bylo přidáno fluorescenční barvivo resazurin. Modrý resazurin se redukuje díky metabolicky aktivním buňkám na červený resofurin, který se po 3 hodinách inkubace

s buňkami fluorescenčně detekuje na přístroji Infinite M200 PRO od firmy Tecan, při excitační vlnové délce 544 nm a emisní 590 nm.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 PŘIPRAVENÉ LÁTKY

V rámci bakalářské práce bylo připraveno 8 látek. Všechny tyto látky mají v poloze N6 adeninu substituovaný derivát thiofenu, přičemž látky **4**, **6** a **8** nesou navíc modifikaci v poloze N9. Látky byly připraveny řízenou nukleofilní substitucí aminu s 6CIP popřípadě s 6CIP9THP v alkalickém prostředí, přičemž syntéza látek **3** a **5** je inspirována literaturou (Hönig et al., 2018).

Tabulka 1: Shrnutí připravených látek, reakční čas, výtěžek, čistota a body tání daných látek

Látka	Reakční čas (min)	Výtěžek (%)	Čistota (%)	Bod tání (°C)
1	360	33,5	99,5	238
2	330	23,5	100	233
3	240	38,7	99,3	245
4	390	41,8	100	115
5	300	29,7	98,4	237
6	300	55,2	100	125
7	480	51,1	97,6	277
8	780	45,4	100	129

Reakční čas látek se pohyboval od 4 do 13 h. Nejdelšího reakčního času, dosahovaly látky **7** a **8**, látky s bromem navázaným v poloze 2 thiofenu.

Připravené látky byly charakterizovány pomocí HPLC-MS, NMR a pomocí měření bodu tání. Díky ¹H NMR spektrometrické analýzy byla, na základě přítomnosti daného počtu vodíku, nepřímo potvrzena struktura látek. Pomocí HPLC analýzy byla určena čistota látek, přičemž díky MS byly potvrzeny jejich molekulové hmotnosti. Čistota látek ve všech případech přesahovala 97,5 % (Tabulka 1), přičemž 100% čistota byla změřena hlavně u látek nesoucí modifikaci THP (látky **4**, **6**, **8**) a u látky **2**, která byla přečištěna pomocí semipreparativní stanice 1290 Infinity II (kapitola 3.1.2). MS a NMR spektra jsou uvedena v příloze této práce (Příloha 1, Příloha 2).

4.2 VÝSLEDKY SENESCENČNÍHO BIOTESTU

Připravené látky byly otestovány na biologickou aktivitu v senescenčním biotestu na ustřížených listech pšenice. Test byl proveden na pracovišti Centrum regionu Haná – Oddělení chemické biologie a genetiky dle postupu uvedeného v kapitole 3.3 a publikované literatury (Holub et al., 1998).

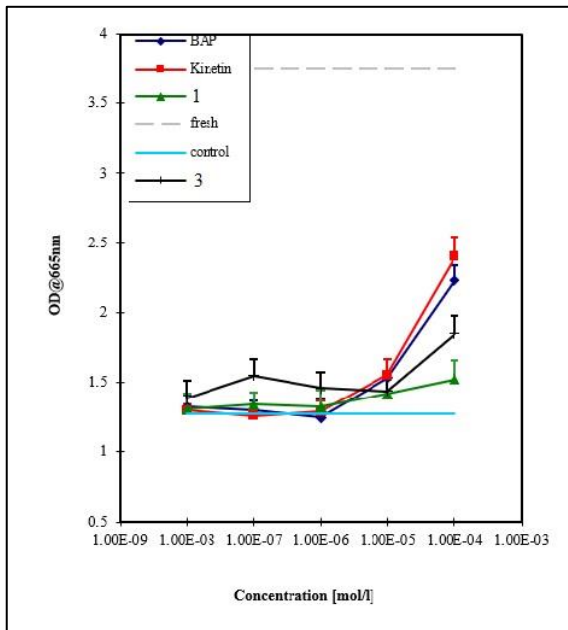
Dle *Grafu 1* je patrný rozdíl biologické aktivity látky **3** (thiokinetin) a látky **1** s podobnou strukturou, nesoucí navíc metylovou skupinu na thiofenovém kruhu. Látka **3** je aktivní již při koncentraci 10^{-7} mol/l, kdy je její biologická aktivita vyšší než v případě BAP a Kin. Aktivita látky **1**, jenž je opatřena metylovou skupinou, v této koncentraci začíná teprve mírně stoupat. Při koncentraci 10^{-5} mol/l jsou anti-senescenční aktivity látky **1**, **3**, BAP a Kin srovnatelné, přičemž aktivita BAP a Kin začíná prudce narůstat. Lze tedy konstatovat, že nahrazení atomu kyslíku sírou v Kin snižuje anti-senescenční aktivitu cytokininů, jak již publikoval Hönig a jeho spolupracovníci (Hönig et al., 2018), avšak ani metylová skupina na thiofenovém kruhu tuto aktivitu nezvyšuje.

Látky, u nichž se projevila nejvyšší biologická aktivita z této série látek, jsou srovnávány v *Grafu 2*. Jde o látky **3** a **4**, přičemž látka **4** nese chránící THP skupinu v poloze N9. Právě látka **4** prokazuje již od koncentrace 10^{-8} mol/l vyšší biologickou aktivitu, než mají cytokininy BAP a Kin. Při koncentraci 10^{-4} mol/l se aktivita látky **4** nepatrně snižuje pod úroveň těchto standardů. Anti-senescenční aktivita látky **3** je v nízkých koncentracích až do 10^{-5} mol/l srovnatelná s poměřovanými standardy, ale při vyšších koncentracích látky je již biologická aktivita nižší. Skutečnost, že biologická aktivita látky **4** je vyšší než aktivita její volné báze (látka **3**) je zřejmě následkem připojení chránící skupiny THP (Szüčová et al., 2009).

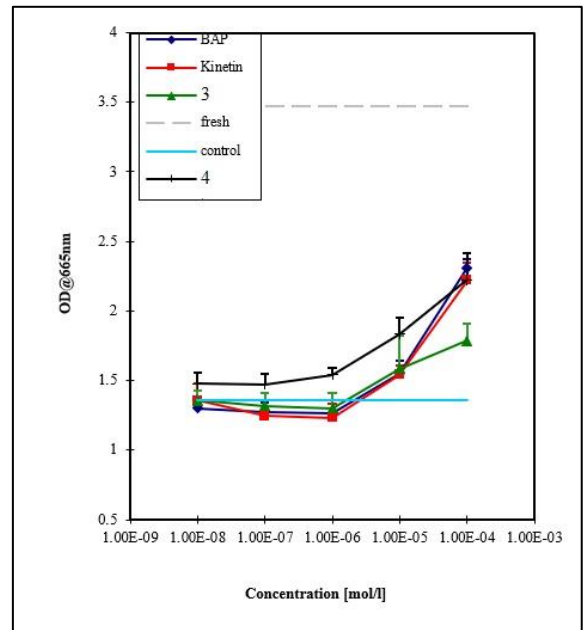
V *Grafu 3* jsou porovnávány sloučeniny **5** a **6**. Obě tyto sloučeniny mají thiofen navázaný na molekulu adeninu přes ethylenový můstek. Zatímco látka **5** je volná báze, látka **6** je v poloze N9 chráněna THP. U obou látek je zřejmé, že při koncentracích nižších než 10^{-5} mol/l nevykazují biologickou aktivitu. Naopak při koncentraci nad 10^{-5} mol/l, látka **6** způsobuje mírný nárůst biologické aktivity oproti látce **5**. Tato skutečnost může být zapříčiněna přítomností THP molekuly v poloze N9 (Szüčová et al., 2009). Obě látky však nedosahují aktivity poměřovaných cytokininových standardů Kin a BAP.

Graf 4 porovnává aktivitu látek **7** a **8** s Kin a BAP. Látky **7** a **8** nesou na pětičlenném kruhu thiofenu v poloze 2 (ortho) prvek brom, přičemž látka **8** je substituovaná THP v poloze N9. Z grafu je očividné, že v daných testovaných koncentracích nevykazují tyto

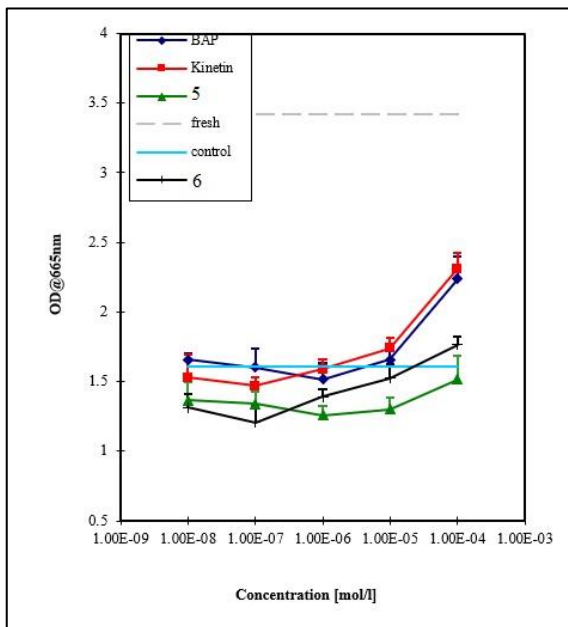
látky žádnou anti-senescenční aktivitu, a to ani při substituci chránící skupinou. V tomto případě je možné, že příčinou nulové aktivity látek je právě brom.



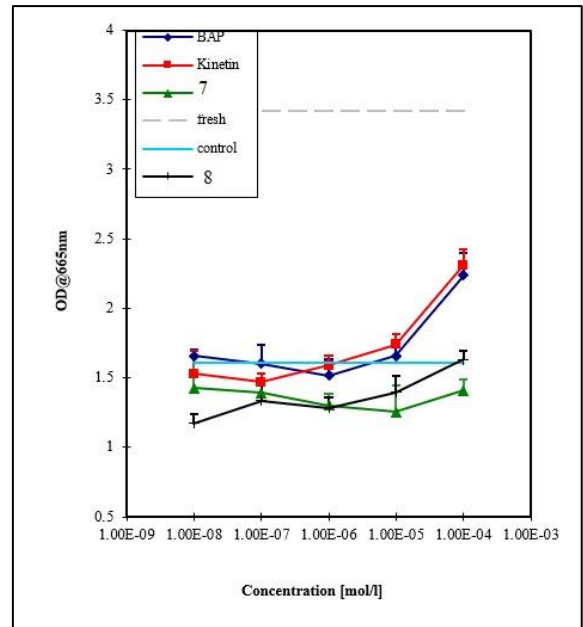
Graf 1: Závislost absorpce chlorofylu na koncentraci testované látky (absorpční maximum: 665 nm vlnové délky), látka 1 - zeleně, látka 3 - černě



Graf 2: Závislost absorpce chlorofylu na koncentraci testované látky (absorpční maximum: 665 nm vlnové délky), látka 3 - zeleně, látka 4 - černě



Graf 3: Závislost absorpce chlorofylu na koncentraci testované látky (absorpční maximum: 665 nm vlnové délky), látka 5 - zeleně, látka 6 - černě



Graf 4: Závislost absorpce chlorofylu na koncentraci testované látky (absorpční maximum: 665 nm vlnové délky), látka 7 - zeleně, látka 8 - černě

4.3 VÝSLEDKY RESAZURINOVÉHO TESTU

U všech připravených látek byla pomocí resazurinového testu *in vitro* testována cytotoxicita (kap. 3.4). K testování byly použity lidské diploidní fibroblasty buněčné linie BJ, lidské retinální pigmentové epiteliální buňky linie ARPE-19 a keratinocyty buněčné linie HaCaT. Jako netoxické či jako marginálně toxické byly určeny látky, u nichž resazurinová fluorescence v buňkách poklesla méně než o 10 % oproti kontrolním neovlivněným buňkám. Pokles fluorescence vypovídá o apoptóze buněk v důsledku toxicity testované látky, neboť k fluorescenci dochází jen v metabolicky aktivních buňkách. Nejvyšší testovaná koncentrace látek činila 100 μM . Výsledné grafy resazurinového testu jsou uvedeny v příloze (Příloha 3).

Tabulka 2: Cytotoxicita připravených látek na lidských buněčných liniích ARPE-19, HaCat a BJ, v tabulce jsou uvedeny maximální koncentrace, při které látky vykazovaly marginální nebo žádnou toxicitu (fluorescence resazurinu < 10 %), hodnoty jsou uvedeny v μM a zaokrouhleny na dvě desetinná místa

Látka	Koncentrace látky (μM)		
	ARPE-19	HaCat	BJ
1	> 100	11,11	11,11
2	> 100	11,11	11,11
3	> 100	33,33	11,11
4	> 100	> 100	33,33
5	> 100	11,11	11,11
6	1,23	33,33	11,11
7	> 100	11,11	11,11
8	> 100	33,33	11,11

V případě retinálních buněk buněčné linie ARPE-19 je toxicita pozorována pouze u látky 6. Ostatní látky se v koncentracích pod 100 μM jeví pro retinální epiteliální buňky netoxické.

Resazurinový test na buněčné linie HaCat prokázal cytotoxicitu všech látek až na látku 4, 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin. U této sloučeniny nebyla pozorována cytotoxicita ani při koncentraci 100 μM . Na druhou stranu látky 1, 2, 5 a 7 jsou toxické již při koncentraci 11,11 μM , přičemž látky 3, 6 a 8 vykazují toxicitu

až při vyšší koncentraci 33,33 μM . Nepatrné snížení toxicity může být důsledkem modifikace látek **6** a **8** THP skupinou v poloze N9, neboť THP skupinou je opatřena i látka **4**, která oproti svému homologu bez THP (látka **3**) toxická není.

Všechny připravené látky byly toxické na buněčné linii BJ. Připravené látky se projevily cytotoxicky již při koncentraci 11,11 μM . Látka **4** působila na fibroblasty cytotoxicky až v koncentraci 33,33 μM .

5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo připraveno 8 látek se substituovaným thiofenovým kruhem v poloze N6 adeninu. Látky byly charakterizovány pomocí MS a ¹H NMR spekter. Tyto připravené deriváty purinu byly testovány na anti-senescenční aktivitu a na cytotoxicitu vůči lidským buňkám. Diskutovaly se zejména změny související se strukturními rozdíly v postranním řetězci a vliv THP modifikace na biologickou aktivitu či cytotoxicitu látek.

Výsledky senescenčního testu na ustřížených listech pšenice prokázaly nejvyšší biologickou aktivitu sloučeniny 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurinu (látka **4**). Ve většině testovaných koncentracích látka převyšovala biologickou aktivitu poměřovaných cytokininových standardů Kin, BAP a látky **3** (thio-Kin), jež je její volná báze, u které byla taktéž pozorována vyšší anti-senescenční aktivita. Mírné zvýšení biologické aktivity bylo patrné i v případě nově připravené látky 6-[(5-methylthiofen-2-yl)methyl]aminopurinu (látka **1**), jež je opatřena methylovou skupinou na thiofenovém kruhu. Nepatrně vyšší biologická aktivita byla změřena u látky **6**, ale jen při vyšších koncentracích.

Připravené látky se ukázaly být v resazurinovém testu cytotoxické na buněčnou linii lidských diploidních fibroblastů BJ i na buněčnou linii lidských keratinocytů HaCat. Látka 6-(2-thiofenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka **4**) se však při koncentraci do 100 μM na buněčnou linii HaCat toxicky neprojevila a při testování na buněčné linii BJ působila toxicky až při 33,33 μM, jako jediná z látek. Naopak netoxicky působily látky na lidskou retinální pigmentovou epiteliální buněčnou linii ARPE-19, až na látku **6**, u níž je cytotoxicita pozorována již při koncentraci 1,23 μM.

Vzhledem k vysoké anti-senescenční aktivitě a žádné nebo marginální toxicitě látky **4**, by se tato sloučenina mohla stát předmětem dalšího zkoumání a testování pro využití v biotechnologiích, a to jak na rostlinných, tak živočišných (lidských) buňkách. Látky, jež se ukázaly být toxické, jsou zajímavým námětem pro studium jejich vlivu na nádorové buňky a studium antitumorových účinků.

POUŽITÁ LITERATURA

Barciszewski, J., Rattan, S. I., Siboska, G., Clark, B. F. Kinetin—45 years on. *Plant Science*, 1999, 148.1: 37-45.

Barciszewski, J., Massino, F., Clark, B. F. Kinetin—a multiactive molecule. *International journal of biological macromolecules*, 2007, 40.3: 182-192.

Chen, Z.; Ku, T. C.; Seley-Radtke, K. L. Thiophene-expanded guanosine analogues of Gemcitabine. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2015, 25.19: 4274-4276.

Davies, P. J. (ed.). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*. Springer Science & Business Media, 2004, 1-8.

Davies, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones*. Springer, Dordrecht, 2010, 1-15.

De Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlíček, L., Strnad, M., Kim, S. H. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 243.1-2: 518-526.

Doležal, K., Popa, I., Hauserová, E., Spíchal, L., Chakrabarty, K., Novák, O., Kryštof, V., Voller, J., Holub, J., Strnad, M. Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2007, 15.11: 3737-3747.

Edamatsu, H., Gau, C. L., Nemoto, T., Guo, L., Tamanoi, F. Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene*, 2000, 19.27: 3059.

Flefel, E. M., El-Galil, A., Amr, E., Fayed, A. A., Kalmouch, A., Bahashwan, S. A. Synthesis and pharmacological activities of some new triazoloand tetrazolopyrimidine derivatives. *Molecules*, 2013, 18:15051–15063

Gan, S., Amasino, R. M. Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant physiology*, 1997, 113.2: 313.

Ghorab, M. M., Bashandy, M. S., Alsaid, M. S. Novel thiophene derivatives with sulfonamide, isoxazole, benzothiazole, quinoline and anthracene moieties as potential anticancer agents. *Acta Pharmaceutica*, 2014, 64.4: 419-431.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*, 2004, 18.5: 703-710.

Harrison, M. A. Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions. In: *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 49-76.

Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. E., Strnad, M. Biological activity of cytokinins derived from ortho-and meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*, 1998, 26.2: 109-115.

Hönig, M., Plíhalová, L., Spíchal, L., Grúz, J., Kadlecová, A., Voller, J., Rajnochová-Svobodová, A., Vostálová, J., Ulrichová, J., Doležal, K., Strnad, M. New cytokinin derivatives possess UVA and UVB photoprotective effect on human skin cells and prevent oxidative stress. *European journal of medicinal chemistry*, 2018, 150: 946-957.

Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., Czerpak, R. N⁶-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry*, 2016, 413.1-2: 97-107.

Jha, K. K., Kumar, S., Tomer, I., Mishra, R. Thiophene: the molecule of diverse medicinal importance. *J. Pharm. Res*, 2012, 5: 560-566.

Letham, D. S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life sciences* (1962), 1963, 8: 569.

Li, M., Ouyang, W., Li, J., Si, L., Li, X., Guo, J., Li, H. Effects of kinetin on thymus and immune function of aging Rats. *Pak Vet J*, 2016, 36: 356-362

Mccullough, J. L.; Garcia, R. L.; Reece, B. A clinical study of topical Pyratine 6 for improving the appearance of photodamaged skin. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 2008, 7.2: 131-135.

Meyer, V. Ueber den begleiter des benzols im steinkohlentheer. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1883, 16.1: 1465-1478.

Mik, V., Szüčová, L., Šmehilová, M., Zatloukal, M., Doležal, K., Nisler, J., Grúz, J., Galuszka, P., Strnad, M., Spíchal, L. N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry*, 2011, 72.8: 821-831.

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 1955, 77: 1392.

Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division^{1, 2}. *Journal of the American Chemical Society*, 1956, 78.7: 1375-1380.

Mohareb, R. M., Abdallah, A. E., Helal, M. H., Shaloof, S. M. Synthesis and structure elucidation of some novel thiophene and benzothiophene derivatives as cytotoxic agents. *Acta Pharmaceutica*, 2016, 66.1: 53-68.

O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*, 2000, 267.17: 5421-5426.

Othman, E. M., Naseem, M., Awad, E., Dandekar, T., Stopper, H. The plant hormone cytokinin confers protection against oxidative stress in mammalian cells. *PloS one*, 2016, 11.12: e0168386.

Pillai, A. D., Rathod, P. D., Xavier, F. P., Padh, H., Sudarsanam, V., Vasu, K. K. Tetra substituted thiophenes as anti-inflammatory agents: Exploitation of analogue-based drug design. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2005, 13.24: 6685-6692.

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule J., Šebánek J., et al. Fyziologie rostlin. Praha, Academia, 1998, ISBN 80-200-0586-2.

Rattan, S. I. S., Clark, B. F. C. Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts. Biochemical and biophysical research communications, 1994, 201.2: 665-672.

Shah, R., Verma, P. K. Therapeutic importance of synthetic thiophene. Chemistry Central Journal, 2018, 12.1: 137

Strnad, M., Hanuš, J., Vaněk, T., Kamínek, M., Ballantine, J. A., Fussell, B., Hanke, D. E. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus× canadensis* Moench., cv. Robusta). Phytochemistry, 1997, 45.2: 213-218.

Strnad, M. The aromatic cytokinins. Physiologia Plantarum, 1997, 101.4: 674-688.

Szüčová, L., Zatloukal, M., Spíchal, L., Frohlich, L., Doležal, K., Strnad, M., Massino, F. J. 6, 9-Disubstituted Purine Derivatives And Their Use For Treating Skin. WO2008008770 and US20080009508, 2008.

Szüčová, L., Spíchal, L., Doležal, K., Zatloukal, M., Greplová, J., Galuszka, P., Kryštof, V., Voller, J., Popa, I., Massino, F. J., Jørgensen, J. E., Strnad, M. Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. Bioorganic & medicinal chemistry, 2009, 17.5: 1938-1947.

Tehranchian, S., Akbarzadeh, T., Fazeli, M. R., Jamalifar, H., Shafiee, A. Synthesis and antibacterial activity of 1-[1, 2, 4-triazol-3-yl] and 1-[1, 3, 4-thiadiazol-2-yl]-3-methylthio-6, 7-dihydrobenzo [c] thiophen-4 (5H) ones. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2005, 15.4: 1023-1025.

Tran, L. S. P., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings. Plant signaling & behavior, 2010, 5.2: 148-150.

Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S., Meijer, L. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European journal of biochemistry*, 1994, 224.2: 771-786.

Weselsky, P. Ueber die Azoverbindungen des Resorcins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1871, 4.2: 613-619.

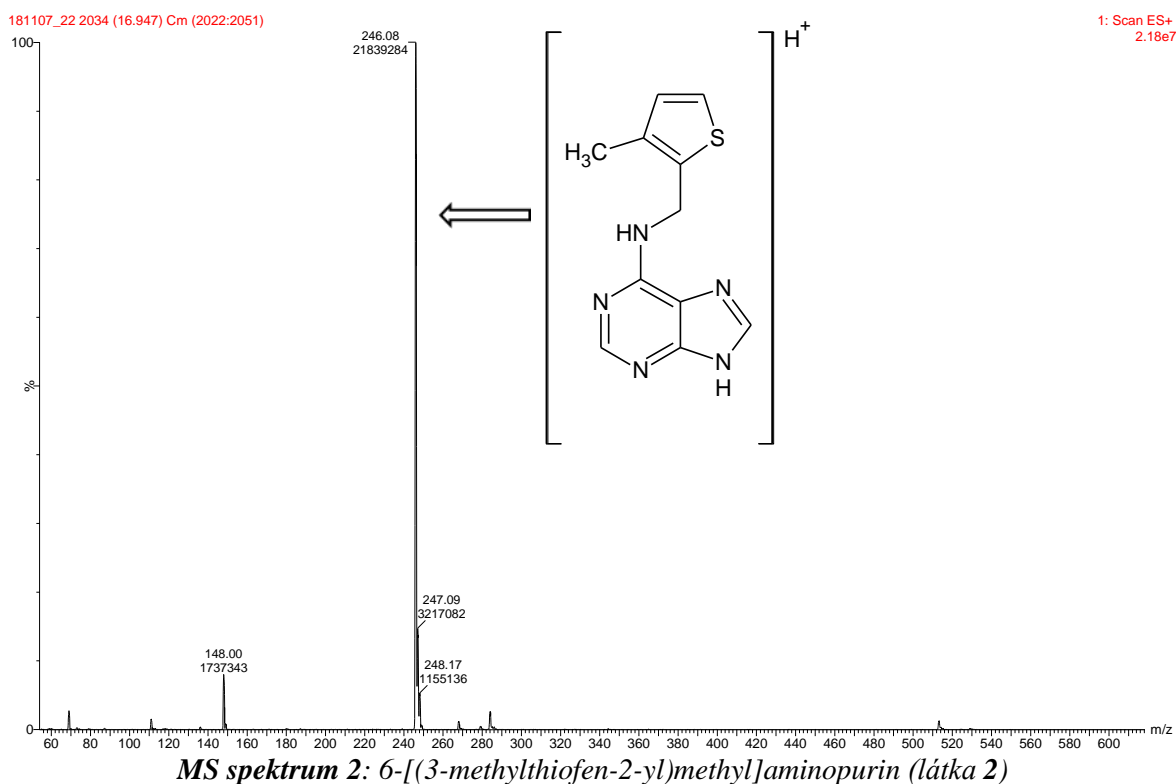
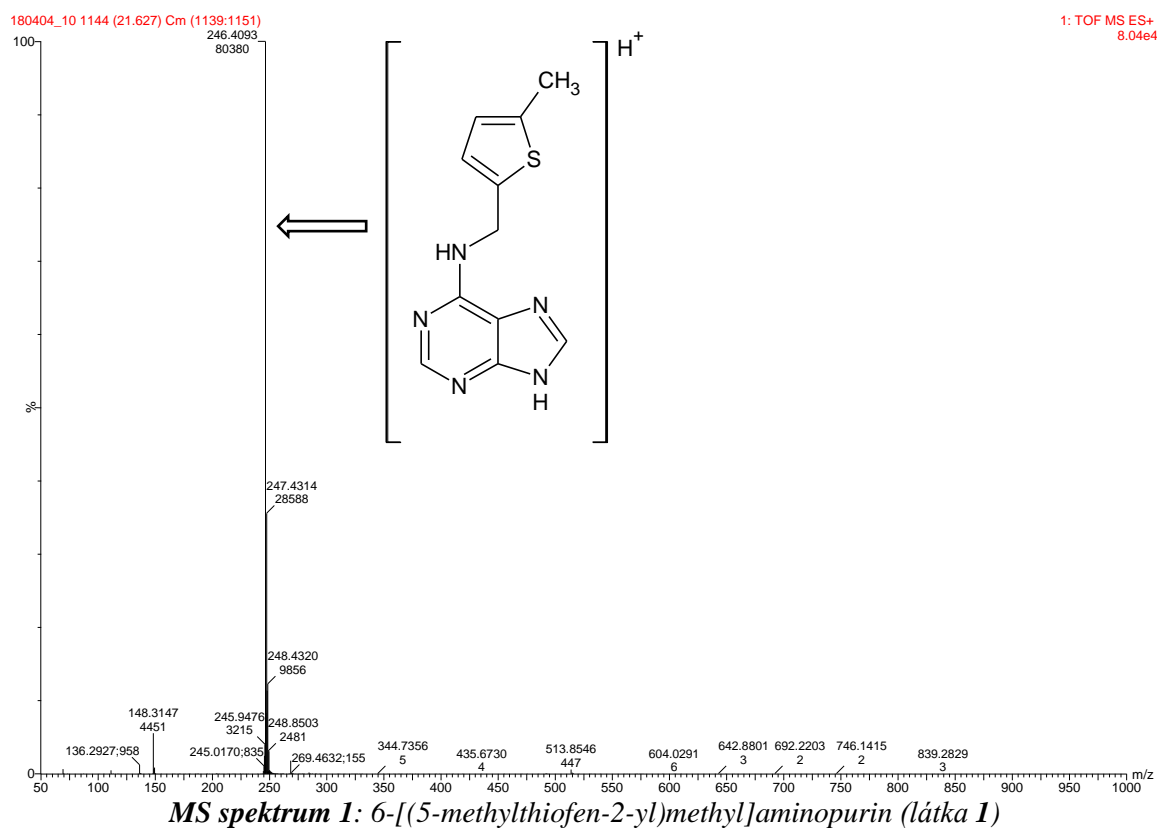
Whitehead, C. W., Traverso, J. J. Exchange amination. Alkyl and Arylamino-pyrimidines and Purines. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82.15: 3971-3974.

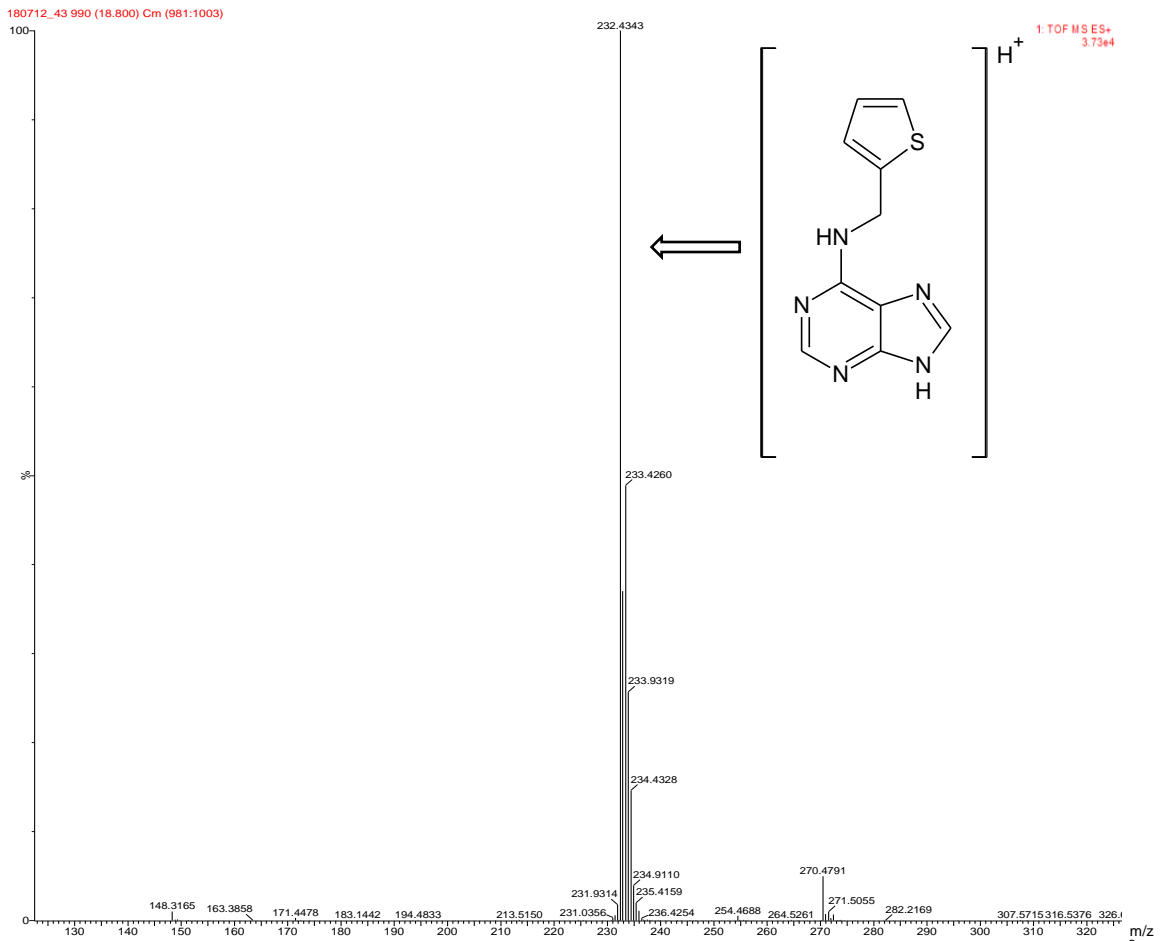
Zhang, R., Letham, D. S., Parker, C. W., Schroeder, H., Higgins, T. J. V. Retardation of soybean leaf senescence and associated effects on seed composition. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1987, 6.1: 15-21.

Zhang, R.; Letham, D. S. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. III. The senescence-retarding activity and metabolism of 9-substituted 6-benzylaminopurines in soybean leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1989, 8.3: 181-197.

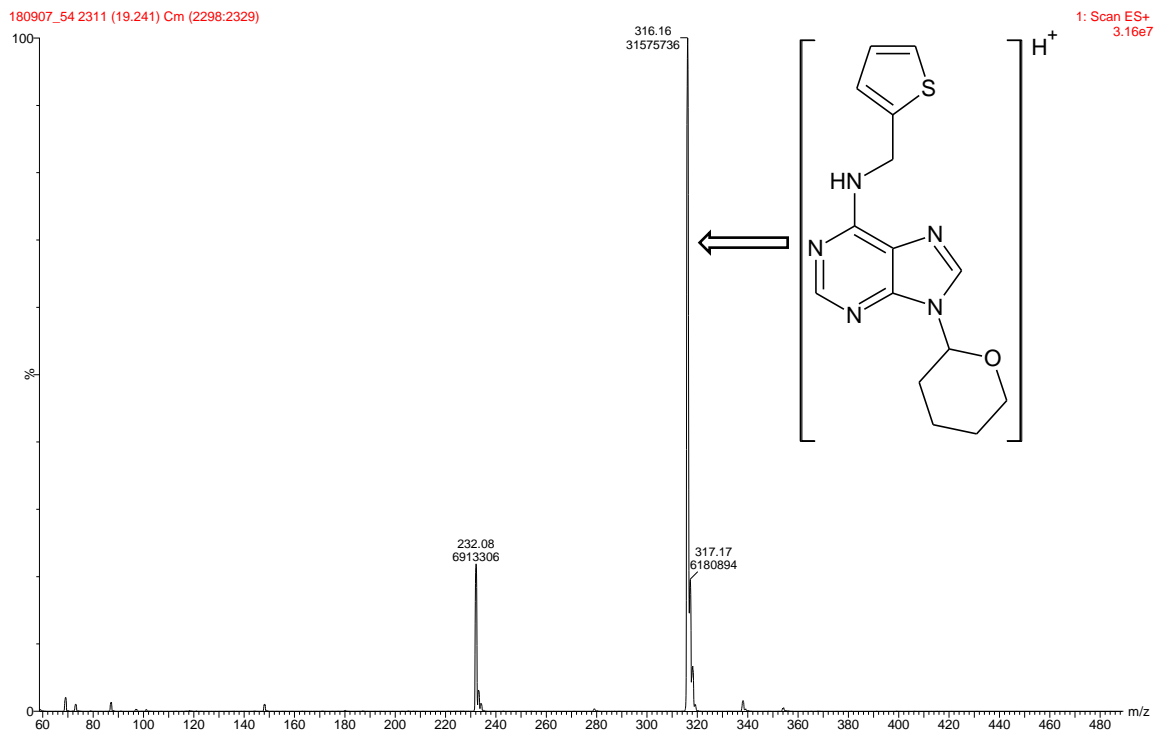
PŘÍLOHY

PŘÍLOHA A: HMOTNOSTNÍ SPEKTRA LÁTEK

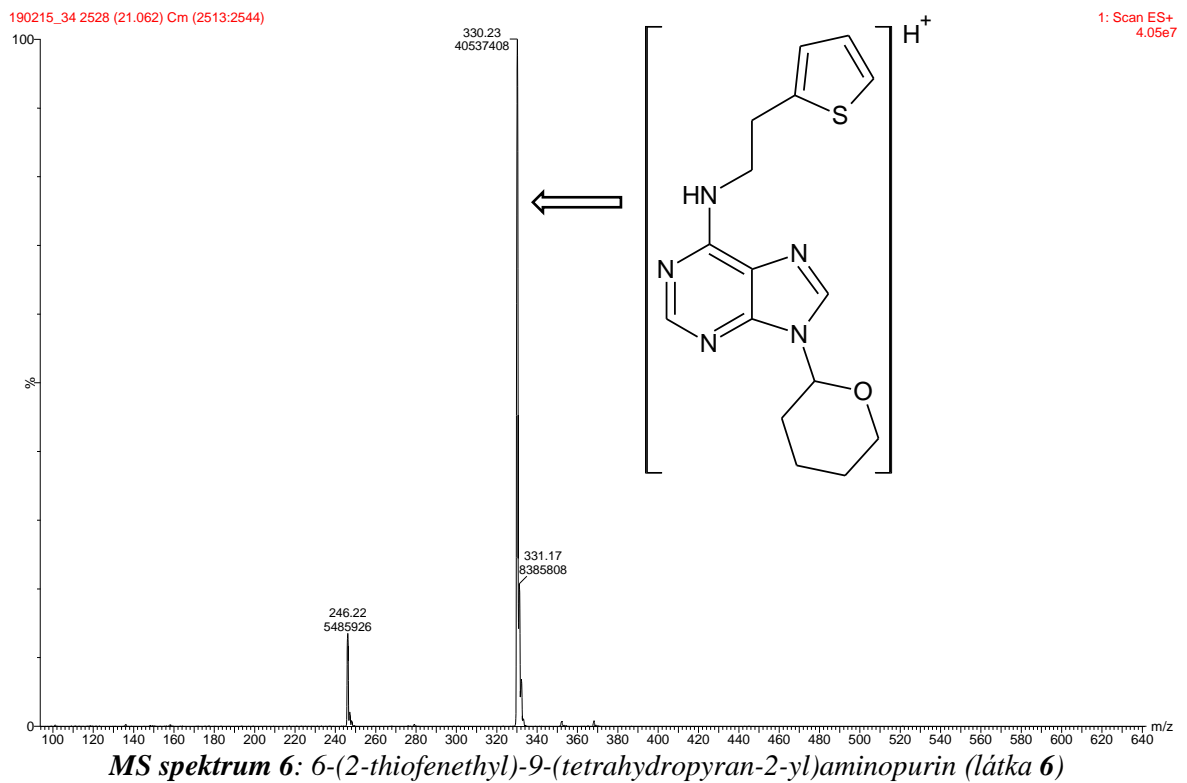
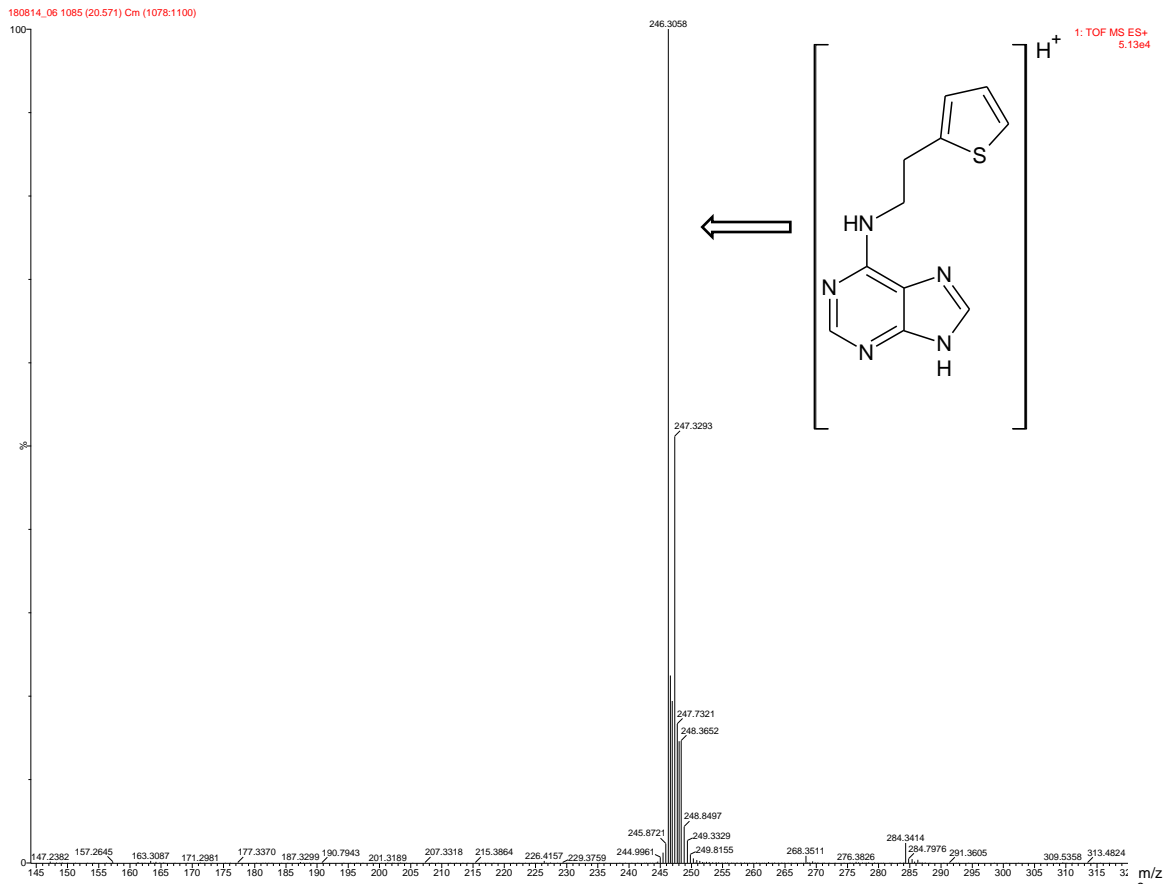




MS spektrum 3: 6-(2-thiophenmethyl)aminopurin (látka 3)

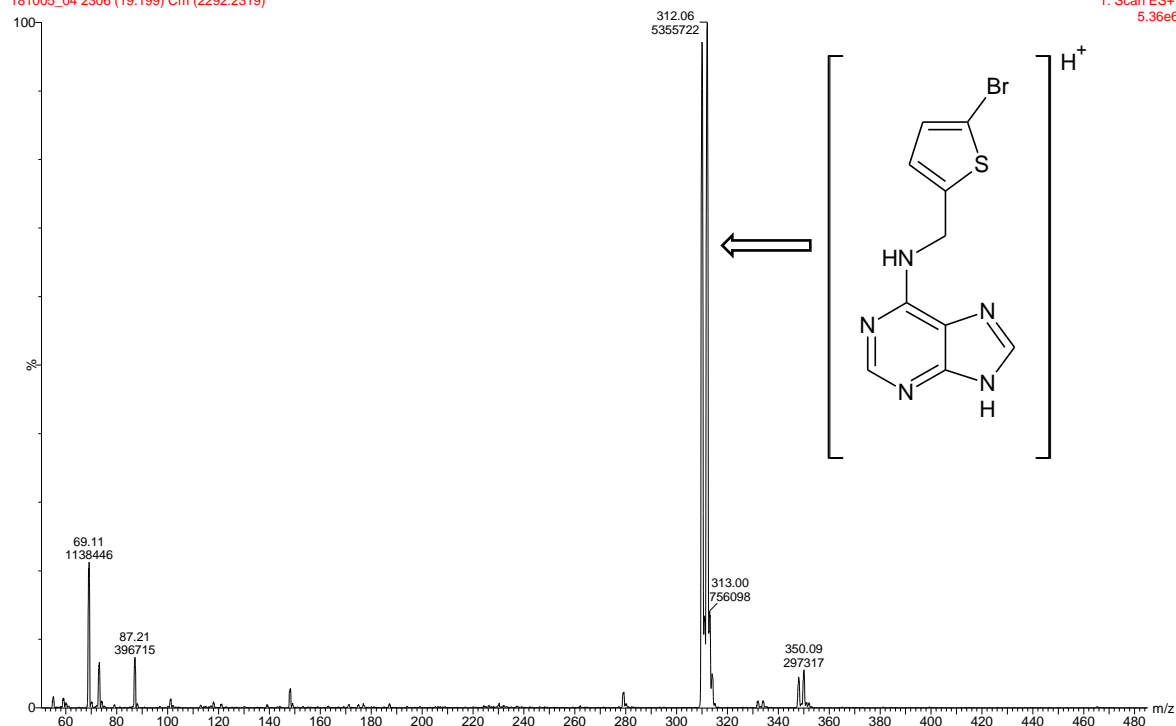


MS spektrum 4: 6-(2-thiophenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka 4)



181005_04 2306 (19.199) Cm (2292:2319)

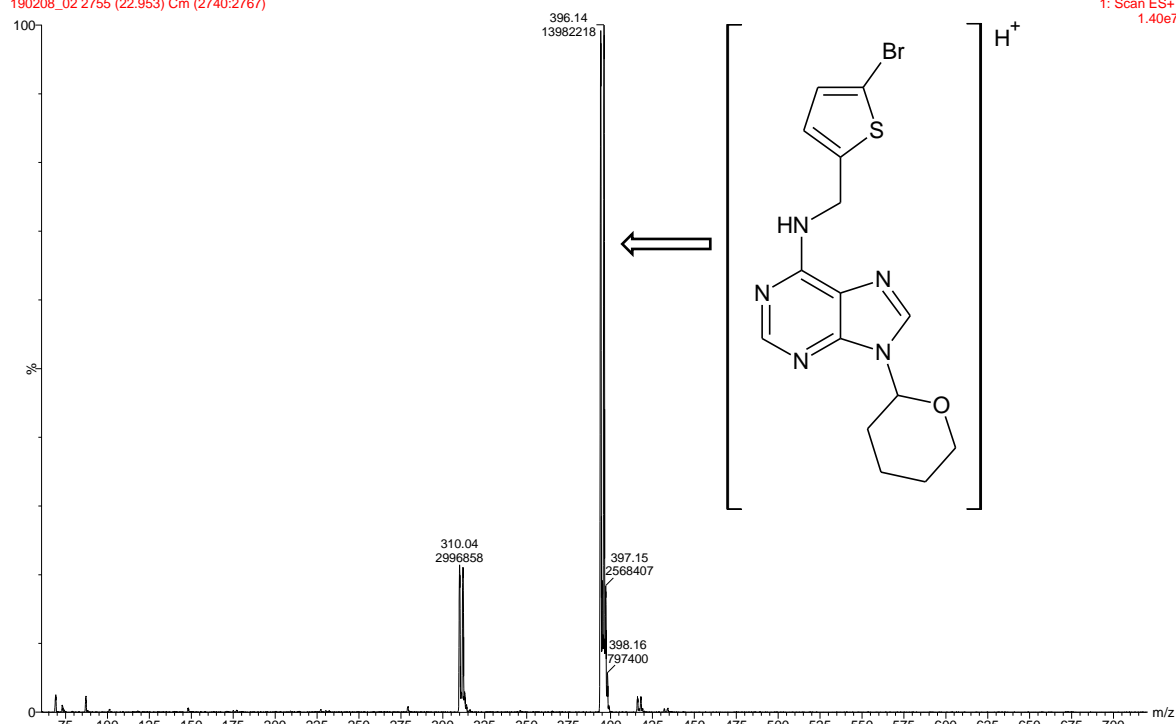
1: Scan ES+
5.36e6



MS spektrum 7: 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]aminopurin (látka 7)

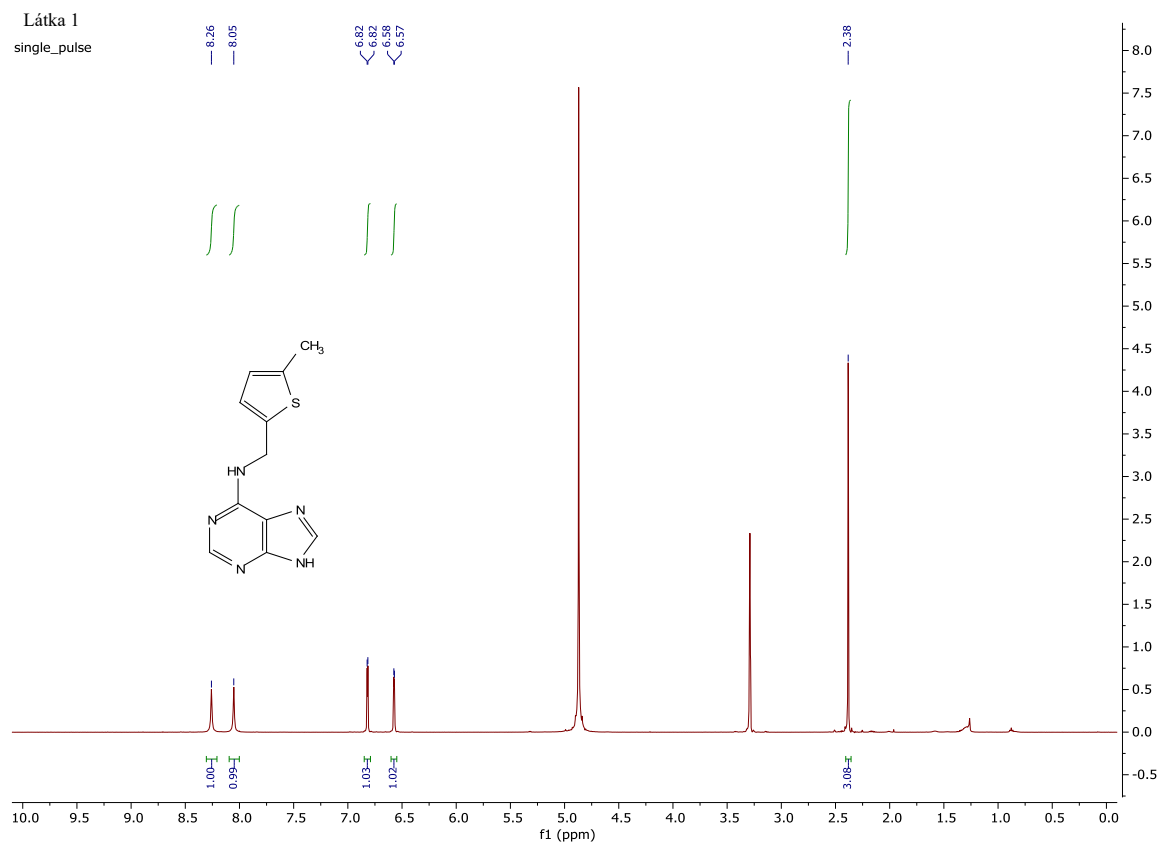
190208_02 2755 (22.953) Cm (2740:2767)

1: Scan ES+
1.40e7



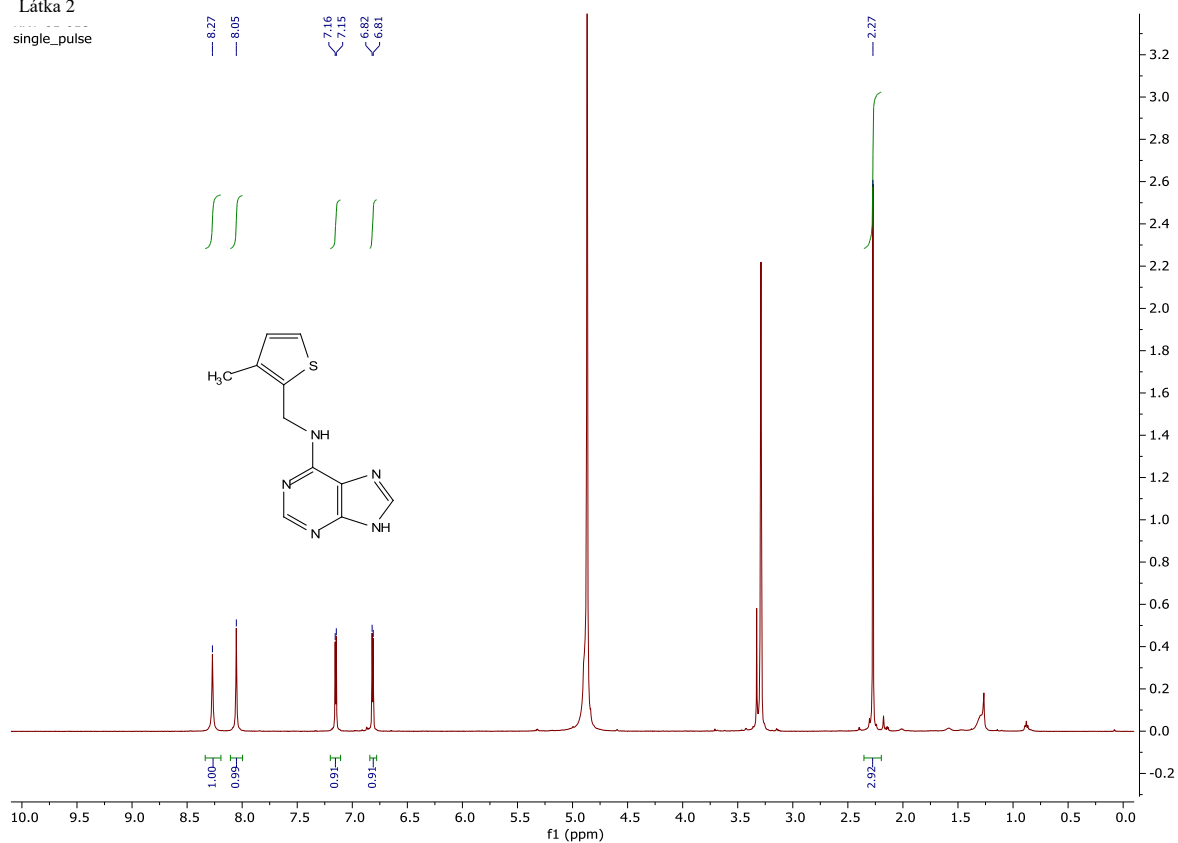
MS spektrum 8: 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka 8)

PŘÍLOHA B: ^1H NMR SPEKTRA



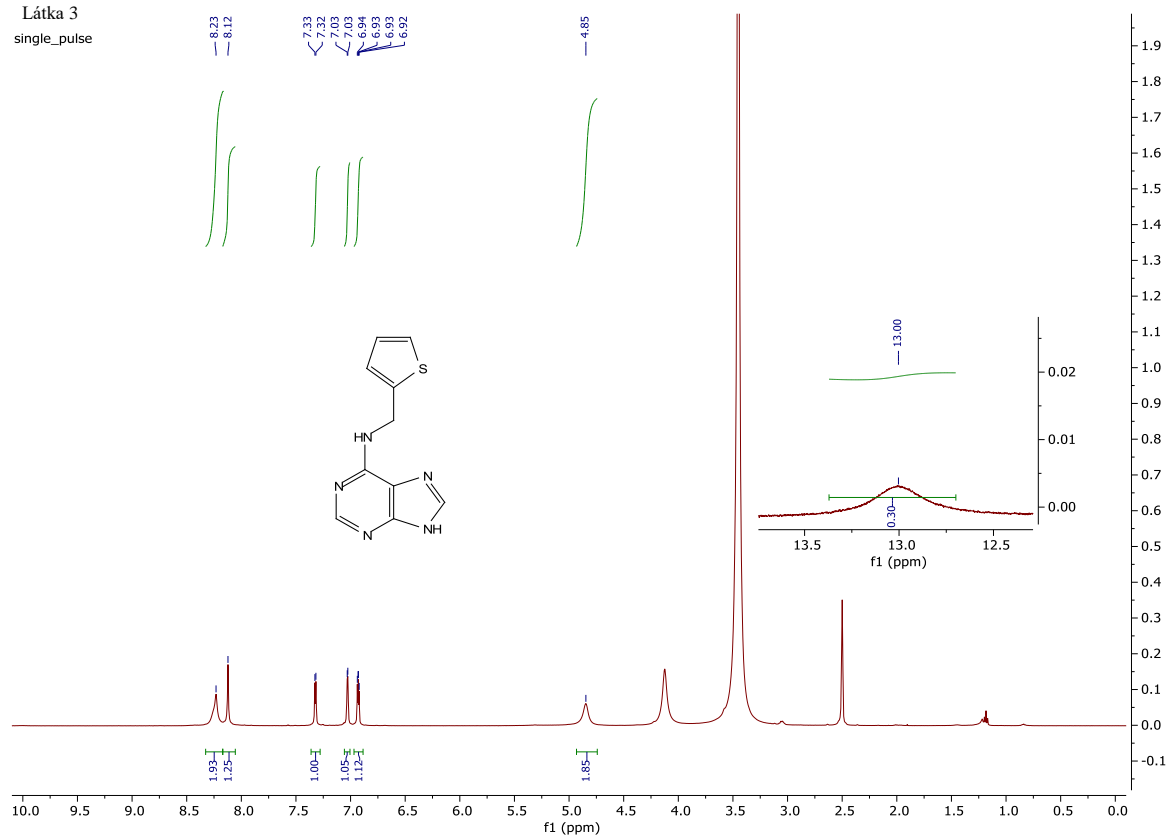
^1H NMR spektrum 1: 6-[(5-methylthiophen-2-yl)methyl]aminopurin (látka 1)

Látka 2
single_pulse



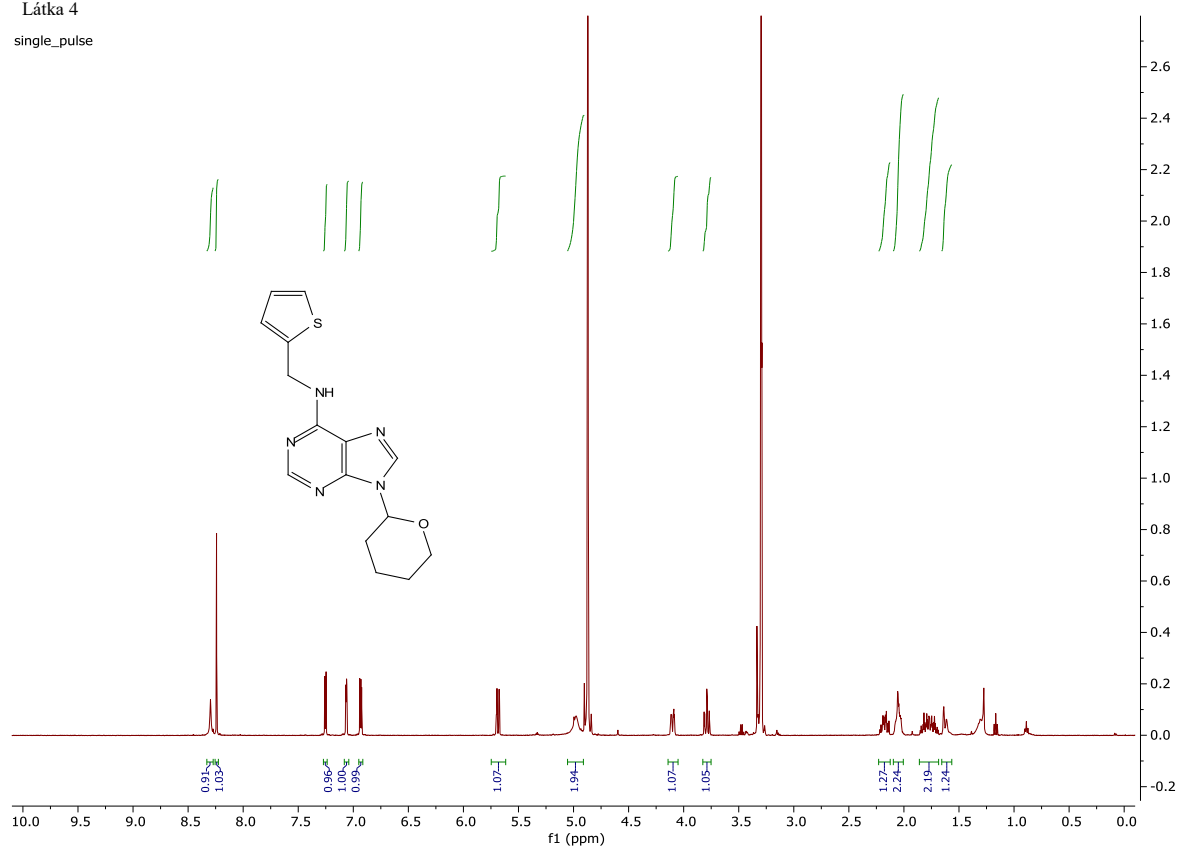
¹H NMR spektrum 2: 6-[(3-methylthiophen-2-yl)methyl]aminopurin (látka 2)

Látka 3
single_pulse



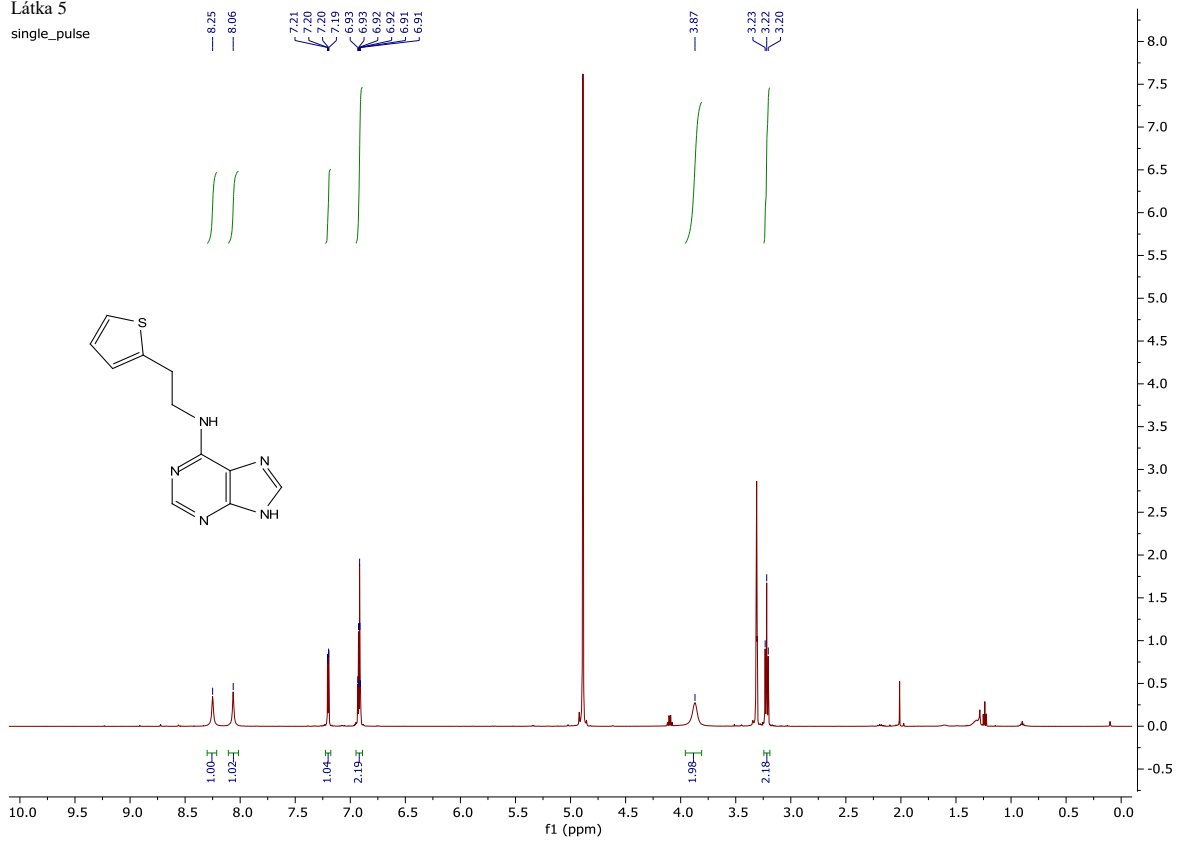
¹H NMR spektrum 3: 6-(2-thiofenmethyl)aminopurin (látka 3)

Látka 4
single_pulse



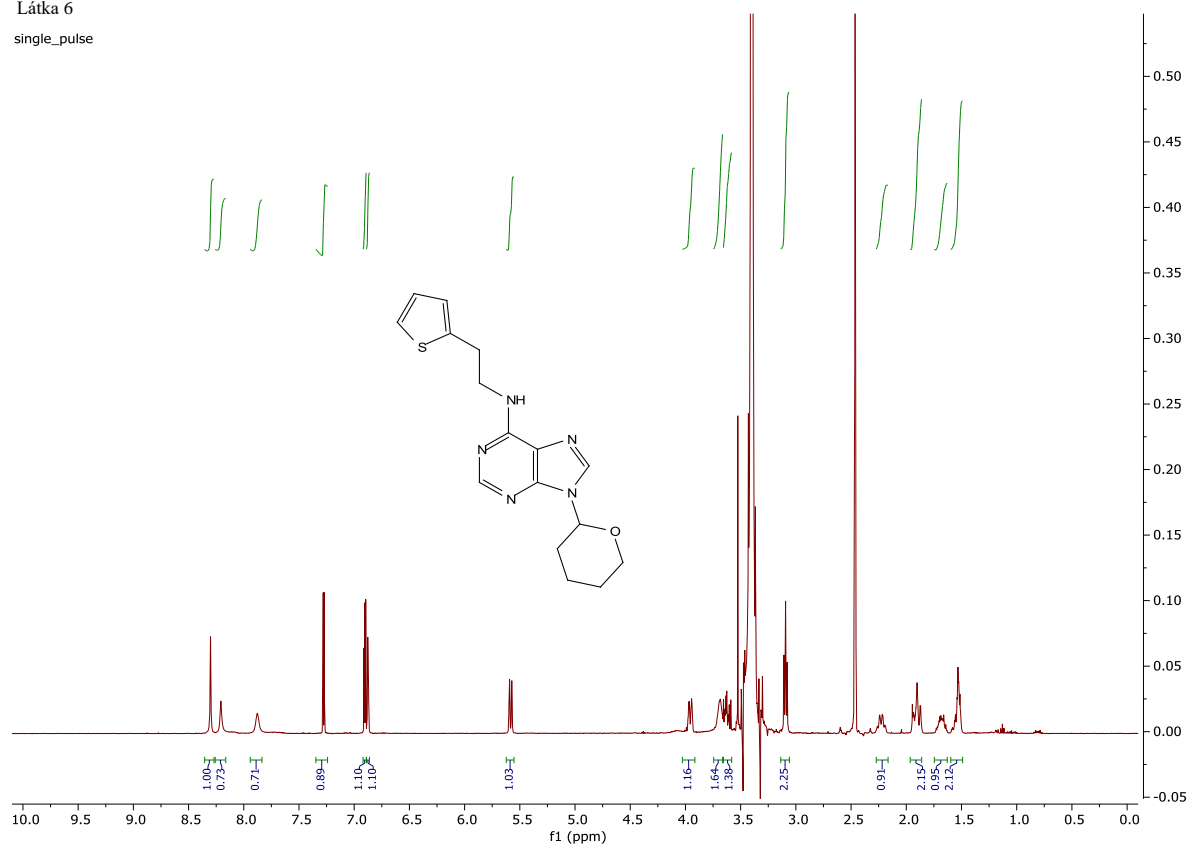
^1H NMR spektrum 4: 6-(2-thiophenmethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka 4)

Látka 5
single_pulse



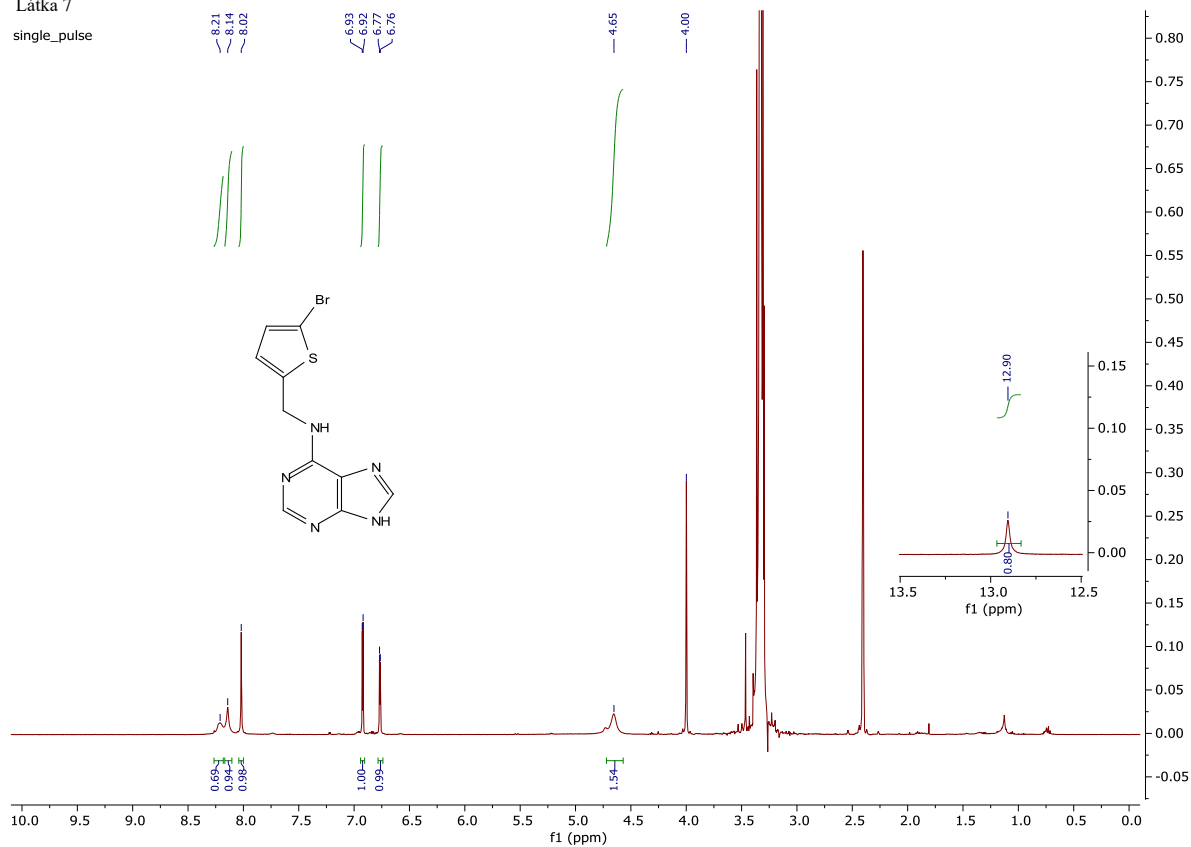
^1H NMR spektrum 5: 6-(2-thiophenethyl)aminopurin (látka 5)

Látka 6
single_pulse



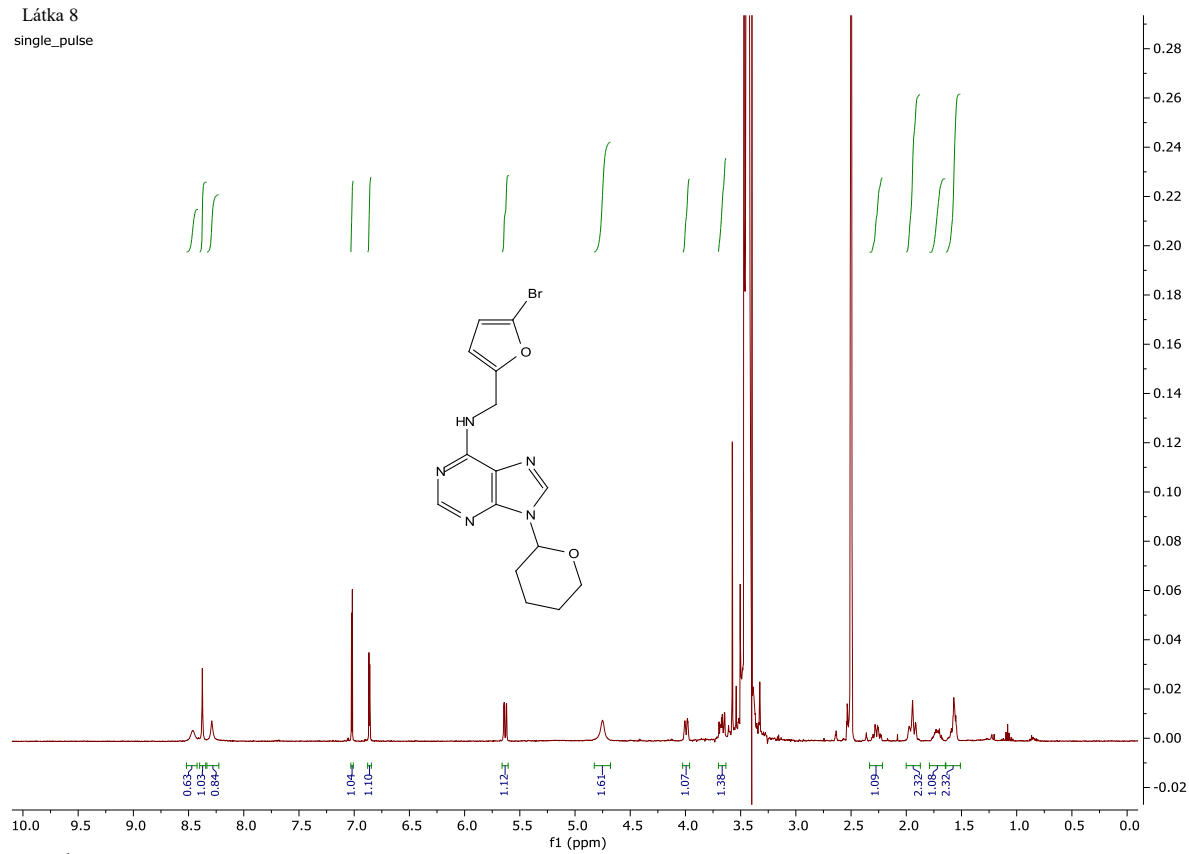
^1H NMR spektrum 6: 6-(2-thiofenethyl)-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka 6)

Látka 7
single_pulse



^1H NMR spektrum 7: 6-[(5-bromthiofen-2-yl)methyl]aminopurin (látka 7)

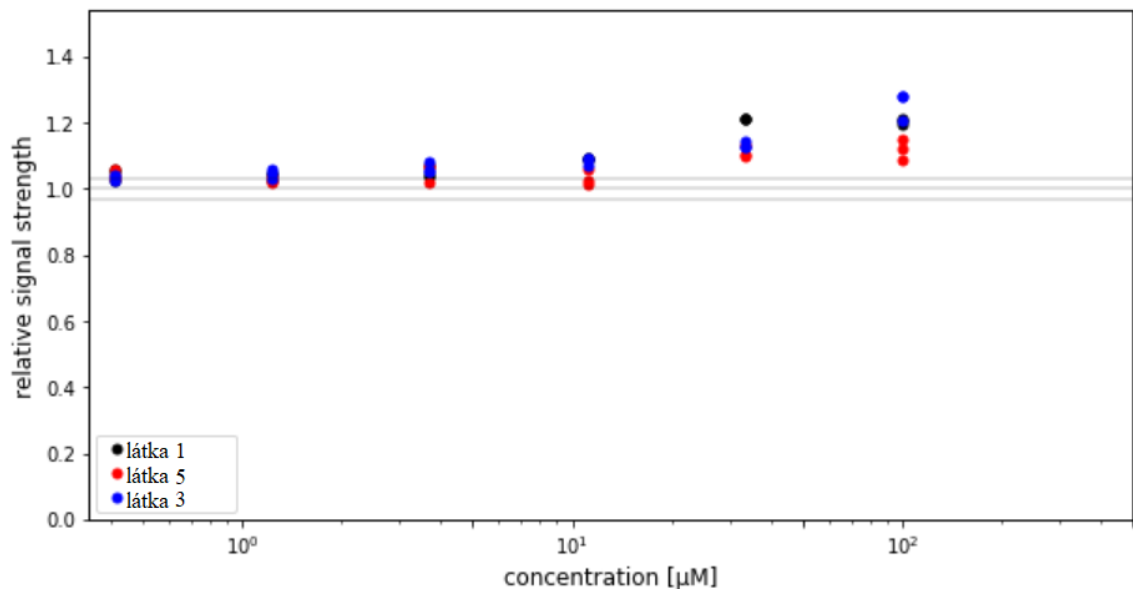
Látka 8
single_pulse



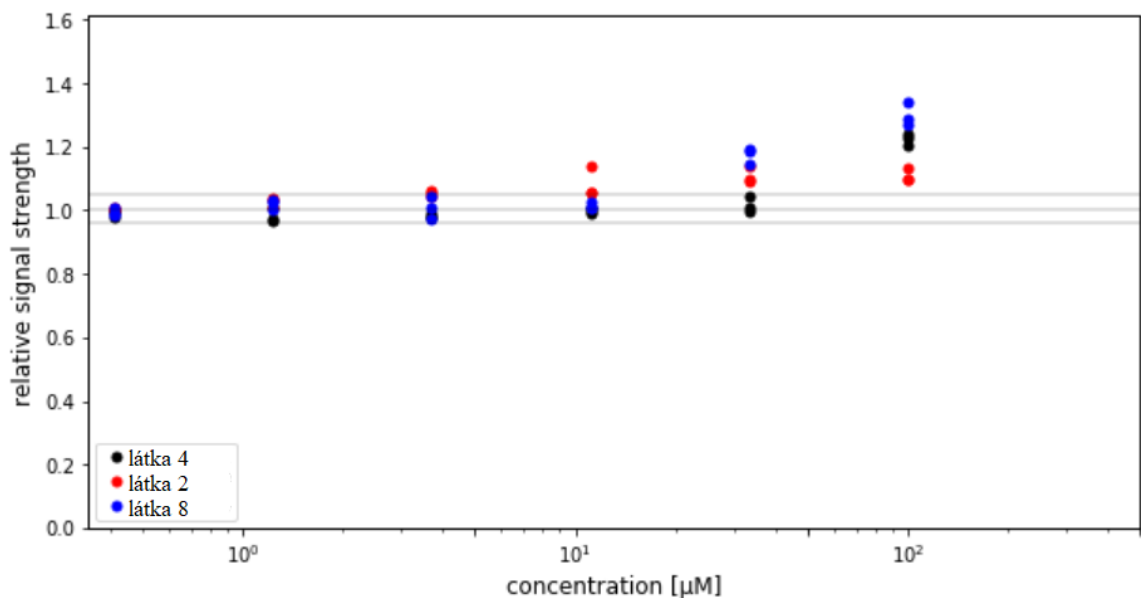
¹H NMR spektrum 8: 6-[(5-bromthiopen-2-yl)methyl]-9-(tetrahydropyran-2-yl)aminopurin (látka 8)

PŘÍLOHA C: VÝSLEDNÉ GRAFY RESAZURINOVÉHO TESTU

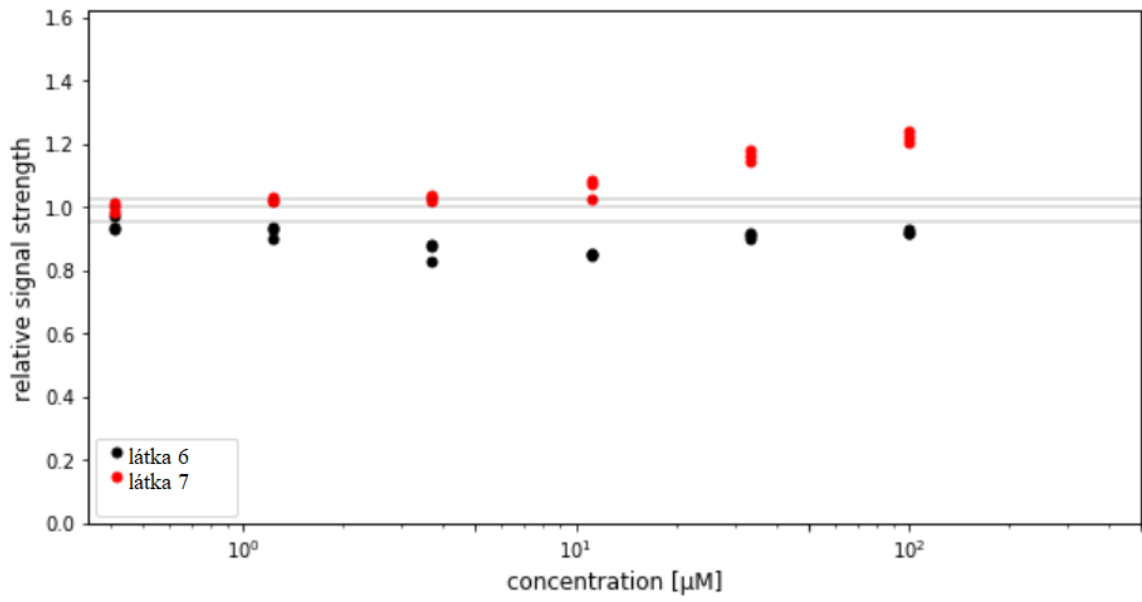
Grafy vypovídají o procentuální změně resazurinové fluorescence oproti buňkám neovlivněným (šedá horizontální čára). Hodnota relative signal strength 1.0 znamená 100% fluorescenci buněk. Triplikáty jednotlivých bodů při stejné hodnotě koncentrace μM pak charakterizují pokles či vzestup fluorescence při dané koncentraci.



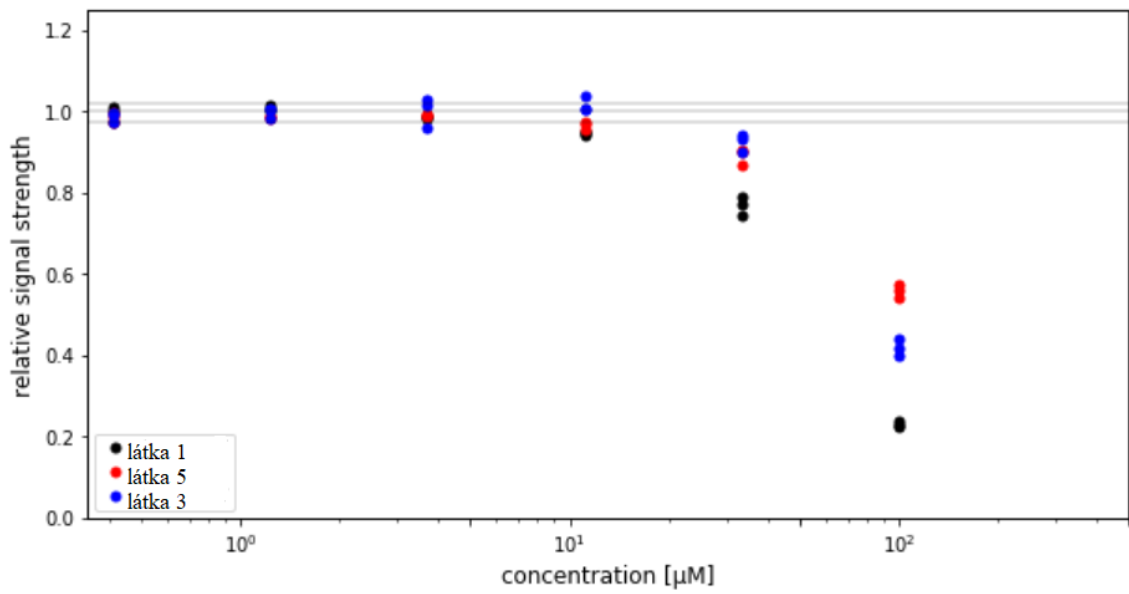
Graf 5: Buněčná linie ARPE-19, látky 1, 3 a 5



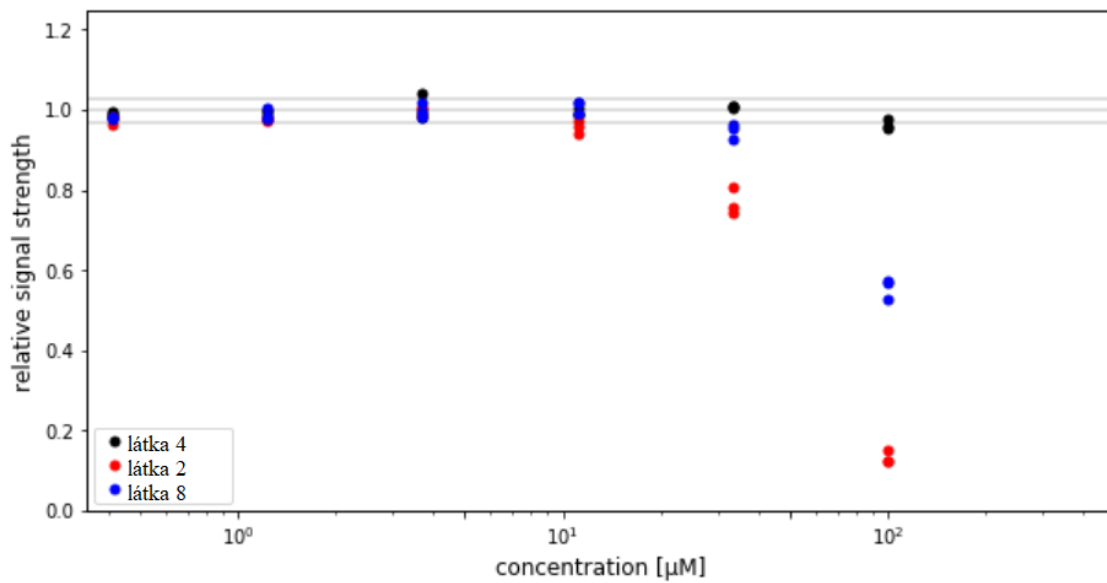
Graf 6: Buněčná linie ARPE-19, látky 2, 4 a 8



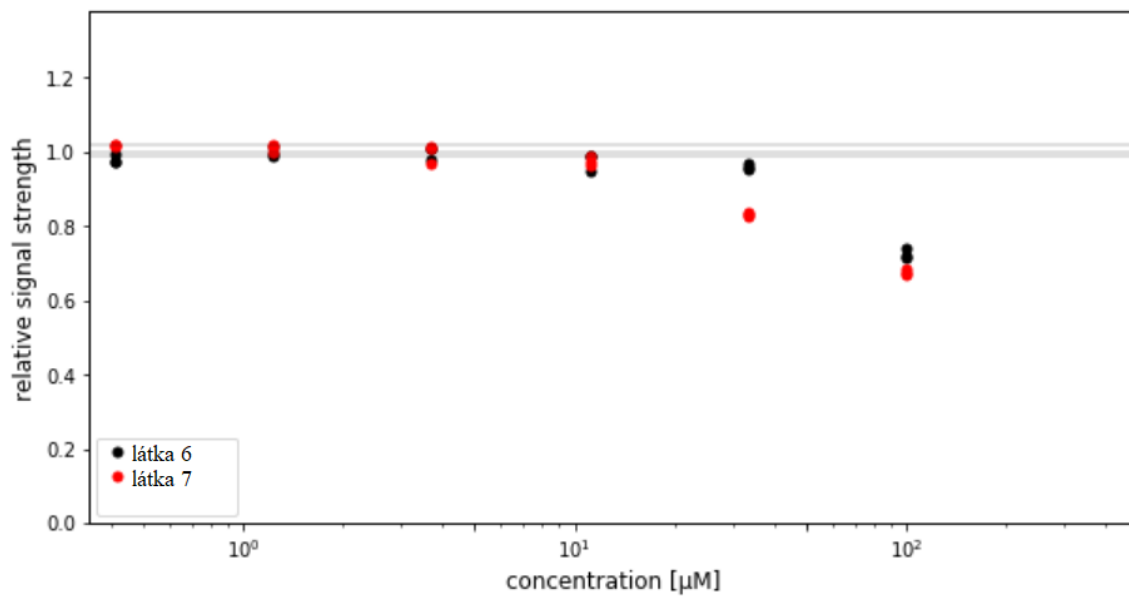
Graf 7: Buněčná linie ARPE-19, látky 6 a 7



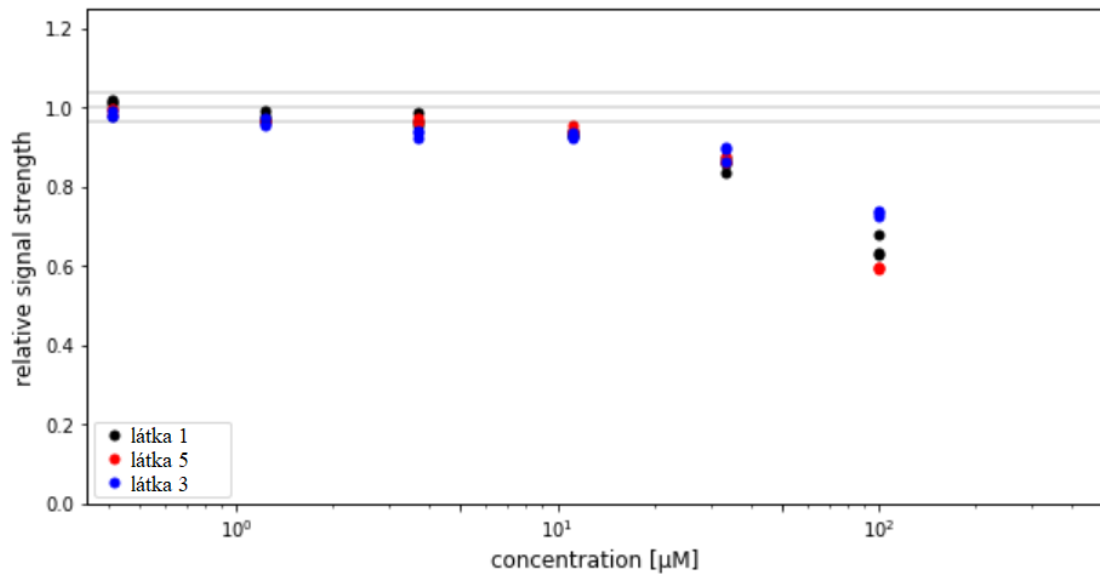
Graf 8: Buněčná linie HaCat, látky 1, 3 a 5



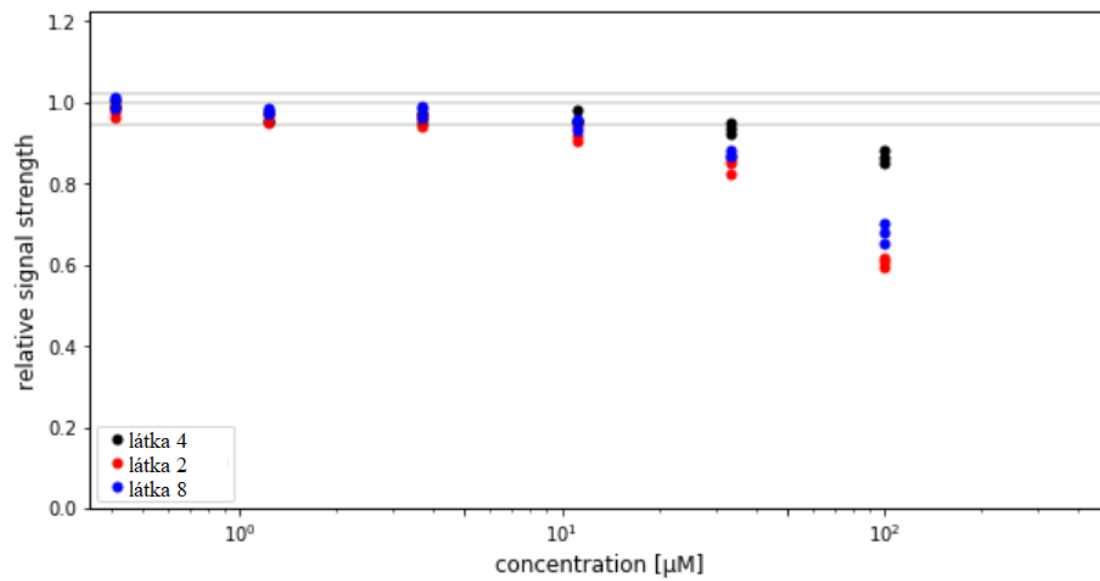
Graf 9: Buněčná linie HaCat, látky 2, 4 a 8



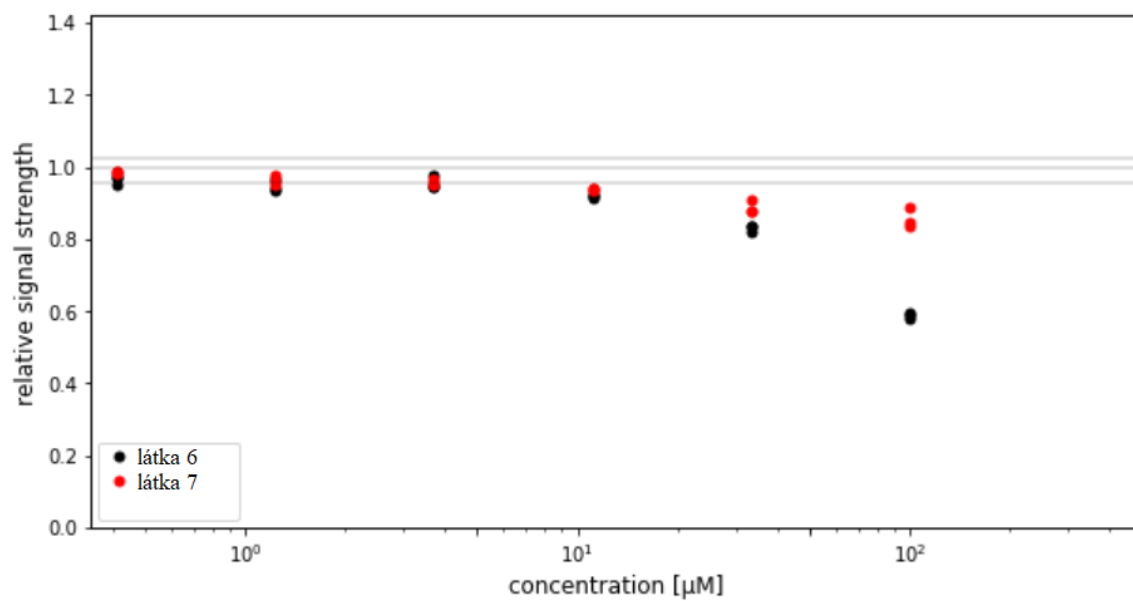
Graf 10: Buněčná linie HaCat, látky 6 a 7



Graf 11: Buněčná linie BJ, látky 1, 3 a 5



Graf 12: Buněčná linie BJ, látky 2, 4 a 8



Graf 13: Buněčná linie BJ, látky 6 a 7