

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**DERIVÁTY RHODANINU JAKO
POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.**

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Diana Kešetovičová

Ráda bych poděkovala RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za obětavou pomoc a cenné rady při vzniku této práce.

Dále děkuji Mgr. M. Chlupáčové a Mgr. J. Doleželovi za jejich ochotu pomoci při experimentální práci, paní V. Hronové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter, PharmDr. J. Jampilkovi, Ph.D. z firmy ZENTIVA za HPLC ověření čistoty produktů a doc. RNDr. V. Buchtovi, CSc. a jeho spolupracovníkům z Katedry biologických a lékařských věd za provedení antifungálních testů.

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	Antifungální vlastnosti derivátů rhodaninu	8
3.1.1	Deriváty rhodaninu inhibující mannosyltransferasu (PMT1)	9
3.1.2	Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku	12
3.2	Antibakteriální vlastnosti derivátů rhodaninu	21
3.2.1	Deriváty rhodaninu inhibující UDP-N-Acetylmuramát / L-alanin ligasu	24
3.2.2	Deriváty rhodaninu inhibující penicilin vázající proteiny (PBP)	25
3.2.3	Deriváty rhodaninu inhibující betalaktamasy tříd A a C	28
3.2.4	Deriváty rhodaninu inhibující anthraxový letální faktor (LF)	29
3.2.5	Deriváty rhodaninu inhibující transkripci s účinkem proti biofilmům <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31
3.2.6	Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku	32
3.3	Antituberkulotické vlastnosti derivátů rhodaninu	36
3.3.1	Deriváty rhodaninu zasahující do syntézy buněčné stěny <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37
3.3.2	Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku	38
3.4	Inhibiční vliv derivátů rhodaninu na rostlinný růst	40
4	METODICKÁ ČÁST	42
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
5.1	Chemická část	43
5.1.1	Příprava 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	44
5.1.2	Příprava 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	45
5.1.3	Příprava 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	47

5.1.4	Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	48
5.1.5	Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	50
5.1.6	Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	51
5.2	Hodnocení biologické aktivity	52
5.2.1	Antifungální aktivita <i>in vitro</i>	52
5.2.2	Antimykobakteriální aktivita <i>in vitro</i>	54
5.2.3	Vliv na fotosyntetické procesy	54
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR	60
8	LITERATURA	61
9	PŘÍLOHY	66

1. ÚVOD

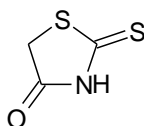
Zavedení antimikrobních látek (antibiotik a chemoterapeutik) spolu s plošnou imunizací obyvatel pomohly zdolat mnohá, do té doby letální infekční onemocnění. Tento přínos vědy měl obrovský společenský význam. Při zlepšené výživě a podmínkách bydlení lidí v rozvinutých státech se moderní terapeutické postupy odrazily ve zdvojnásobení střední délky života a vzrůstu jeho kvality u celé populace. Osvobození od letálních infekcí je však relativní, jak vyplývá z poznatků posledních desetiletí:

- Objevují se noví původci onemocnění. (Od 70. let 20. století to byli např. HIV, HCV, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni* a mnoho dalších).
- Nové léčebné metody jako chirurgické výkony, chemoterapie, katetrizace, imunosuprese nebo radioterapie významně zasahují do normálních obranných mechanismů člověka a způsobují tzv. iatrogenní nemoci.
- Snižuje se citlivost mikroorganismů k dosud používaným antimikrobním látkám [1].

Vývoj mikrobiálních kmenů rezistentních k terapii je přirozeným jevem. Souvisí se vznikem adaptačních mechanismů organismu vlivem tzv. selektivního tlaku. Mutanta se změněnou citlivostí vůči použité antimikrobní látce je zachována, zatímco mikroorganismy s původní genetickou informací hynou. Výsledkem rozšíření rezistentních mutant je návrat infekcí dříve považovaných za úspěšně zvládnutelné, příkladem jsou tuberkulóza a malárie. Rychlost vývinu adaptačních mechanismů je ovlivněna různými faktory, z nichž mnohé jsou v kompetenci člověka. Zejména racionální užívání humánních i veterinárních léčiv může postup vývoje rezistence výrazně zpomalit.

Ačkoli v rozvinutých státech nezaujímají infekční nemoci přední místa v příčinách úmrtí, představují stále větší hrozbu vzhledem k rostoucí populaci imunosuprimovaných pacientů a osob vyššího věku s častou hospitalizací a rizikem nozokomiálních nákaz [2].

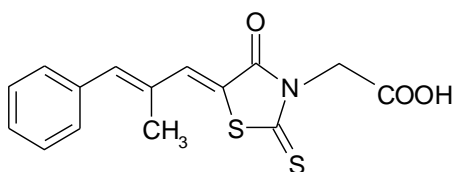
Ve snaze udržet infekční onemocnění pod kontrolou jsou neustále vyvíjeny nové účinné látky. Důraz je kladen na objevení struktur s novými mechanismy účinku, které by zasáhly současné rezistentní mikrobiální kmeny. Příkladem struktury, která zatím nebyla uplatněna v žádných známých antimikrobních léčivech, je rhodanin (**1**).



1

Rhodanin (2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on) byl poprvé syntetizován Nenckim již v roce 1877. Od té doby byla připravena celá řada jeho derivátů, jež byly pro svou schopnost tvořit koordinační sloučeniny s určitými kovovými ionty zavedeny jako velice selektivní analytická činidla v mikrogravimetrii, kolorimetrii a spektrofotometrii. [3, 4]. O biologických účincích rhodaninu se začalo uvažovat vzhledem k přítomnosti dithiokarbamátového seskupení v molekule, charakteristického pro některé antifungální sloučeniny (např. soli dimethyldithiokarbamové kyseliny). Po ověření aktivity byl rhodanin v roce 1934 patentován jako fungicid [5].

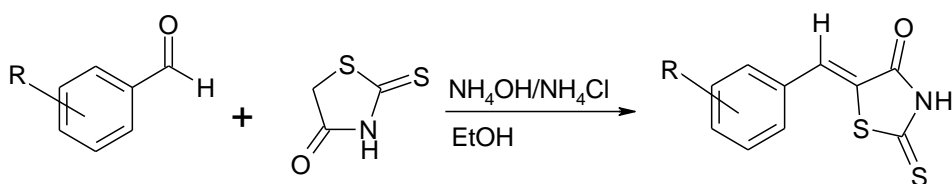
Následně byla u látek odvozených od rhodaninu zjištěna pestrá škála biologických účinků: insekticidní, herbicidní, antivirové, antibakteriální, antimykobakteriální, antifungální a antiparazitární [6 – 21]. Rhodaninové deriváty jsou známy také jako potenciální léčiva nádorových, zánětlivých a degenerativních onemocnění [22 – 28]. Nicméně v lékařské praxi zatím našel uplatnění jediný derivát rhodaninu, **epalrestát (2)**. Tento inhibitor aldosareduktasy je nyní registrován pouze v Japonsku, kde se úspěšně používá v léčbě diabetické retinopatie [29 – 30].



2

2. CÍL PRÁCE

V rámci této diplomové práce bylo navázáno na přípravu kondenzačních produktů rhodaninu s různě substituovanými benzaldehydy prováděný na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové následujícím postupem [31]:



Na základě rešerše bylo zjištěno, že benzylidengerhodaniny vykazují široké spektrum biologických vlastností. Vzhledem ke schopnosti molekuly rhodaninu koordinačně vázat atom kovu, jsou tyto deriváty potenciálními ligandy metaloenzymů. Vhodnou substitucí benzenového jádra lze ovlivnit jejich farmakokinetické parametry a usnadnit tak transport do místa působení [32].

Zavedení nitroskupiny do molekuly není provázeno jen zvýšením lipofility. Projeví se také její vlastní biocidní potenciál, založený na vzniku reaktivních redukčních produktů, jako je tomu v případě antimikrobních léčiv ze skupiny derivátů nitrofuranu a nitroimidazolu [33].

Mým úkolem bylo připravit *ortho*-, *meta*- a *para*-nitrobenzylidenderiváty rhodaninu a analogické deriváty 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu a předat je k testování antimikrobní aktivity a jejich inhibičního vlivu na fotosyntetické procesy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Jak již bylo zmíněno, paleta biologických účinků derivátů rhodaninu je velmi pestrá. Rešerše byla proto zaměřena na jejich antimikrobní aktivitu (antifungální a antibakteriální) a schopnost inhibice fotosyntézy, protože právě tyto účinky jsou hodnoceny na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

3.1 Antifungální vlastnosti derivátů rhodaninu

Mykotické infekce se podle Mezinárodní klasifikace nemocí – IDC [34] člení do následujících skupin:

- B 35 Dermatofytóza
- B 36 Jiné povrchové mykózy
- B 37 Kandidóza
- B 38 Kokcidioidomykóza
- B 39 Histoplasmóza
- B 40 Blastomykóza
- B 41 Parakokcidioidomykóza
- B 42 Sporotrichóza
- B 43 Chromomykóza
- B 44 Aspergilóza
- B 45 Kryptokokóza
- B 46 Zygomykóza
- B 47 Mycetom
- B 48 Jiné mykózy nezařazené jinde
- B 49 Neurčená mykóza

Ve světě nejrozšířenější jsou povrchové mykózy (B 35, B 36) postihující kůži, vlasy, nehty a sliznice. Jejich původci jsou nejčastěji dermatofyty (druhy rodu *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) nebo kvasinky (*Candida*,

Trichosporon, *Malassezia*, *Pityrosporum* aj.), výjimečně plísně (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* aj.). V tropech a subtropích jsou běžné i některé podkožní mykózy (B 42, B 43, B 47), které zasahují kůži, podkoží a kost (příkladem patogenů jsou plísně rodu *Streptomyces* nebo dimorfní houby rodu *Sporothrix*). Dříve poměrně vzácné systémové mykózy (B 37 – B 41, B 44 – B 46, B 48 – 49) dnes ohrožují stále více pacientů v důsledku nárůstu populace imunodeficientních osob (pacienti s AIDS, hematologickými malignitami, po transplantaci orgánů, apod.) a rozšířením multirezistentních nozokomiálních infekcí na jednotkách intenzivní péče. Příkladem pravých i oportunních systémových patogenů jsou dimorfní houby rodu *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*; kvasinky rodu *Candida*, *Cryptococcus*, plísně rodu *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* aj [1].

Přes značný pokrok v antifungální terapii se v praxi používá jen úzký okruh systémových léčiv. Důvodem je eukaryotní struktura fungální buňky a tedy příliš malý prostor k vymezení selektivní toxicity. Nejpoužívanější antifungální látky jsou inhibitory syntézy ergosterolu, jež je specifickou složkou cytoplazmatické membrány hub. Tímto mechanismem působí například polyeny a azoly. Azoly jsou pouze fungistatické a jejich nevýhodou je vznik rezistence při dlouhodobém podávání. Jediná dostupná fungicidní léčiva jsou polyeny, jejichž použití je však omezeno vysokou toxicitou (částečně ji lze snížit například úpravou amfotericinu B do liposomální lékové formy). Potenciálním cílem nových léčiv je především buněčná stěna, která lidským buňkám chybí. Z této skupiny látek byl zatím do klinické praxe uveden jen kaspofungin, zástupce echinokandinů [33, 35].

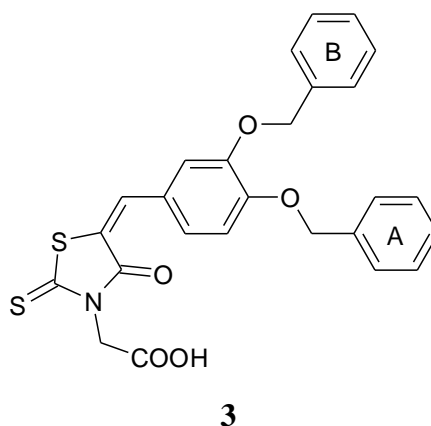
Ve fázi výzkumu potenciálních léčiv jsou i deriváty rhodaninu. Některé z nich působí fungicidně a mechanismus jejich účinku je většinou teprve zkoumán. Jsou zde však zahrnuty i látky s novým mechanismem inhibice fungální buněčné stěny.

3.1.1 Deriváty rhodaninu inhibující mannosyltransferasu 1 (PMT1)

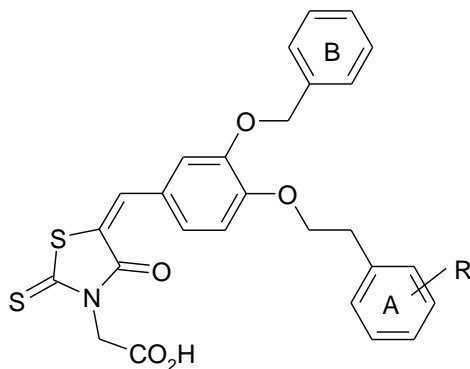
Enzymy z rodiny mannosyltransferas katalyzují klíčový krok v biosyntéze mannoproteinů, jež jsou důležitou součástí buněčné stěny mnoha druhů kvasinek a hub, neboť umožňují adhezi k hostitelské buňce. Mannosyltransferasy lokalizované v endoplazmatickém retikulu (PMT1 aj.) jsou zodpovědné za přenos

počáteční mannosové jednotky z dolicholfosfo- β -D-mannosy na serinové a threoninové zbytky. Jiné mannosyltransferasy lokalizované v Golgiho aparátu dodávají další mannosové jednotky. Bylo zjištěno, že delece obou kopií PMT1 genů z druhu *Candida albicans* vede ke ztrátě virulence kvasinky. Taková mutanta nemá schopnost tvořit kolonie při negativní dusíkové bilanci a je rovněž citlivější vůči poškození buněčné stěny. Ztráta virulence u této mutanty a absence obdobné enzymové aktivity u člověka činí z mannosyltransferas vhodný cíl terapeutického zásahu.

Jako první inhibitory PMT1 byly popsány substituované **benzylidenderiváty rhodanin-3-octové kyseliny**. Jejich aktivita byla testována jednak na samotném enzymu, jednak na buněčných kulturách *Candida albicans*. Zpočátku poměrně slabá aktivita s IC_{50} kolem 50 μ M byla významně zvýšena v případě 3,4-bisbenzyloxy-substituce centrálního aromatického jádra (**3**).

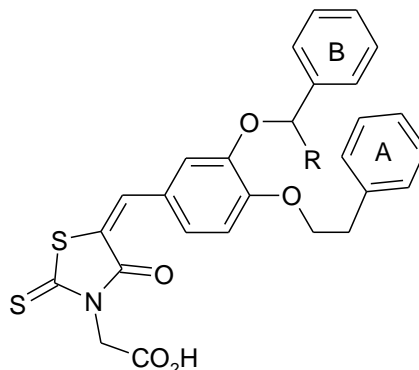


Protože náhrada pyridinyloxy skupinou v poloze 3 nebo 4 na tomto jádře vedla k neaktivním sloučeninám, byl dále zkoumán efekt substituce na každém z benzenových kruhů. Zatímco substituce obou kruhů A i B nebo samotného kruhu B vedla k poklesu či ztrátě aktivity, substituce kruhu A, zejména chlorem v poloze *para*, zvyšovala inhibiční efekt. Prodloužení spojovacího řetězce mezi kyslíkem v *para* poloze centrálního aromatického jádra a kruhem A o jeden uhlík zvýšilo aktivitu vůči *Candida albicans*. Deriváty s 4-fenylethoxy skupinou byly následně substituovány na kruhu A (**4**).



4: R = H, 4-Cl, 4-SO₂CH₃, 3-CF₃, 4-OCF₃ aj.

Lipofilní substituenty jako chlor nebo fluor v poloze *para* poskytly deriváty výrazně účinnější vůči *C. albicans* (IC₅₀ = 0,05 μM). Vyšší aktivita proti intaktním buňkám je patrně způsobena inhibicí několika subtypů PMT nebo zvýšenou penetrací molekuly membránou endoplazmatického retikula. Další dramatický nárůst aktivity vůči enzymu i buněčným kulturám byl pozorován při rozvětvení řetězců spojujících etherové kyslíky s kruhy A a B (**5**).



5: R = CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂ aj.

Nejvýhodnější bylo zavedení methylu, případně jiných lipofilních skupin. Významně se projevil i vliv absolutní konfigurace: (*S*)-methylderivát byl pětikrát účinnější než (*R*)-methylderivát. IC₅₀ se u těchto látek pohybovala v již řádu nmol/l. Přítomnost karboxymethylové skupiny na dusíku rhodaninového kruhu byla pro inhibiční aktivitu nezbytná, neboť deriváty s jinými *N*-substituenty (karboxylovou, esterovou, amidovou skupinou) byly neúčinné [20].

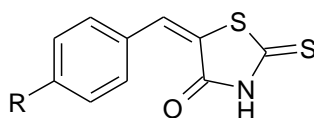
3.1.2 Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku

Sloučenin tohoto typu byla publikována celá řada. Pro větší přehlednost jsou v následující části rozděleny dle charakteru syntézy.

a) Kondenzační produkty rhodaninu s aromatickými aldehydy

Deriváty benzyliđenrhodaninu byly testovány na inhibiční aktivitu proti růstu kvasinek *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, plísní rodu *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*) a dermatofytů *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes*.

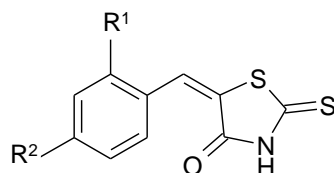
Získané hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly doplněny výsledky z výpočetních studií polarity a lipofility molekul. Porovnávacími antimykotiky byly amfotericin B, terbinafin a ketokonazol, jejichž hodnoty MIC však byly desetkrát nižší než hodnoty nejúčinnějších testovaných látek. Sloučeniny zahrnuté ve studii inhibovaly výrazněji jen kvasinky a dermatofyty. Pro aktivitu byla nezbytná přítomnost benzenového kruhu s elektronakceptorovými substituenty (fluor, trifluormethyl) v poloze *para* nebo *ortho*. Zavedení elektrondonorových skupin (methyl, methoxy, oxymethylenoxy), či náhrada benzenu pyridinem vedly k neúčinným sloučeninám.



6: R = F, CF₃

Struktura látek s nejvyšším inhibičním účinkem proti kvasinkám je znázorněna vzorcem **6**. Benzyliđenderiváty substituované fluorem nebo trifluormethylem v poloze *para* byly podrobeny dalšímu testování na klinických izolátech *Candida albicans* i *non-albicans* druhů (*C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. lusitaniae*, *C. colliculosa*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*) a *Cryptococcus neoformans*. Uvedené kvasinky byly vybrány pro svou důležitou roli v epidemiologii nozokomiálních infekcí. Zatímco kandidózy jsou nejčastější příčinou oportunních infekcí cévního systému, kryptokokózy způsobují život ohrožující komplikace

u pacientů po transplantaci orgánů. Obě sloučeniny působily na všechny uvedené klinické izoláty fungicidně se středními hodnotami minimální fungicidní koncentrace mezi 11,7 a 40,17 $\mu\text{g/ml}$.

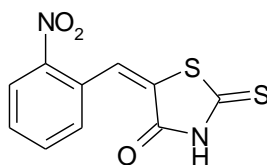


7: $R^1 = \text{H, F, CF}_3$; $R^2 = \text{H, F, CF}_3$

Vzorec **7** ukazuje strukturu sloučenin nejlépe účinných proti dermatofytům. 5-Benzylidenrhodanin a jeho deriváty substituované fluorem nebo trifluormethylem v poloze *para* nebo *ortho* byly dále testovány na klinických izolátech z druhů *Trichophyton mentagrophytes* a *Trichophyton rubrum*. Právě tyto druhy hub jsou zodpovědné za většinu chronických rekurentních dermatofytóz (tinea unguium, tinea manuum, tinea pedis). Hodnoty minimální inhibiční koncentrace všech pěti sloučenin byly překvapivě nízké v rozmezí 1,17 – 3,57 $\mu\text{g/ml}$.

Obecně se nejúčinnější deriváty vyznačovaly spíše hydrofobním charakterem umožňujícím snazší penetraci membránami fungální buňky. Studie jejich mechanismu působení neprokázaly vazbu na ergosterol, ani jiné poškození membrány, neboť nebyla pozorována lýza buněk při koncentracích dosahujících téměř desetinásobku jejich minimální fungicidní koncentrace [19].

Samostatná studie byla provedena pro *o*-nitrobenzylidenrhodanin (**8**).

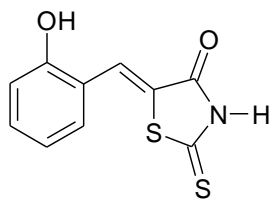


8

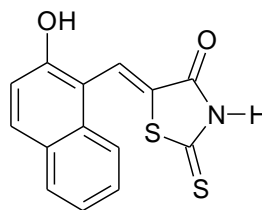
Jeho antifungální vlastnosti byly hodnoceny na následujících druzích patogenních hub: *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium longisporum*, *Sporotrichum thermophile*, *Trichoderma reesei* a *Trichoderma viridae*. U všech

testovaných hub s výjimkou *Sporotrichum thermophile* vykázal *o*-nitrobenzylidenrhodanin vyšší inhibiční aktivitu než aureofungin, který sloužil jako pozitivní kontrola. Inhibiční zóny naměřené při použití roztoku *o*-nitrobenzylidenrhodaninu v koncentraci 1000 ppm byly buďto shodné, nebo větší než zóny inhibice vyvolané aureofunginem v koncentraci 2000 ppm. Předpokládá se, že antimikrobní vlastnosti této sloučeniny by mohly být spojeny právě s přítomností nitroskupiny [12].

5-Salicylidenrhodanin (9) a **5-[(2-hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]-rhodanin (10)** působily inhibiči růstu hub *Sporothrix schenckii*, *Rhizopus species* a *Aspergillus fumigatus*. Vůči posledně jmenovanému druhu byl inhibiční účinek výraznější. Silnějším inhibítorem byl 5-[(2-hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]rhodanin [36].

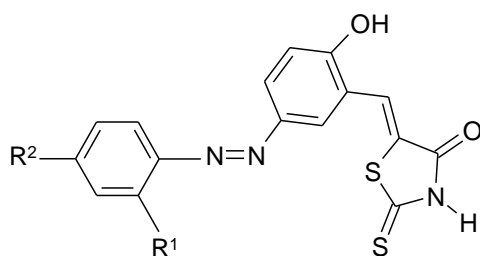


9



10

V návaznosti na předcházející studii byla porovnávána inhibiční aktivita **5-salicylidenrhodaninu** a jeho **arylazoderivátů (11)** vůči stejným fungálním druhům, tj. *Sporothrix schenckii*, *Rhizopus species* a *Aspergillus fumigatus*.



$R^1 = \text{H, CH}_3, \text{OCH}_3;$

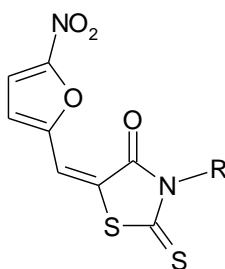
$R^2 = \text{H, CH}_3, \text{OCH}_3$

11

Lepší antifungální aktivitu než nesubstituovaný 5-salicylidenrhodanin vykázal 5-(5'-fenzylazosalicyliden)rhodanin (MIC 25 µg/ml). Naopak substituce vodíku na fenyly methylem nebo methoxyskupinou poskytla nejméně aktivní deriváty.

Deriváty 5-salicylidenrhodaninu projevily kromě antifungálních též dobré antibakteriální, antimykobakteriální a insekticidní vlastnosti. Zajímavé je, že při testování insekticidního účinku proti druhům rodu *Anopheles* a *Culex* byly methoxy- a methylderiváty naopak účinnější [37].

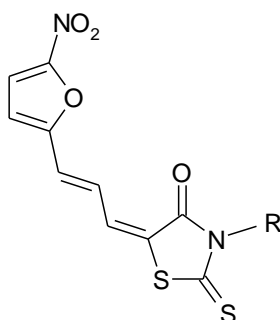
5-(5-Nitrofurfuryliden)rhodanin (12a) vykázal *in vitro* inhibiční aktivitu proti kvasince *Candida albicans*.



12a : R = H

12b: R = CH₃, C₂H₅, CH₂CH=CH₂, C₂H₄OH, N(CH₃)₂, C₆H₅,
p-Cl-C₆H₄CH₂

N-alkylace tohoto derivátu vedla ke sloučeninám obecného vzorce **12b** aktivních při nižších koncentracích než amfotericin B (tj. MIC ≤ 1,5 μg/ml). Účinné byly jak relativně nepolární deriváty substituované v poloze 3 methyl-, propyl-, allyl- a fenylskupinou, tak polárnější 3-(2-hydroxyethyl)- a 3-(*N,N*-dimethylamino)deriváty. Vliv substituentu na dusíku tedy ještě není zcela objasněn.



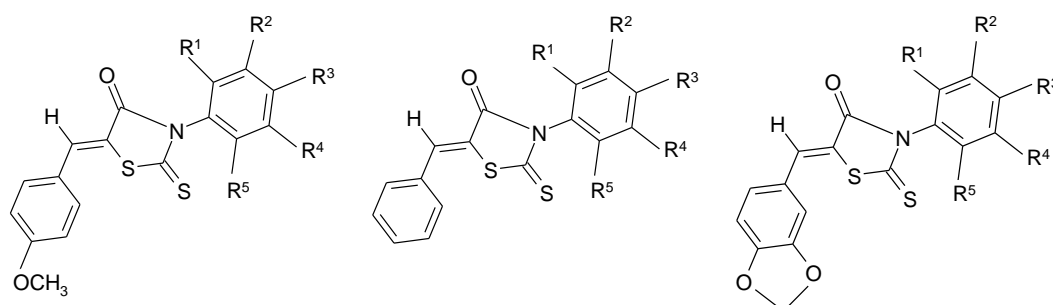
13 : R = H, CH₃

V případě **5-[3-(5-nitrofuran-2-yl)allyliden]rhodaninu (13)**, účinného proti *Candida albicans* při MIC 3,1 μg/ml, vedla *N*-methylace ke ztrátě aktivity (MIC > 100 μg/ml). Naopak u analogických derivátů thiazolidin-2,4-dionu substituce na

dusíku inhibiční aktivitu výrazně zvýšila. Nejsilnějším inhibitorem z celé série testovaných látek byl 3-(*p*-chlorbenzyl)-5-(5-nitrofurfuryliden)-thiazolidin-2,4-dion s MIC = 0,15 µg/ml.

Při hodnocení aktivity *in vivo* na myších infikovaných *Candida albicans* byl účinný pouze 3-methyl-5-(5-nitrofurfuryliden)rhodanin při denním podávání v dávce 100 mg/kg. Uvedené deriváty 5-(5-nitrofurfuryliden)rhodaninu, 5-(5-nitrofurfuryliden)thiazolidin-2,4-dionu a jejich vinylogy vykazaly kromě antifungální aktivity též antibakteriální a antiprotozoální vlastnosti. Přítomnost nitroskupiny byla pro jejich antimikrobní aktivitu nezbytná [38].

V případě **5-substituovaných 3-(polynitrofenyl)derivátů rhodaninu** odvozených od *p*-methoxybenzaldehydu (**14**), benzaldehydu (**15**) a 3,4-methylenedioxybenzaldehydu (**16**) byla testována antifungální aktivita proti druhům: *Helminthosporium sativum*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger* a *Fusarium oxysporum*.



14

15

16

$R^1 = \text{H}, \text{NO}_2, \text{Cl}, \text{Br}, \text{CH}_3$; $R^2 = \text{H}, \text{Cl}, \text{CH}_3$; $R^3 = \text{H}, \text{Cl}, \text{NO}_2, \text{CH}_3$; $R^4 = \text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{CH}_3$; $R^5 = \text{H}, \text{NO}_2$

Ze vztahu struktury a aktivity lze vyvodit následující požadavky na substituci fenylu vázaného v poloze 3 rhodaninového kruhu:

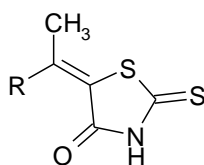
- Aktivitu zvyšovala přítomnost halogenu (chlor, brom) nebo nitroskupiny v pozici *ortho* i *para*, či methylu v poloze *para*. Naopak zavedení halogenu do pozice *meta* nebo methylu do polohy *ortho* či

meta vedlo k poklesu účinnosti proti všem testovaným fungálním druhům.

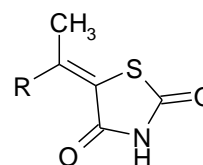
- Nejúčinnější byly deriváty kondenzované v poloze 5 rhodaninového kruhu *p*-methoxybenzaldehydem – 3-(2,4,6-trinitrofenyl)-5-(4-methoxybenzyliden)rhodanin a 3-(2-chlor-4,6-dinitrofenyl)-5-(4-methoxybenzyliden)rhodanin – které při koncentraci 10 ppm inhibovaly alespoň jeden z testovaných druhů hub z více než padesáti procent [39].

b) Kondenzační produkty rhodaninu s ketony

Některé z **derivátů 5-(1-methylalkyliden)rhodaninu (17)** vykázaly antifungální účinek proti plísní *Aspergillus niger*. Výsledky jejich aktivity byly porovnány s účinkem analogických derivátů thiazolidin-2,4-dionu (**18**).



17



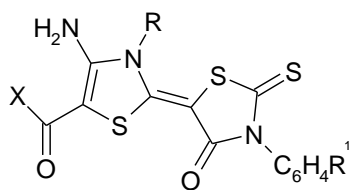
18

R = methyl, ethyl, propyl, butyl, isobutyl, amyl, hexyl, buten-3-yl

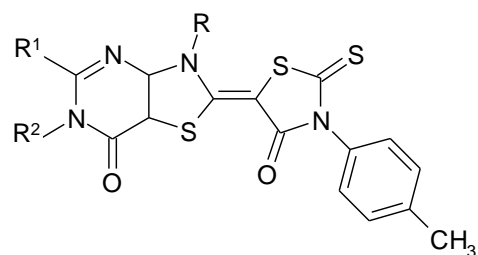
V obou sériích byly nalezeny sloučeniny, jež kompletně inhibovaly růst *Aspergillus niger* při koncentraci 100 ppm. Podstatný vliv na aktivitu měl počet atomů uhlíku vedlejšího alkylového řetězce. V sérii derivátů rhodaninu byly nejúčinnější látky, kde R zastupoval ethyl nebo propyl, zatímco sloučeniny odvozené od thiazolidin-2,4-dionu byly aktivnější při alkyly se čtyřmi až pěti uhlíky. Rozvětvení alkyly nebo přítomnost násobné vazby byly z hlediska změny antifungálního účinku méně významné [40].

c) Kondenzační produkty rhodaninu s deriváty thiazolu a thiazolopyrimidinu

Vzhledem ke známému antimikrobnímu potenciálu rhodaninů, dithiazolů a thiazolo[4,5]pyrimidinů byly připraveny jejich kondenzační produkty **19** a **20**.



19: R = CH₂CH=CH₂, C₆H₅;
R¹ = *p*-CH₃, *p*-Cl; X = NH₂, OC₂H₅

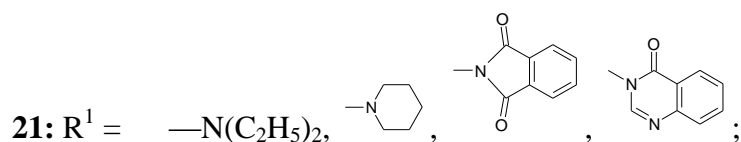
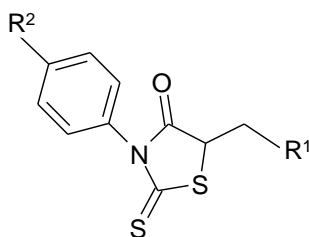


20: R = CH₂CH=CH₂, C₆H₅, *m*-CH₃-C₆H₄; R¹ = H, CH₃; R² = H, CH₃,
N=CH-*p*-OCH₃-C₆H₄

Tyto látky působily inhibiči růstu hub *Aspergillus niger* a *Penicillium sp.* (s inhibičními zónami 20 – 38 mm a MIC < 50 – < 25 µg/ml). Vůči kvasince *Candida albicans* byly neaktivní. Nejúčinnější látky byly jen pětikrát slabšími inhibitory než porovnávací antimykotikum klotrimazol. Přítomnost alkyly v pozici 3 thiazolopyrimidinového kruhu byla vhodnější než substituce arylem pro účinek na *Penicillium sp.*, zatímco zavedení arylidenaminoskupiny do pozice 6 téhož kruhu zvýšilo aktivitu proti *Aspergillus niger* [11].

d) Kondenzační produkty derivátů rhodaninu s aminy

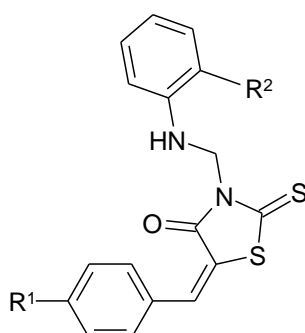
U derivátů **3-aryl-5-aminomethylrhodaninu (21)**, připravených Mannichovou kondenzací 3-arylrhodaninu s formaldehydem a aminem (diethylaminem, piperidinem, morfolinem, ftalimidem a chinazolonom), byla hodnocena antifungální aktivita vůči *Curvularia species*.



R² = C₆H₅, *p*-CH₃-C₆H₄, *m*-CH₃-C₆H₄, *o*-CH₃-C₆H₄, *p*-Cl-C₆H₄, *α*-naftyl, *β*-naftyl, *o*-OCH₃-C₆H₄, *p*-OCH₃-C₆H₄, *p*-NO₂-C₆H₄

Všechny testované sloučeniny byly slabými inhibitory (při koncentraci 500 µg/ml se inhibice pohybovala v rozmezí 47,2 – 74,1 %). Ze substituentů v pozici *para* na fenylu vázaném v poloze 3 rhodaninového kruhu byly pro aktivitu nejvýhodnější naftyl, methoxyskupina nebo chlor [41].

Jiné sloučeniny připravené Mannichovou reakcí, **deriváty 3-arylaminomethyl-5-benzylidenrhodaninu (22)**, vykázaly mírný inhibiční účinek na růst hub: *Fusarium roseum*, *Aspergillus niger* a *Helminthosporium species*.



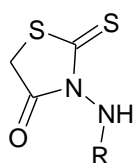
22 : R¹ = 4-methoxy, 4-(*N,N*-dimethylamino), 3,4-dimethoxy;

R² = karboxyl, methyl, chlor, methoxy, nitro a karboxymethyl

V každé ze tří řad derivátů rozdělených podle typu substituentu R¹, se vyskytly aktivní sloučeniny proti všem testovaným fungálním druhům. Nejúčinnější byly látky, kde R² zastupoval elektronakceptorový substituent (nitroskupina, halogen). Tyto sloučeniny vykázaly též antibakteriální a anticholinesterasové vlastnosti [42].

e) Deriváty odvozené substitucí na dusíku rhodaninového kruhu

Antifungální aktivita **aminorhodaninu (23)** byla testována na kulturách *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Hansenula anomala*, *Penicillium expansum*, *Fusarium oxysporum*.



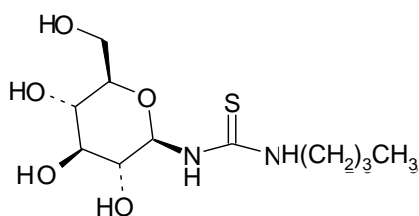
23: R = H

24: R = COCH₃

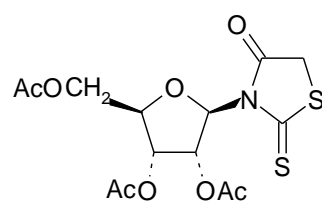
25: R = COC₆H₅

Inhibice růstu byla zaznamenána u všech uvedených druhů kromě *Fusarium oxysporum*. Zvláště výrazná byla aktivita vůči *Aspergillus niger* (MIC = 6,25 µg/ml). Účinnost aminorhodaninu zde byla srovnatelná s inhibiční aktivitou 5-arylalkylidenderivátů rhodaninu. Ostatní testované 3-substituované deriváty, ***N*-acetylamino**rhodanin (**24**) a ***N*-benzoylamino**rhodanin (**25**) však byly prakticky neúčinné u všech testovaných patogenů (MIC > 1000 µg/ml), což naznačuje důležitou roli volné aminoskupiny vázané na heterocyklický dusík. Podobný vztah struktury a aktivity platil i při testování insekticidního účinku vůči druhům *Culex pipiens pallens* a *Musca domestica* [6].

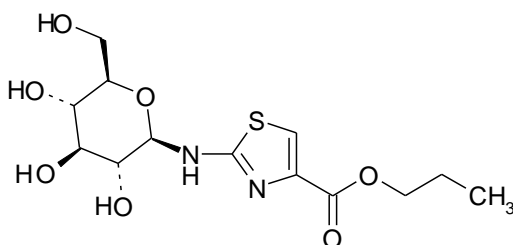
Deriváty rhodaninu a jeho rozkladných produktů thiomočoviny a 2-aminothiazolu, připravené *N*-glykosylací za použití glukopyranosy nebo ribofuranosy, mírně inhibovaly růst fungálních druhů *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. Testované látky vykázaly vyšší selektivitu ke kvasince *Candida albicans*. Nejúčinnější sloučeninou byla ***N*¹-β-D-glukopyranosyl-*N*³-butylthiourea** (**26**). Také ***N*-(2,3,5-tri-*O*-acetyl-β-D-ribofuranosyl)rhodanin** (**27**) a **ethyl-2-[(*N*-β-D-glucopyranosyl)amino]thiazol-4-karboxylát** (**28**) prokázaly aktivitu při hodnotách MIC v rozmezí desetin až desítek mmol/l.



26



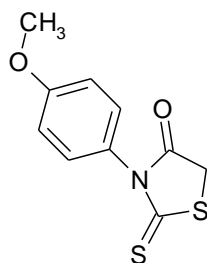
27



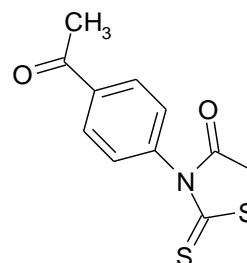
28

Tytěž látky inhibovaly růst některých bakterií, jak je uvedeno dále. Neúčinné naopak byly deriváty glukosylthiomočoviny s aminoskupinou nahrazenou diethylaminem, *N*-methylpiperazinem, morfolinem a thiomorfolinem, podobně jako ribosylované deriváty rhodaninu a thiomočoviny s benzoylskupinou na ribofuranosovém cyklu [13].

Deriváty ***N*-fenyl-** a ***N*-benzylrhodaninu** inhibovaly růst plísňe *Aspergillus niger*. Účinnější byly deriváty *N*-fenylrhodaninu, zejména 3-(4-methoxyfenyl)rhodanin (**29**) a 3-(4-acetylfenyl)rhodanin (**30**) ($IC_{100} = 25$ g/ml).



29



30

Antifungální aktivita obecně vzrostla zavedením substituentů na benzen s výjimkou substituce methylem v *ortho* pozici. Substituce do polohy *para* byla výhodná v případě chloru či bromu, pozice *meta* byla vhodnější pro metylovou či karboxylovou skupinu.

Deriváty *N*-benzylrhodaninu jen slabě inhibovaly *Aspergillus niger* ($IC_{100} > 250$ μ g/ml), o to výraznější však byly jejich antibakteriální vlastnosti uvedené dále v textu [43].

3.2 Antibakteriální vlastnosti derivátů rhodaninu

Bakteriální agens představují statisticky významnou příčinu infekčních chorob (zařazených v IDC do skupin: A a B), viz následující přehled [34]:

- A 00 Cholera
- A 01 Břišní tyfus a paratyfus
- A 02 Jiné infekce způsobené salmonelami
- A 03 Shigellosis
- A 04 Jiné bakteriální střevní infekce
- A 05 Jiné bakteriální otravy (intoxikace), přenesené potravinami
- A 15 Tuberkulóza dýchacího ústrojí bakteriologicky a histologicky ověřená
- A 16 Tuberkulóza dýchacího ústrojí bakteriologicky a histologicky neověřená
- A 17 Tuberkulóza nervové soustavy
- A 18 Tuberkulóza jiných orgánů
- A 19 Miliární tuberkulóza
- A 20 Mor – pestis
- A 21 Tularémie
- A 22 Anthrax – uhlák – sněť slezinná
- A 23 Brucellosis – vlnivá horečka
- A 24 Malleus – vozňivka a pseudomalleus – melioidosis
- A 25 Horečka z krysího kousnutí
- A 26 Erysipeloid
- A 27 Leptospiróza
- A 28 Ostatní zoonotické bakteriální nemoci nezařaditelné jinam
- A 30 Lepra – malomocenství (Hansenova nemoc)
- A 31 Nemoci způsobené jinými mykobakteriemi
- A 32 Listeriíza - listeriosis
- A 33 Tetanus novorozenců
- A 34 Tetanus porodnický
- A 35 Tetanus jiný
- A 36 Záškrt – diphteria
- A 37 Dávivý kašel – pertussis

- A 38 Spála – scarlatina
- A 39 Meningokové infekce
- A 40 Streptokoková septikémie
- A 41 Jiná septikémie
- A 42 Aktinomykóza - actinomycosis
- A 43 Nocardiosis
- A 44 Bartonellosis
- A 46 Růže - erysipelas
- A 48 Jiné bakteriální nemoci jinde nezařazené
- A 49 Bakteriální infekce neurčené lokalizace
- A 50 Vrozená syfilis - příjice - lues
- A 51 Časná syfilis
- A 52 Pozdní syfilis
- A 53 Jiná a neurčená syfilis
- A 54 Gonokoková infekce
- A 55 Lymphogranuloma venereum (chlamydiový)
- A 56 Jiná sexuálně přenášená chlamydiová onemocnění
- B 95 *Streptococcus* a *Staphylococcus* jako příčina nemoci nezařazené do jiných kapitol
- B 96 Jiné bakteriální agens jako příčina nemoci nezařazené do jiných kapitol

Původci bakteriálních infekcí jsou morfologicky velmi rozmanité prokaryotní organismy. Kromě mykoplazmat jsou všechny bakterie obaleny tuhou stěnou zpevněnou peptidoglykanem, jehož základními stavebními složkami jsou *N*-acetylglukosamin a kyselina *N*-acetylmuramová. Tato struktura se nevyskytuje u eukaryotních organismů včetně člověka, a proto je vhodným cílem farmakoterapeutického zásahu. Na inhibici syntézy buněčné stěny je založen mechanismus účinku betalaktamových a glykopeptidových antibiotik, fosfomicinu, cykloserinu a bacitracinu. Další systémově i lokálně podávané antibakteriální látky působí inhibici syntézy nukleových kyselin (sulfonamidy,

chinolony, nitroimidazoly, nitrofurany a rifamyciny), inhibiči syntézy bakteriálních proteinů (tetracykliny, chloramfenikol, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy a kyselina fusidová), nebo účinkují jinými mechanismy (např. polymyxiny – zvýšení permeability membrány) [1].

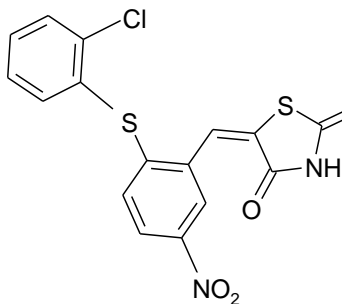
Neustálý vývoj bakteriální rezistence (penicilin-rezistentní *Streptococcus pneumoniae*, vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, multirezistentní salmonely aj.) a nárůst nozokomiálních nákaz (způsobených zejména druhem *Escherichia coli*) jsou podnětem pro výzkum nových tříd antibakteriálních látek [2].

Výzkum antibakteriálních léčiv je buďto založen na empirickém screeningu, tj. testování inhibiční aktivity rozsáhlých souborů sloučenin, nebo jsou na základě znalostí o struktuře aktivního místa navrhovány potenciální ligandy [44]. Pomocí obou metod byly objeveny určité deriváty rhodaninu jako potenciální antibakteriální léčiva.

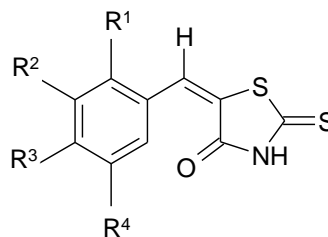
3.2.1 Deriváty rhodaninu inhibující UDP-N-Acetylmuramát / L-alanin ligasu

Peptidoglykan jako základ buněčné stěny bakterií je nepostradatelný pro jejich dělení a růst. Biosyntéza zahrnuje čtyři pochody, kdy jsou aminokyselinové zbytky vázány na uridin-difosfo-N-acetylmuramovou kyselinu (UDP-MurNAc). Každý krok je katalyzován enzymem ze skupiny Mur-synthetas. Tyto ligasy jsou vysoce specifické a vyskytují se pouze v Eubakteriích, což z nich činí velmi atraktivní cíle potenciálních antibakteriálních chemoterapeutik. Jedna z nich, UDP-MurNAc/Ala ligasa, umožňuje tvorbu první peptidové vazby mezi UDP-MurNAc a L-alaninem. Zároveň probíhá hydrolyza ATP na ADP a anorganický fosfát. Vzniklý acylfosfátový meziproduct je nukleofilně atakován alaninem za vzniku tetrahedrálního produktu, který se rozpadá na UDP-MurNAc-L-Ala a anorganický fosfát.

Schopnost inhibice Mur C byla objevena u 5-[2-(2-chlorfenyl)sulfanyl-5-nitrobenzyliden]rhodaninu (**31**), jenž byl spolu s dalšími jeho analogy (**32**) podroben testování inhibiční aktivity in vitro.



31



32: R¹ = H, *p*-Cl-benzylsulfanyl, *p*-Cl-fenylsulfanyl, *p*-Cl-fenoxy; R² = H, fenoxy, benzyloxy; R³ = H, benzyliden; R⁴ = NO₂, benzyloxy

Pouze pět ze čtyřiceti hodnocených látek vykázalo účinnost (při hodnotách IC₅₀ v rozmezí 12 – 24 μM). Nejlepšími inhibitory enzymu byly deriváty s 3,5-bis(benzyloxy)- a 4-benzyliden substituenty na centrálním aromatickém jádře. Pro aktivitu byla nutná absence substituentu na dusíku rhodaninového kruhu, kde pravděpodobně vzniká vodíkový můstek při interakci s aktivním místem enzymu. Přítomnost nitroskupiny, která byla podle autorů jiné studie nezbytná, zde nehrála významnou roli, neboť analogy bez nitroskupiny byly srovnatelně účinné.

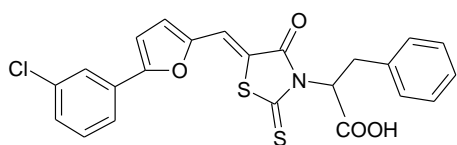
Při testování inhibiční aktivity na buněčných kulturách nebyl žádný z uvedených derivátů aktivní proti gramnegativní *Escherichia coli*. V případě grampozitivního meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) byly jen tři testované látky slabě účinné. Poměrně jednoduchá syntéza těchto derivátů však podněcuje k hledání účinnějších analogů [16].

3.2.2 Deriváty rhodaninu inhibující penicilin vázající proteiny (PBP)

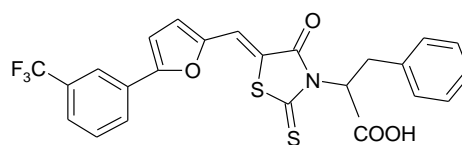
Penicilin vázající proteiny (PBP) jsou enzymy, které v posledním kroku syntézy peptidoglykanu, transpeptidaci, příčně spojují jeho jednotlivé podélné řetězce prostřednictvím peptidových vazeb. Právě tyto zkřížené vazby mezi podélnými řetězci peptidoglykanu zvyšují jeho pevnost. Skutečnost, že peptidoglykan je obsažen pouze v membráně prokaryotní buňky a dostupnost posledních dvou kroků jeho syntézy odehrávajících se na vnějším povrchu

cytoplazmatické membrány, činí z těchto enzymů vhodné cíle terapeutického zásahu.

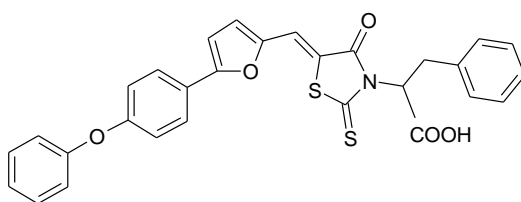
Dobře prostudovanými inhibitory transpeptidačních dějů jsou betalaktamová antibiotika. Rostoucí rezistence vůči těmto látkám však podněcuje k výzkumu nových inhibitorů s absencí betalaktamového kruhu. Schopnost inhibice těchto enzymů byla zjištěna u některých derivátů furfurylidenrhodaninu (**33** - **36**). Jejich vliv na peptidoglykanovou syntézu byl testován *in vitro* na několika typech enzymů PBP a posléze i na buněčných kulturách.



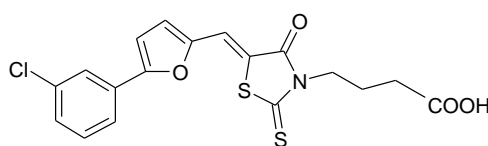
33



34

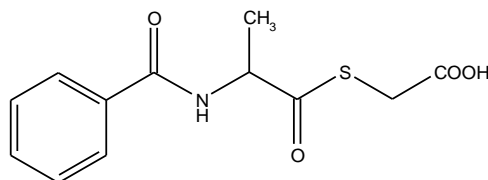


35



36

Aktivita potenciálních inhibitorů PBP3, PBP5 (izolovaných z *Escherichia coli*) a PBP2xS (ze *Streptococcus pneumoniae* senzitivního vůči penicilinu) byla hodnocena měřením zbytkové hydrolytické aktivity enzymů proti thiolesteru S2d (**37**) v přítomnosti testovaných sloučenin o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$.



37

Sloučeniny 33 – 35 si udržely hodnoty zbytkové aktivity enzymů PBP2xS dokonce pod hranicí 5 %. Jako porovnávací antibiotikum sloužil benzylpenicilin, který kompletně inhiboval všechny enzymy (zbytková aktivita enzymu byla 0 %).

Thiolesterasová aktivita PBP2xR, dvou enzymů produkovaných druhem *Streptococcus pneumoniae* rezistentním k penicilinu, byla příliš nízká na to, aby umožnila měření, proto byla hodnocena jejich schopnost vázat substrát (fluoresceinem označený ampicilin, flu-AMP). Oba enzymy byly inhibovány v přítomnosti sloučenin **34** a **36**, kdy vykazovaly zbytkovou aktivitu 10 a 20 %, avšak při dvounásobné koncentraci inhibitorů (100 $\mu\text{mol/l}$).

U penicilin vázajících proteinů, izolovaných ze *Streptomyces sp.* a *Actinomadura sp.*, byla hodnocena jejich zbytková DD-peptidasová aktivita. Nejúčinnější byl derivát **34** (zbytková aktivita 25 a 5 %).

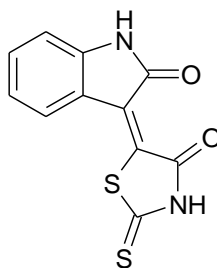
Arylalkylidenderiváty účinně inhibovaly i enzym PBP2a (izolovaný ze *Staphylococcus aureus*). Právě tento enzym je svou nízkou afinitou k β -laktamovým antibiotikům zodpovědný za rezistenci stafylokoků. Nejúčinnější arylalkylidenrhodaniny (**34** a **35**) vykazovaly hodnoty IC_{50} 5 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky hodnocení inhibiční aktivity arylalkylidenderivátů rhodaninu na buněčných liniích ukázaly, že tyto sloučeniny jsou účinné proti několika grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) a gramnegativním (*Moraxella catarrhalis*, *Hemophilus influenzae*) bakteriím. U rezistentních druhů bakterií (meticilin-rezistentní *S. aureus* – MRSA, vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* – VRE), byly hodnoty MIC u testovaných derivátů dokonce výrazně nižší než u porovnávacích antibiotik ampicilinu a cefotaximu. Naopak v případě penicilin-rezistentního i penicilin-senzitivního kmene *Streptococcus pneumoniae* a u *Escherichia coli*, inhibovaných ampicilinem i cefotaximem již při nízkých koncentracích, byly arylalkylidenrhodaniny neúčinné ($\text{MIC} > 200$). Studie mechanismu účinku testovaných derivátů ukázala, že se jedná o nekompetitivní inhibitory. Pravděpodobně tedy neinteragují s aktivním místem enzymu tak jako betalaktamová antibiotika, která acylují enzym na serinovém zbytku. Identifikace místa interakce arylalkylidenderivátů rhodaninu s enzymy PBP zůstává předmětem dalšího zkoumání [14].

3.2.3 Deriváty rhodaninu inhibující betalaktamasy tříd A a C

Podle struktury molekuly enzymu jsou rozlišovány 4 třídy betalaktamas. Většinu těchto enzymů zahrnují třídy A a C. Do třídy A se řadí nejběžněji se vyskytující betalaktamasy, vůči nimž jsou používány účinné inhibitory: kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. Žádná dostupná léčiva však neinhibují enzymy třídy C (cefalosporinasy). Vzhledem k tomu, že tvorba betalaktamas představuje dominantní mechanismus rezistence bakterií, jsou stále hledány nové struktury se schopností enzymové inhibice.

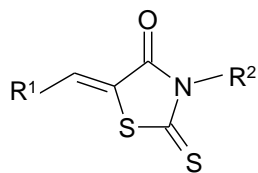
Inhibice betalaktamas tříd A a C byla zaznamenána u sloučeniny **38**, 5-(indol-2-on-3-yliden)rhodaninu.



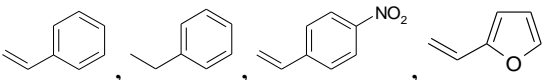
38

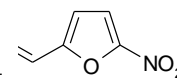
Při testování selektivity této látky byl jako prototyp betalaktamasy třídy C použit enzym P99 izolovaný z *Enterobacter cloacae* a betalaktamasu třídy A zastupoval enzym TEM-1 izolovaný z *Escherichia coli*. Hodnota IC₅₀ vůči P99 (2,6 μM) byla pouze třikrát nižší než vůči TEM-1, což podnítilo hledání selektivnějších derivátů. Rozštěpením pyrrolidonového kruhu vznikly sloučeniny analogické kondenzačním produktům substituovaných aromatických aldehydů s rhodaninem.

Získané arylalkylidenrhodaniny (**39**) byly podrobeny testování na enzymech P99 a TEM-1. Výsledky aktivity ukázaly, že nejselektivnější sloučenina k P99 postrádala substituent na dusíku rhodaninového kruhu, a že nitrobenzylidenderiváty měly výrazně vyšší aktivitu k P99.

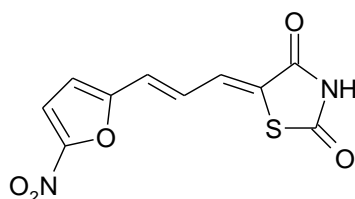


39: R¹ = fenyl, 2-OH-fenyl, 2-NO₂-fenyl, 4-NO₂-fenyl; R² = H, C₂H₅, CH₂COOH, aj.

40: R¹ =  ;
R² = H

41: R¹ =  ; R² = H

Tato ještě relativně slabá (IC₅₀ = 43 a 290 μM), avšak selektivní aktivita podnítila k dalším modifikacím struktury, a to rozšířením spojovacího řetězce o 2 uhlíky (**40**). Inhibiční aktivita takto připravených derivátů se sice zvýšila, na druhou stranu byl zaznamenán pokles selektivity. Zajímavé je, že aktivita sloučenin s nasyceným spojovacím řetězcem byla vyšší v porovnání s nenasycenými analogy. Ačkoli záměna spojovacího řetězce za heterocykl (triazol, imidazol) vedla k poklesu až ztrátě účinku, náhrada fenylu 5-nitrofurylem dala vznik sloučenině 200krát selektivnější k P99 s IC₅₀ = 0,45 μM (**41**). Přítomnost nitroskupiny vedla u tohoto derivátu k vlastní antibakteriální aktivitě, jak potvrdilo testování inhibiční aktivity na šesti bakteriálních druzích. Neměla však vliv na zvýšení selektivity k P99, neboť analogický derivát thiazolidin-2,4-dionu (**42**) byl neselektivní [45].



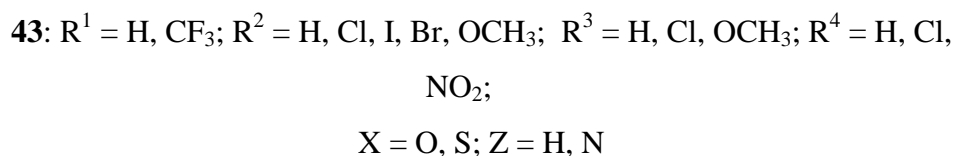
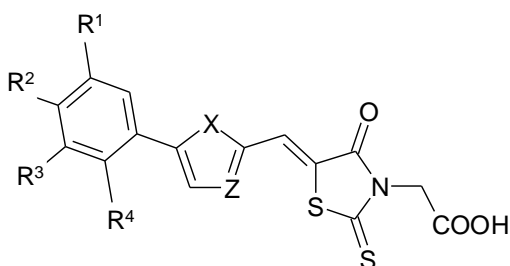
42

3.2.4 Deriváty rhodaninu inhibující anthraxový letální faktor (LF)

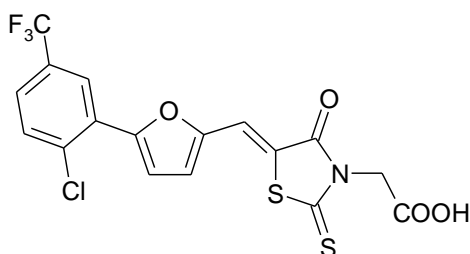
Původcem anthraxu je sporulující grampozitivní bakterie *Bacillus anthracis*. Patogenitu této bakterie způsobují dva hlavní faktory virulence: polypeptidové pouzdro inhibující fagocytózu bakterie a komplex toxinů, jehož složkami jsou tři bílkoviny: *protektivní antigen*, *edémový faktor* a *letální faktor* (Zn-metaloproteinasa). Závažnost infekce závisí rovněž na bráně vstupu infekce. Zatímco kožní anthrax je zřídka letální, respirační nebo alimentární anthrax je

nebezpečný a často fatální. Po vdechnutí nebo požití se spóry dostávají do makrofágů, kde klíčí. Protektivní antigen se váže na receptor hostitelské buňky a štěpí se za vzniku *N*-terminálního fragmentu a *C*-terminálního fragmentu. Druhá z komponent oligomerizuje za vzniku heptameru schopného vázat letální a efektivní faktor. Celý komplex pak prochází membránou receptorem-zprostředkovanou endocytózou a v cytosolu blokuje adenylátcyklasovou dráhu. Následkem je zvýšená propustnost cév vedoucí k šoku. Lékem volby při anthraxu je penicilin, neboť kmeny produkující betalaktamasu jsou zatím vzácné [1, 15].

Nový mechanismus farmakoterapeutického účinku, inhibice anthraxového letálního faktoru, byl popsán u derivátů arylheteroarylalkylidenrhodaninoctové kyseliny (**43**). Aktivita testovaných látek byla měřena jako míra štěpení fluorescenčního proteinu. Porovnávacím chemoterapeutikem byl ciprofloxacin.



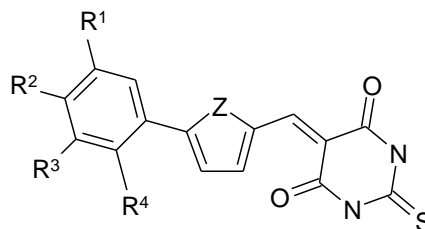
Nejúčinnější sloučenina (**44**) vykázala IC_{50} 0,19 $\mu\text{mol/l}$. Bylo potvrzeno, že hodnocené sloučeniny jsou kompetitivními inhibitory proti substrátu.



44

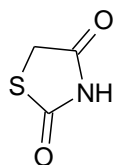
Ze vztahu struktury a aktivity bylo zjištěno, že mnohonásobná substituce benzenového kruhu výrazně zvyšuje účinnost. Furanový kruh, navázaný

v poloze 5 přes methinový můstek, může být nahrazen thiofenem, případně thiazolem bez významného snížení inhibičního efektu. Substituce benzenu heterocyklem je také tolerována. Náhrada rhodaninového cyklu je tolerována v případě thiobarbiturové kyseliny (**45**).

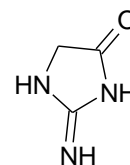


45: $R^1 = \text{H, CF}_3$; $R^2 = \text{H, Cl, OCH}_3$; $R^3 = \text{H, Cl}$; $R^4 = \text{H, Cl}$; $X = \text{O, S}$

Z výsledků rentgenové analýzy struktury komplexu jednoho derivátu s letálním faktorem vyplývá, že rhodaninový kruh interaguje se zinečnatým iontem metaloenzymu prostřednictvím exocyklické síry. Proto náhrada rhodaninu thiazolidin-2,4-dionem (**46**) nebo 2-iminoimidazolidin-5-onem (**47**) vede ke ztrátě aktivity. Vyšší účinnost derivátů s thiobarbiturovou kyselinou je rovněž přisouzena interakci síry s iontem kovu.



46



47

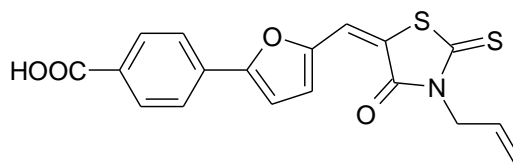
Karboxymethylová skupina na dusíku rhodaninového kruhu směřuje k hydrofilní oblasti proteinu vyskytující se blízko jeho povrchu, což vysvětluje vyšší variabilitu možných substitucí v této pozici. Byly zaznamenány též hydrofobní interakce mezi fenylem a lipofilním vedlejším řetězcem letálního faktoru [15].

3.2.5 Deriváty rhodaninu inhibující transkripci s účinkem proti biofilmům

Staphylococcus epidermidis

Mezi novými inhibitory RNA-polymerasy vykazala látka SB13 (**48**), 4-{5-[(3-allyl-2-thioxothiazolidin-4-on-5-yliden)methyl]furan-2-yl}benzoová

kyselina, schopnost narušovat biofilmy produkované koagulasa-negativním *Staphylococcus epidermidis*.



48

Právě tvorba biofilmů na povrchu polymerních implantátů a katetrů je hlavním atributem virulence těchto multirezistentních stafylokokových kmenů. Bakterie v biofilmu existují ve stacionárním stádiu, kdy nerostou a nejsou tudíž citlivé ani k účinku antimikrobních látek založeném na inhibici růstu, ani vůči vnějším vlivům. Odolnost tohoto biofilmu časem postupně roste a dochází k selekci mutant rezistentních k použitým antibakteriálním léčivům.

Aktivita látky SB13 proti biofilmům ze dvou kmenů a dvou klinických izolátů *Staphylococcus epidermidis* byla porovnávána se standardními antibiotiky: rifampicinem, fosfomycinem, vankomycinem, minocyklinem, fusidovou kyselinou, novobiocinem, amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou a imipenemem v kombinaci s cilastatinem. Hodnoty MIC a MBC sloučeniny SB13 odečtené po šesti hodinách inkubace byly v porovnání s antibiotickými standardy vysoké (2500krát a 1250krát vyšší než hodnoty nejúčinnějšího rifampicinu). Nicméně po 24-hodinové inkubaci biofilmů *Staphylococcus epidermidis* s testovanými antibakteriálními látkami byla inhibiční schopnost látky SB13 téměř srovnatelná s účinkem rifampicinu. Výhodou nového transkripčního inhibitoru je skutečnost, že narozdíl od rifampicinu nevyvolává vznik rezistentních kmenů bodovou mutací RNA-polymerasy, což podporuje domněnku, že tato relativně hydrofobní molekula zasahuje i přídatné bakteriální proteiny [46].

3.2.6 Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku

Následující sloučeniny vykazaly v různé míře antifungální i antibakteriální vlastnosti. U látek, které již byly uvedeny v předcházejícím textu, jsou podrobnosti o struktuře popsány v části „Antifungální vlastnosti“.

5-[(2-Hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]rhodanin, 5-salicylidenrhodanin a jeho **arylazoderiváty (9, 10, 11)** inhibovaly růst bakterií *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus faecalis*. Účinné byly i vůči dalším testovaným druhům: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* a *Bacillus subtilis*. Ve studii srovnávající aktivitu 5-[(2-hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]rhodaninu a 5-salicylidenrhodaninu vykázal lepší antibakteriální účinek 5-[(2-hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]rhodanin. Nejsilnějším inhibitorem z druhé studie provedené s 5-(5'-arylazosalicyliden)rhodaniny byl 5-(5'-fenylazosalicyliden)rhodanin. Podobně jako při hodnocení antifungální aktivity byl účinnější než nesubstituovaný 5-salicylidenrhodanin. Substituce vodíku na fenylu methylem nebo methoxyskupinou poskytla nejméně aktivní sloučeniny [37].

Některé z **derivátů 5-(5-nitrofurfuryliden)- a 5-[3-(5-nitrofuran-2-yl)allyliden]rhodaninu (12 a 13)** aktivní proti kvasince *Candida albicans*, byly rovněž účinné proti bakteriím. Z testovaných druhů byly nejvíce inhibovány *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*, méně *Escherichia coli* a *Salmonella typhi* a pouze jedním derivátem byla slabě inhibována *Pseudomonas aeruginosa*. N-alkylace vedla u obou typů derivátů k poklesu antibakteriální aktivity, a to úměrně k nárůstu velikosti alkylového řetězce. Účinnost proti bakteriím snižovalo i zavedení hydrofilní skupiny (2-hydroxyethyl) na dusík rhodaninového kruhu. Naopak substituce fenylem na dusíku 5-(5-nitrofurfuryliden)rhodaninu poskytla jednu z nejméně aktivních sloučenin proti *Streptococcus pyogenes* (MIC = 0,1 µg/ml).

Nejširší spektrum vykázal během testování 5-[3-(5-nitrofuran-2-yl)allyliden]rhodanin, který jako jediný inhiboval *Pseudomonas aeruginosa* při MIC < 100 µg/ml. Analogické deriváty thiazolidin-2,4-dionu projeví vyšší účinnost a širší spektrum působení než deriváty rhodaninu. U všech uvedených typů sloučenin byla pro antibakteriální aktivitu nezbytná přítomnost nitroskupiny na furanovém cyklu [38].

Antibakteriální aktivita ***o*-nitrobenzylidenrhodaninu (8)** byla testována proti bakteriím *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus*, *Sarcina lutea*, *Salmonella paratyphi*. Nejsilnější inhibice

růstu byla zaznamenána v případě druhů *Bacillus anthracis* a *Salmonella paratyphi*, kdy při všech koncentracích (250, 500 a 1000 µg/ml) byly inhibiční zóny shodné nebo větší než zóny inhibice vyvolané streptomycinem v koncentraci 2000 µg/ml. U všech testovaných druhů byla inhibiční aktivita *o*-nitrobenzylidenrhodaninu při koncentraci 1000 µg/ml vyšší než u streptomycinu ve dvojnásobné koncentraci. Předpokládá se, že antimikrobní vlastnosti této sloučeniny by mohly být spojeny právě s přítomností nitroskupiny [12].

Antifungálně účinné **deriváty 5-(1-methylalkyliden)rhodaninů (17)** byly také testovány na aktivitu proti bakteriím *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis*. Výsledky byly porovnány s účinkem připravených analogických derivátů **thiazolidin-2,4-dionu (18)**. Žádná ze sloučenin zahrnutých ve studii nebyla účinná proti *Escherichia coli* při koncentraci 250 ppm. Některé z obou typů derivátů kompletně inhibovaly růst kultur *Bacillus subtilis* při koncentracích nižších než 250 ppm. Lepšími inhibitory byly látky s rhodaninovou strukturou. Antibakteriální aktivita závisela na délce postranního alkylového řetězce, podobně jako při hodnocení antifungálního účinku, tzn. deriváty rhodaninu dosáhly maximálního účinku při nižším alkylu, než příslušné deriváty thiazolidin-2,4-dionu. Rozvětvení řetězce či přítomnost násobné vazby měly až druhořadý vliv na antibakteriální aktivitu [40].

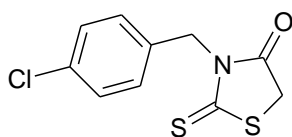
Deriváty rhodaninu kondenzované s thiazolo-2-thiony (19) a **thiazolo[4,5]pyrimidiny (20)** vykazaly jen velmi slabou aktivitu vůči testovaným bakteriálním druhům (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Proteus vulgaris*) [11].

Deriváty 3-arylaminomethyl-5-arylidenrhodaninu (22) se slabou antifungální aktivitou vykazaly též mírný inhibiční účinek proti bakteriím: *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* [42].

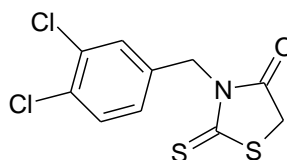
N-glykosylované deriváty rhodaninu a jeho rozkladných produktů thiomocoviny a 2-aminothiazolu inhibovaly rovněž růst bakterií *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* s obdobnou intenzitou jako samotný rhodanin. Vyšší selektivitu vykázaly ke grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* než ke gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Nejúčinnější z testovaných sloučenin byl ***N*-(2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)rhodanin (27)**, který inhiboval všechny testované mikroorganismy. Také ***N*- β -D-glukopyranosyl-*N*-butylthiomocovina (26)**, a **ethyl-2-(*N*- β -D-glucopyranosyl)aminothiazol-4-karboxylát (28)** prokázaly inhibiční aktivitu při hodnotách MIC v rozmezí 10^{-2} – 10^{-4} mol/l. Deriváty uvedené jako neúčinné proti houbám byly taktéž neúčinné proti bakteriím [13].

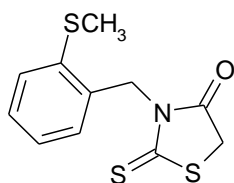
Zatímco deriváty ***N*-fenylrhodaninu** vykázaly lepší antifungální účinek, **deriváty *N*-benzylrhodaninu** byly účinnější proti bakteriím *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Všechny deriváty *N*-benzylrhodaninu kompletně inhibovaly růst *Bacillus subtilis* při koncentraci 200 μ g/ml. Deset z nich dokonce při 25 μ g/ml. Nejúčinnější byly 3-(4-chlorbenzyl)rhodanin (**49**), 3-(3,4-dichlorbenzyl)-rhodanin (**50**) a 3-(2-methylsulfanylbenzyl)rhodanin (**51**) s hodnotami IC_{100} = 2,5 μ g/ml.



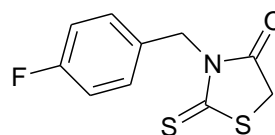
49



50



51



52

Escherichia coli, která je obecně rezistentnějším bakteriálním druhem, byla některými deriváty *N*-benzylrhodaninu inhibována při nižších koncentracích, než

kteřé byly účinné proti *Bacillus subtilis*. Nejsilnějším inhibiteřem byl 3-(4-fluorbenzyl)rhodanin (**52**) s $IC_{100} = 5 \mu\text{g/ml}$. Inhibiční aktivita sloučenin proti *Escherichia coli* obecně klesala s růstem atomové hmotnosti halogenu na benzenovém jádře [43].

3.3 Antituberkulotické vlastnosti derivátů rhodaninu

Tuberkulóza je chronické infekční onemocnění s druhou nejvyšší mortalitou (za infekcí HIV). Každoročně jí podlehne asi dva miliony lidí na celém světě [47].

U člověka je původcem infekce především *Mycobacterium tuberculosis*. Podobně jako ostatní mykobakterie může vytvářet vláknité mycelium, odtud název „*Mycobacterium*“. Dalším společným diagnostickým znakem je acidorezistence, způsobená lipidovým charakterem buněčné stěny.

Virulence *Mycobacterium tuberculosis* je dána přežíváním uvnitř makrofágů. Imunitní systém následně ničí napadenou tkáň a tím paradoxně vytváří klinický obraz nemoci: tuberkulózní léze a dutiny [1].

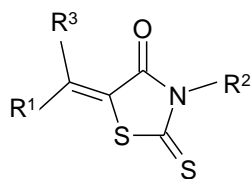
V Evropě používaná živá atenuovaná vakcína z kmene *Mycobacterium bovis*, původce tuberkulózy skotu, chrání sice před závažnými formami dětské tuberkulózy (jako je meningitida), avšak její vliv na incidenci plicní formy tuberkulózy je sporný. Vysoká frekvence výskytu tuberkulózy je u pacientů s AIDS, u nichž má onemocnění vzhledem k dysfunkci imunitního systému odlišný a velmi rychle progredující průběh. Z antibiotik se dnes používají převážně baktericidní látky: rifampicin, pyrazinamid, izoniazid, streptomycin a etambutol. Rychlý vývoj rezistence vyžaduje vždy kombinovanou léčbu. Nicméně, časté relapsy a prodloužená farmakoterapie, zejména u imunodeficientních pacientů, vedou k selekci multirezistentních mutantů a proto dnes léčba některých forem tuberkulózy selhává. Dalším podnětem pro výzkum nových účinných látek je nárůst oportunních infekcí vyvolaných atypickými mykobakteriemi, zejména *Mycobacterium avium* [1, 48].

Nové strukturální třídy látek s prokázanou antimykobakteriální aktivitou zahrnují například: acetamidy, 5-aryliden-2-thiohydantoiny, benzoxazoly, benzothiazoly, hydrazony kyseliny benzoové, benzoxaziny, uhlovodíky, chalkony, kumariny, deazapteridiny, imidazoly, indolochinazolinony, isothiosemikarbazony, mykobaktiny, 1,8-naftyridiny, fenaziny, puriny, pyridiny, *N*-pyridinylsalicylamidy, pyrimidiny, pyrroly, chinoliny, terpeny a triazoly [47].

3.3.1 Deriváty rhodaninu zasahující do syntézy buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis*

Buněčná stěna *Mycobacterium tuberculosis* je tvořena třemi druhy vzájemně propojených makromolekul: mykolovou kyselinou, arabinogalaktanem a peptidoglykanem. Mykolové kyseliny se nacházejí na vnější straně buněčné stěny a tvoří zde ochrannou lipidovou vrstvu napodobující membránu gramnegativních bakterií. Směrem do středu buňky jsou esterifikovány polysacharidem arabinogalaktanem, který je napojen na zbytek muramové kyseliny peptidoglykanu prostřednictvím disacharidu α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-*N*-acetylglukosaminosyl-1-fosfátu. Zásah do syntézy některé z komponent membrány má zásadní vliv na viabilitu mykobakterií, neboť ohrožuje soudržnost buněčné stěny. Protože existuje jediná a poměrně jednoduchá cesta biosyntézy jedné ze složek, L-rhamnosylového zbytku, z α -D-glukoso-1-fosfátu a dTTP, katalyzovaná čtyřmi enzymy RmlA – RmlD, je inhibice těchto enzymů vhodným mechanismem působení nových potenciálních antimykobakteriálních léčiv.

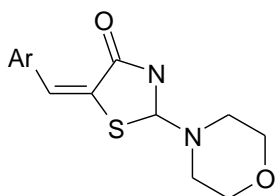
Schopnost inhibice enzymů RmlB, RmlC a RmlD byla zkoumána na rozsáhlém souboru sloučenin. Zajímavým zjištěním je skutečnost, že tři z osmnácti účinných látek obsahovaly ve své molekule rhodanin. Jedna z těchto tří látek inhibovala dokonce všechny tři testované enzymy. Dva z derivátů rhodaninu vykazaly vůbec nejvyšší aktivitu ze všech hodnocených látek a dobře obstály i při testování inhibice na buněčných kulturách *M. tuberculosis* (MIC = 64 a 16 μ g/ml). Publikována byla pouze obecná struktura (**53**) těchto derivátů [17].



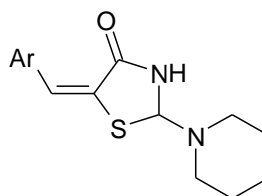
53

3.3.2 Deriváty rhodaninu s neznámým mechanismem účinku

Již v padesátých letech 20. století byla aktivita proti *M. tuberculosis* hodnocena také na dvou řadách derivátů rhodaninu: kondenzačních produktech rhodaninu s aromatickými aldehydy a derivátech odvozených náhradou exocyklické síry sekundárními cyklickými aminy: morfolinem a piperidinem (**54** a **55**).

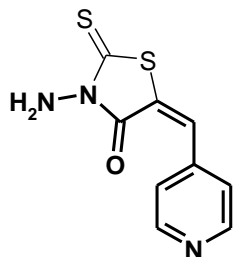


54

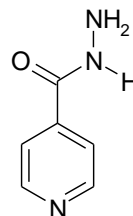


55

Žádná z tehdy připravených sloučenin nevykázala tuberkulostatickou aktivitu, avšak struktura jedné z testovaných látek (**56**), **derivátu aminorhodaninu**, se stala předmětem dalšího zkoumání, vzhledem k analogii se strukturou známého antituberkulotika isoniazidu (**57**).

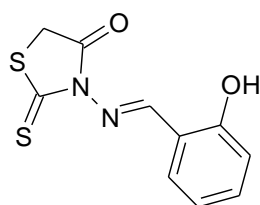


56

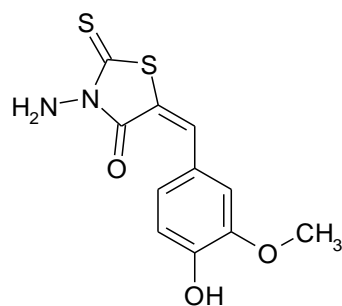


57

Různé deriváty aminorhodaninu byly poté testovány na antituberkulotickou aktivitu *in vitro*. Některé látky byly v prvních devíti dnech inkubace (trvajících celkem 23 dní) účinné i při koncentracích nižších než porovnávací antituberkulotikum cykloserin. Nejsilnějšími inhibitory růstu mykobakterií byly aminorhodanin (**23**), 3-[(2-hydroxybenzyliden)amino]rhodanin (**58**) a 3-amino-5-(4-hydroxy-3-methoxybenzyliden)rhodanin (**59**).



58



59

Kromě aktivity byla hodnocena také toxicita účinných derivátů. Na rozdíl od aminorhodaninu, u něhož byla LD_{50} na myších již 9 mg/kg, byly obě další sloučeniny mnohem bezpečnější ($LD_{50} = 120$ mg/kg a $LD_{50} > 1000$ mg/kg).

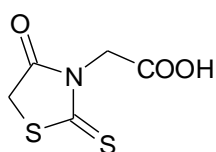
Testování *in vivo* (na myších) bylo neúspěšné, neboť po třech měsících denního podávání byly výsledky zkoušených látek srovnatelné s placebem. Není však vyloučeno, že klinické testování na lidech by přineslo pozitivní výsledky jako v případě cykloserinu, jehož aktivita se na myších rovněž nepotvrdila [18].

5-[(2-Hydroxynaftalen-1-yl)methyliden]rhodanin, 5-salicylidenrhodanin a jeho arylazoderiváty (**9**, **10**, **11**) s insekticidními, antifungálními a antibakteriálními vlastnostmi byly testovány *in vitro* na aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Nejlepším inhibitorem růstu uvedeného kmene byl 5-(5'-fenylazosalicyliden)rhodanin s MIC 95 μ g/ml. Platil zde podobný vztah struktury a aktivity jako v případě antifungálního a antibakteriálního účinku [37].

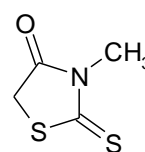
3.4 Inhibiční vliv derivátů rhodaninu na rostlinný růst

Mezi deriváty rhodaninu byly též objeveny látky inhibující fotosyntetické procesy rostlin a sloučeniny s algicidním účinkem.

Inhibice růstu kořenů dvouděložné rostliny *Brassica campestris* L., subsp. *rapa* byla zaznamenána u **rhodaninu (1)**, **rhodanin-3-octové kyseliny (60)**, **3-methylrhodaninu (61)** a **aminorhodaninu (23)**.



60



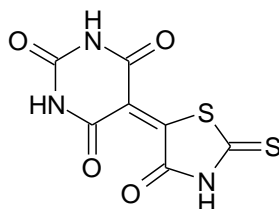
61

Účinnost uvedených derivátů byla hodnocena měřením délky kořenů po vystavení inhibitoru o koncentracích 0,1, 0,3 a 0,5 mmol/l a porovnáním s kontrolním vzorkem. Zároveň byl stanoven i obsah chlorofylu v rostlině. Bylo prokázáno, že inhibice růstu je spojena s inhibicí fotosyntézy. Jako porovnávací inhibitor byl použit 2,4-dichlorfenoxiacetát, který vykázal vyšší inhibiční aktivitu než všechny testované sloučeniny. Z hodnocených látek byl nejúčinnější aminorhodanin. Volná aminoskupina má pravděpodobně důležitý vliv na inhibiční aktivitu, jak vyplývá z výsledků testování účinnosti *N*-acetylaminorhodaninu a *N*-benzoylaminorhodaninu, u nichž byla schopnost inhibice výrazně potlačena.

Aminorhodanin byl dále testován na inhibiční aktivitu proti růstu některých dvouděložných (*Sesamum indicum* L., *Daucus carota* L., *Lactuca sativa* L., var. *longifolia*, *Brassica campestris* L., subsp. *rapa*) a jednoděložných (*Echinochloa utilis*, *Alium tuberosum*) rostlin. Byl účinný u všech šesti rostlinných druhů. Nejvýrazněji inhiboval růst kořenů *Sesamum indicum* L. již při koncentraci 0,03 mmol/l. Aminorhodanin inhiboval také klíčení semen *Sesamum indicum* L., *Daucus carota* L. a *Lactuca sativa* L., var. *longifolia* při koncentraci 0,3 mmol/l.

Z výsledků testování akutní toxicity derivátů na myších lze shrnout, že s výjimkou 3-methylrhodaninu stoupala s inhibicí rostlinného růstu i akutní toxicita [49].

5-(5'-Barbituriliden)rhodanin (44) je účinným inhibitorem růstu některých druhů řas. Inhibiční aktivita byla testována na zástupcích rodů *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Plectonema*, *Anacystis*, *Ankistrodesmus*, *Anabaena*, *Synura*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Coccochloris* a *Lyngbya*. 5-(5'-barbituriliden)-rhodanin působil selektivněji vůči druhům *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Anabaena*, *Synura* a *Oscillatoria*. Algicidní účinek se projevil již při koncentraci 0,1 µg/ml. Navíc tato látka, ani žádný její rozkladný produkt nejsou toxické pro ryby, a proto je potenciálně vhodná pro použití v praxi [7].



62

4. METODICKÁ ČÁST

Rhodanin (**1**) může být připraven různými postupy:

- reakcí kyseliny chloroctové s amonium-thiokyanátem
- reakcí ethyl-chloracetátu s amonium-dithiokarbamátem v ethanolu za přítomnosti HCl
- sycením roztoku ethanolického roztoku thioglykolové kyseliny a kalium-thiokyanátu plynným chlorovodíkem
- cyklizací thiokarbamoylthioglykolové kyseliny za různých reakčních podmínek

Vzhledem k přítomnosti aktivní CH_2 skupiny v poloze 5 podstupuje rhodanin a jeho *N*-substituované deriváty kondenzační reakce se všemi typy aromatických, alifatických a nenasycených aldehydů. Reakce s ketony probíhají obtížněji. Významné jsou i přeměny kondenzačních produktů za vzniku homologických aldehydů, nitrilů, aminokyselin a ketokyselin, označované jako Gränacherova syntéza.

Kondenzace rhodaninu s karbonylovými sloučeninami se nejčastěji uskutečňují následujícími postupy:

- v kyselém prostředí, kdy se aldehyd a rhodanin rozpustí v kyselině octové a směs se několik hodin vaří s ekvivalentním množstvím octanu sodného a acetanhydridu
- v alkalickém prostředí, kdy se kondenzace katalyzuje směsí chloridu amonného a amoniaku ve vodně-alkoholickém roztoku [31].

Druhá metoda je šetrnější, proto byla použita v této práci. Relativně novými postupy přípravy uvedených kondenzačních produktů jsou např. reakce ve vodném prostředí s využitím Tweenu jako surfaktantu, s použitím mikrovlnného záření, nebo katalyzátorů fázového přenosu [56, 19].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemická část

Sloupcové chromatografie byly prováděny „flash“ technikou za použití akvarijního motorku jako přetlaku. TLC chromatografie byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Jako mobilní fáze byla používána směs benzín + ethyl-acetát 60:40 (v/v).

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa. Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku Bötia a nebyly korigovány.

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

Čistota produktů byla ověřena pomocí HPLC za těchto podmínek:

Separční modul: Waters Alliance 2695 XE s chromatografickým softwarem Millennium³²® Chromatography Manager Software, Waters 2004

Kolona: Symmetry[®] C₁₈ 5 μm, 4.6 × 250 mm

Mobilní fáze: methanol + voda 70:30 (v/v), průtok 0,9 ml/min, nástřik 30 μl

Detekce: Waters Photodiode Array Detector 2996, 210 nm

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400. Vlnočty jsou uváděny v cm⁻¹.

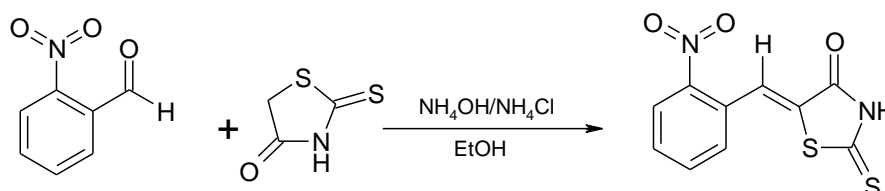
¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-V_xBB 300. Chemické posuny jsou uváděny v δ, ppm a interakční konstanty *J* v Hz.

Pro kondenzaci byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny:

- 2-nitrobenzaldehyd (Loba-Chemie)
- 3-nitrobenzaldehyd (Fluka)
- 4-nitrobenzaldehyd (Lachema)
- rhodanin (Fluka)

3-(2-hydroxyethyl)rhodanin, jako surovina pro syntézy 5.1.4 – 5.1.6, byl připraven podle patentu [50].

5.1.1 Příprava 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 2-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 10 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 2,72 g (68 %) čokoládově hnědé práškovité látky. Podle výsledků TLC se jednalo o směs, která byla podrobena chromatografickému dělení na sloupci.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 Merck (0,040 – 0,063 mm) – 300 g

Objem frakce: 100 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60:40

Krystalizací frakcí 7 – 9 bylo získáno 0,74 g produktu (18,5 %).

Molekulová hmotnost: 266,30

Vzhled: žlutozelená krystalická látka

Teplota tání: 190 – 195 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [51]:

- 204 – 206 °C /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/
- 204 – 205 °C /konfigurace neuvedena, methanol/
- 198 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 188 – 189 °C /konfigurace neuvedena, vodný ethanol/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	45,10	2,27	10,52	24,08
Nalezeno:	43,78	1,53	10,14	26,31

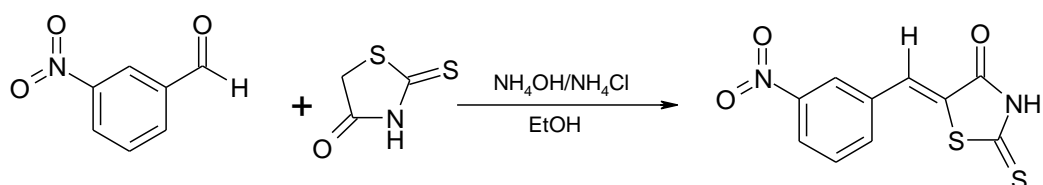
HPLC čistota: 99,64 %

IČ spektrum (KBr): 3469, 3447 (NH); 1735 (C=O); 1234 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 1

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 2

5.1.2 Příprava 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 3-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného

ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 3,55 g (89 %) surového produktu. Po překrystalizování z bezvodého ethanolu bylo získáno 0,44 g (11 %) žlutooranžové krystalické látky (t.t. = 255 – 260 °C). Z matečných louhů se dále vyloučilo 2,40 g žluté jemně krystalické látky (t. t. = 255 – 259 °C za rozkladu). Oba podíly byly podle výsledků TLC a chování pod mikroskopem totožné. Byly spojeny rozetřením v třecí misce. Po vysušení bylo získáno 2,84 g (71 %) produktu.

Molekulová hmotnost: 266,30

Vzhled: žlutá, jemně krystalická látka

Teplota tání: 257 – 263 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [51]:

- 270,5 – 271 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 264 – 265 °C /konfigurace neuvedena, benzen + methanol/
- 258 °C /konfigurace neuvedena, rozpouštědlo neuvedeno/
- 245 – 255 /konfigurace neuvedena, kyselina octová/
- 273 – 275 /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	45,10	2,27	10,52	24,08
Nalezeno:	44,64	2,41	11,07	24,32

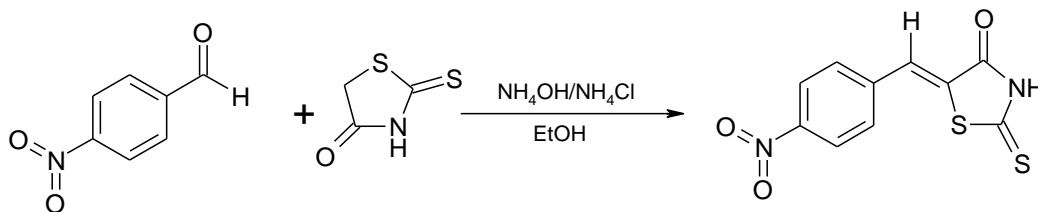
HPLC čistota: 99,03 %

IČ spektrum (KBr): 3437, 3255, 3182 (NH); 1728 (C=O); 1229 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 3

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 4

5.1.3 Příprava 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thio-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 4-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Po vysušení bylo získáno 3,15 g (79 %). Pro analýzu byla sloučenina překrytalizována z bezvodého ethanolu. Bylo získáno 2,32 g (58 %) produktu.

Molekulová hmotnost: 266,30

Vzhled: žlutooranžová, jemně krystalická látka

Teplota tání: 272 – 276 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [51]:

- 273 – 274 °C /konfigurace neuvědlena, aceton + methanol/
- 270 °C /konfigurace neuvědlena, rozpouštědlo neuvědleno/
- 259 °C /konfigurace neuvědlena, rozpouštědlo neuvědleno/
- 259 °C /konfigurace neuvědlena, aceton/
- 255 °C /konfigurace neuvědlena, rozpouštědlo neuvědleno/
- 255 – 256 °C /konfigurace neuvědlena, voda + dimethylformamid/
- 250 °C /konfigurace neuvědlena, kyselina octová/
- 250 – 252 °C /konfigurace neuvědlena, ethanol/
- 277 – 278 °C /E-izomer, rozpouštědlo neuvědleno/

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	45,10	2,27	10,52	24,08
Nalezeno:	45,15	2,28	10,52	24,31

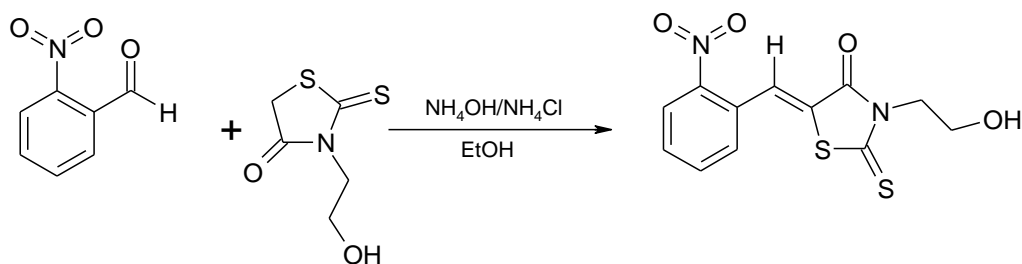
HPLC čistota: 99,48 %

IČ spektrum (KBr): 3274, 3105 (NH); 1728 (C=O); 1226 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 5

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 6

5.1.4 Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 2-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Byl získán olejovitý produkt, který byl po vytřepání do ethyl-acetátu podroben chromatografickému dělení na sloupci.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 Fluka (0,040 – 0,063 mm) – 300 g

Objem frakce: 100 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60 : 40

Produkt byl převážně obsažen ve frakcích 13 – 19. Krystalizací těchto frakcí z bezvodého ethanolu se nepodařilo získat čistý produkt, proto byla chromatografie opakována.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silpearl 125 g

Objem frakce: 50 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60 : 40

Po zakoncentrování frakcí 9 – 12 bylo získáno 0,7 g červeného odparku, z něž bylo krystalizací z bezvodého ethanolu získáno 0,25 g (5 %) produktu.

Molekulová hmotnost: 310,35

Vzhled: žlutooranžová krystalická látka

Teplota tání: 105 – 107 °C

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,44	3,25	9,03	20,66
Nalezeno:	46,60	3,25	8,96	20,23

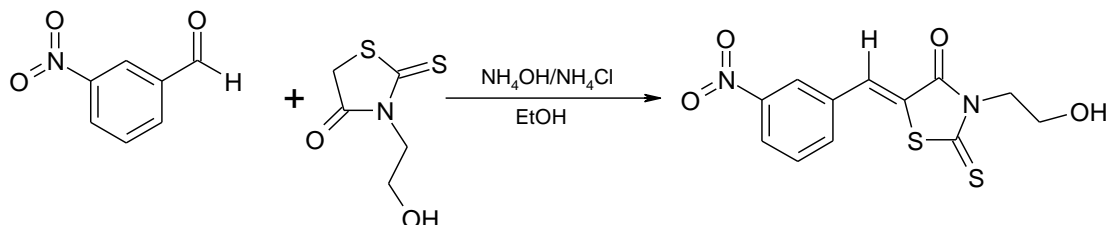
HPLC čistota: 98,99 %

IČ spektrum (KBr): 3458 (OH); 1716 (C=O); 1213 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 7

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 8

5.1.5 Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 3-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Bylo získáno 1,97 g (42 %). Pro analýzu byla sloučenina překrystalizována z bezvodého ethanolu. Bylo získáno 0,64 g (14 %) produktu.

Molekulová hmotnost: 310,35

Vzhled: žlutá práškovitá látka

Teplota tání: 217 – 220 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,44	3,25	9,03	20,66
Nalezeno:	46,79	2,97	9,12	20,46

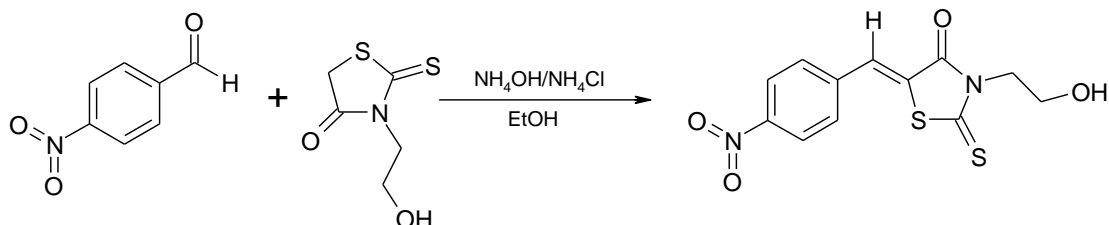
HPLC čistota: 87,84 %

IČ spektrum (KBr): 3448 (OH); 1716 (C=O); 1228 (C=S)

$^1\text{H-NMR}$ spektrum (300 MHz, DMSO-d_6): viz příloha 9

$^{13}\text{C-NMR}$ spektrum (75 MHz, DMSO-d_6): viz příloha 10

5.1.6 Příprava 3-(2-hydroxyethyl)-5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu



Směs 2,27 g (0,015 mol) 4-nitrobenzaldehydu, 2,00 g (0,015 mol) 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu, 1,1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku a 15 ml ethanolu bylo zahřáto k varu pod zpětným chladičem. K čiré směsi byl přidán roztok 1,00 g chloridu amonného ve 2 ml destilované vody zahřátý na 80 °C a reakční směs byla zahřívána do varu 2 hodiny. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty nejprve 50 ml destilované vody a potom 50 ml vodného ethanolu (1:1, v/v). Bylo získáno 2,38 g (51 %) hnědé krystalické látky. Podle výsledků TLC se jednalo o směs. Po krystalizaci z bezvodého ethanolu nedošlo k oddělení produktu, proto byla látka podrobena chromatografickému dělení na sloupci.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 Fluka (0,040 – 0,063 mm) – 300 g

Objem frakce: 100 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60 : 40

Požadovaný produkt byl zkoncentrován ve frakcích 16 – 21 a byl ponechán ke krystalizaci. Směsné frakce byly spojeny, zkoncentrovány a odparek byl podroben dalšímu chromatografickému dělení na sloupci.

Chromatografické podmínky:

Adsorbent: Silikagel 60 Merck (0,040 – 0,063 mm) – 200 g

Objem frakce: 50 ml

Soustava: benzín + ethyl-acetát 60 : 40

Požadovaný produkt byl obsažen ve frakcích 20 – 29, byl přidán k frakcím 16 – 21 z předešlé chromatografie. Frakce 30 – 35 obsahovaly směs látek Z jejich odparku se vyloučily krystaly, které byly po promytí ethanolem přidány ke krystalům z předešlých chromatografií. Krystalizací spojených frakcí bylo získáno 0,73 g produktu.

Molekulová hmotnost: 310,35

Vzhled: rezavě hnědá krystalická látka

Teplota tání: 202 – 205 °C

Teploty tání uvedené v literatuře [51]:

204 – 205 °C /*E*-izomer, rozpouštědlo neuvedeno/

Elementární analýza:

	% C	% H	% N	% S
Vypočteno:	46,44	3,25	9,03	20,66
Nalezeno:	46,66	3,37	8,87	20,15

HPLC čistota: 92,33 %

IČ spektrum (KBr): 3421 (OH); 1713 (C=O); 1219 (C=S)

¹H-NMR spektrum (300 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 11

¹³C-NMR spektrum (75 MHz, DMSO-d₆): viz příloha 12

5.2 Hodnocení biologické aktivity

5.2.1 Antifungální aktivita in vitro

Citlivost fungálních kmenů (*Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E 28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Trichophyton mentagrophytes* 445, *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272) na připravené látky byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou. Kmeny byly uchovávány na Sabouraudově dextrosovém agaru (SDA, Difco) při 4 °C. Před testováním byl každý kmen pasážován na SDA a inokula byla připravena suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospor ve sterilním

0,85% fyziologickém roztoku. Hustota buněk byla pomocí Bürkerovy komůrky upravena tak, aby zásobní suspenze obsahovala $(1,0 \pm 0.2) \times 10^5$ CFU/ml. Konečné inokulum bylo připraveno zředěním zásobní suspenze testovacím médiem v poměru 1:20. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Jejich antifungální aktivita pak byla stanovena v tkáňovém kultivačním mediu RPMI 1640 (Sevapharma), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,165 M 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonové kyseliny (Sigma). Konečná koncentrace DMSO v testovacím mediu byla max. 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), definované jako koncentrace vyvolávající 80% inhibici růstu ve srovnání s kontrolami, byly odečteny po 24 a 48 hodinách (v případě *T. mentagrophytes* po 72 a 48 hodinách) statické kultivace při teplotě 35 °C. Flukonazol a amfotericin B byly použity jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Minimální inhibiční koncentrace testovaných sloučenin

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC ₈₀ (μmol/l)							
		5.1.1	5.1.2	5.1.3	5.1.4	5.1.5	5.1.6	FLU	AMB
CA	24h	31,25	125	125	125	>125	>250	0,82	0,002
	48h	62,5	250	125	500	>125	>250	1,63	0,068
CT	24h	500	250	125	500	>125	>250	1,63	0,068
	48h	500	>250	>125	>500	>125	>250	>417,9	0,068
CK	24h	250	>250	>125	500	>125	>250	52,24	0,135
	48h	250	>250	>125	500	>125	>250	104,47	0,135
CG	24h	250	>250	>125	250	>125	>250	13,06	0,034
	48h	250	>250	>125	500	>125	>250	52,24	0,135
TA	24h	62,5	>250	>125	250	>125	>250	3,26	1,082
	48h	250	>250	>125	500	>125	>250	6,53	2,164
AF	24h	500	62,5	>125	>500	>125	>250	>417,9	0,271
	48h	250	250	>125	>500	>125	>250	>417,9	0,135
AC	24h	500	125	>125	>500	>125	>250	>417,9	1,082
	48h	250	250	>125	>500	>125	>250	>417,9	2,164
TM	72h	62,5	62,5	125	250	>125	250	26,12	1,082
	120h	62,5	62,5	125	250	>125	250	52,24	1,082

5.2.2 Antimykobakteriální aktivita in vitro

Primární hodnocení všech sloučenin byl provedeno v dávce 6.25 µg/ml vůči *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) v BACTEC 12B mediu pomocí mikrodiluční bujónové metody (Microplate Alamar Blue Assay, MABA) [52]. Sloučeniny vykazující v tomto testu fluorescenci byly dále hodnoceny pomocí radiometrického systému BACTEC 460 [52].

Tímto způsobem byly zatím hodnoceny sloučeniny 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.1), 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.2), 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.3). Žádná z nich nevykázala inhibici 90 % nebo vyšší. Nejsilnější inhibiční účinek měl 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (72 %), dále 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (47 %) a 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (43 %).

5.2.3 Vliv na fotosyntetické procesy

a) Hodnocení inhibičního vlivu na obsah chlorofylu v řasách Chlorella vulgaris

Řasy byly staticky kultivovány 7 dní (fotoperioda: 16 hodin na světle / 8 hodin ve tmě; osvětlení: 60 µEs⁻¹m⁻² PAR; pH = 7,2) při laboratorní teplotě [53]. Obsah chlorofylu v suspenzi řas byl určován spektrofotometricky po extrakci do ethanolu [54]. Na začátku kultivace byl obsah chlorofylu 0,1 mg/l. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO; jeho konečná koncentrace v suspenzi řas byla maximálně 0,5 % (v/v). Kontroly obsahovaly stejné množství DMSO jako suspenze se zkoušenými sloučeninami. Inhibice je vyjádřena jako % inhibice v koncentračním rozmezí 0,83 – 100 µmol/l. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

b) Hodnocení inhibičního vlivu na fotosyntetickou aktivitu chloroplastů

Rychlost vývoje kyslíku (oxygen evolution rate – OER) v chloroplastech *Spinacea oleracea* (obsah chlorofylu = 30 mg/l) byla určována spektrofotometricky (Specord UV VIS, Zeiss Jena, Germany) v přítomnosti 2,6-dichlorfenol-indofenolu jako akceptoru elektronů podle [55]. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Konečná koncentrace DMSO byla

maximálně 5 % (v/v) a neovlivňovala vývoj kyslíku. Inhibiční aktivity jsou vyjádřeny pomocí IC₅₀, tj. koncentrací vyvolávajících 50% inhibici vývoje kyslíku ve srovnání s kontrolami. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Inhibiční vliv na fotosyntetické procesy

Sloučenina	<i>Chlorella vulgaris</i> inhibice [%]	OER IC₅₀ [μmol/l]
5.1.1	N [*]	427,6
5.1.2	85,7	16,9
5.1.3	87,1	20,1
5.1.4	26,2	127,4
5.1.5	N [*]	N [*]
5.1.6	29,9	N [*]

* neodečteno

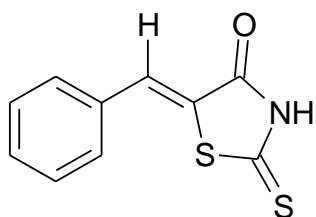
6. DISKUSE

Cílem mé diplomové práce bylo navázat na diplomovou práci E. Španingerové a připravit další sérii kondenzačních produktů rhodaninu a 3-(2-hydroxyethyl)-rhodaninu s aromatickými aldehydy.

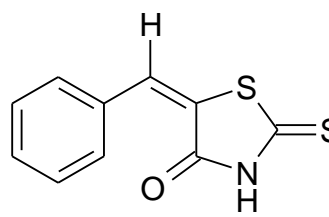
Postup Knoevenagelovy kondenzace rhodaninu s karbonylovými sloučeninami ve vodně-alkoholickém roztoku za katalýzy směsí $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ byl použit pro syntézu kondenzačních produktů rhodaninu s ketony v rámci diplomové práce J. Doležela [57], i pro kondenzaci rhodaninu s benzaldehydem a jeho hydroxy- a methoxy deriváty v diplomové práci E. Španingerové [31]. Stejnou metodu jsem zvolila i pro svoji diplomovou práci. Produkt se začal z reakční směsi většinou vylučovat hned pro přidání amoniaku a chloridu amonného, proto jsem se rozhodla zkrátit reakční dobu z pěti na dvě hodiny. Výtěžky surového produktu byly v případě 3-nesubstituovaných derivátů uspokojivé (68 – 89 %). V případě 3-(2-hydroxyethyl)rhodaninu byly výtěžky nižší. Pro získání analyticky čistého produktu stačila v některých případech krystalizace z bezvodého ethanolu, některé produkty musely být z reakční směsi odděleny chromatograficky a potom překrystalizovány.

Charakterizace produktů a ověření jejich čistoty bylo provedeno běžnými metodami (elementární analýza, HPLC, IČ spektra a NMR spektra). Zajímavé je zjištění, že výsledky elementární analýzy nejsou vždy v souladu s výsledky HPLC, např. u 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.1) je prvková analýza nevyhovující, ale podle HPLC má produkt 99,46% čistotu. Naopak u 3-(2-hydroxyethyl)-5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.5) jsou výsledky prvkové analýzy v souladu s vypočtenými hodnotami, ale při HPLC byla zjištěna pouze 87,84% čistota. Zda se jedná o experimentální chybu, nebo skutečný vliv znečištěnin, nemohu na základě dostupných údajů posoudit.

Benzylidenrhodaniny mohou tvořit dvě izomerní formy:



Z-izomer



E-izomer

Podle většiny literárních údajů vzniká při syntéze *Z*-izomer. Obě izomerní formy je možno rozlišit na základě NMR spekter. ^1H -NMR signály vodíku methinové skupiny *Z*-izomerů leží při vyšších hodnotách magnetického pole než v případě *E*-izomerů [58, 59, 60]. Hodnoty NMR signálu vodíku methinové skupiny pro rhodaninové deriváty studované v této práci kalkulované pomocí počítačového programu, nalezené v literatuře a experimentálně určené jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Srovnání ^1H NMR signálu vodíku methinové skupiny

Sloučenina	<i>E</i> -izomer	<i>Z</i> -izomer ^a	Publikované hodnoty	Experimentální hodnota
5.1.1	7,36 ^a 8,28 ^b	7,98 ^a 8,36 ^b	N	7,86
5.1.2	6,91 ^a 7,83 ^b	7,53 ^a 7,91 ^b	7,76 ^c	7,70
5.1.3	6,94 ^a 7,86 ^b	7,56 ^a 7,94 ^b	7,79 ^c	7,70
5.1.4	7,36 ^a 8,28 ^b	7,98 ^a 8,36 ^b	N	8,02
5.1.5	6,91 ^a 7,83 ^b	7,53 ^a 7,91 ^b	N	7,94
5.1.6	6,94 ^a 7,86 ^b	7,56 ^a 7,94 ^b	N	7,88

^aCS ChemOffice 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); ^bCS ChemOffice 10.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.); ^ckonfigurace neuvedena [56].

Na základě experimentálně získaných $^1\text{H-NMR}$ posunů mnou připravených produktů lze pouze konstatovat, že všechny sloučeniny byly získány jako čisté izomery. K definitivnímu rozhodnutí, zda se jedná o *Z*- nebo *E*-izomer by bylo nutné provést další experimenty, nejlépe rentgenografickou analýzu. Tato metoda je však finančně náročná a vyžaduje velmi čisté krystaly.

U produktů získaných v mé diplomové práci bylo již provedeno hodnocení antifungální aktivity. Testy byly provedeny na Katedře biologických a lékařských věd FaF UK v Hradci Králové. Z výsledků uvedených v tabulce 1 vyplývá, že připravené kondenzační produkty rhodaninu s aldehydy nevykazují ve srovnání s flukonazolem a amfotericinem B významnou antifungální aktivitu. V případě 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.1) byla zaznamenána střední antifungální účinnost, tj. MIC = >10 – 100 $\mu\text{mol/l}$, vůči *C. albicans*, *T. asahii* a *T. mentagrophytes*. 5-(3-Nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.2) vykázal střední účinnost vůči *A. fumigatus* a *T. mentagrophytes*. 5-(4-Nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.3) byl prakticky neúčinný. Substituce vodíku na N^3 rhodaninového kruhu 2-hydroxyethylovou skupinou vede jednoznačně k vymizení antifungálního účinku. Příčinou může být nižší lipofilita 3-(2-hydroxyethyl)derivátů, jak vyplývá z hodnot vypočítaných pomocí programu CS ChemDraw Ultra, ver. 10.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.) Hodnota $\log P$ je pro *N*-nesubstituované sloučeniny 2,49 a pro 3-(2-hydroxyethyl) deriváty 2,04. Jak vyplývá z teoretické části, antifungální účinky rhodaninových derivátů už byly studovány dříve. Porovnání antifungální účinnosti rhodaninových derivátů popsaných v této diplomové práci s aktivitou publikovanou pro analogické sloučeniny však nelze provést, protože v každé studii byla použita jiná metoda hodnocení antifungálních účinků. Výsledky hodnocení antifungální aktivity benzylidenrhodaninů připravených na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv byly již částečně publikovány – viz příloha 13 (poster).

U *N*-nesubstituovaných nitrobenzylidenrhodaninů (5.1.1, 5.1.2 a 5.1.3) byla již testována antimykobakteriální aktivita. Hodnocení bylo provedeno v *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility* (TAACF). Bohužel žádný

z derivátů nedosáhl 90% inhibiční účinnosti a nemohl tedy podle kritérií stanovených TAACF postoupit do dalších fází testování.

Hodnocení vlivu na fotosyntetické procesy bylo provedeno v Chemickém ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. *N*-Nesubstituované deriváty silně inhibovaly tvorbu chlorofylu v řasách *Chlorella vulgaris*. Účinek 3-(2-hydroxyethyl)derivátů byl podstatně nižší. Stejně jako v případě antifungálních účinků je příčinou nižší aktivity patrně snížená lipofilita. V testu sledujícím rychlost vývoje kyslíku v chloroplastech *Spinacea oleracea* byla nejvyšší aktivita zjištěna u 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.2) a 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.3). Ve srovnání se známým herbicidem atrazinem ($IC_{50} = 1,0 \mu\text{mol/l}$) [61] však byly nitrobenzylidenrhodaniny méně účinné. Porovnání IC_{50} hodnot pro 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.1) a 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (5.1.4) naznačuje, že vliv hydroxyethylderivátů na OER bude vyšší než u 3-nesubstituovaných rhodaninů. Inhibiční konstanty pro odpovídající izomery se bohužel nepodařilo odečíst (sloučenina 5.1.5 působila změnu zbarvení roztoku 2,6-dichlorfenol-indofenolu a sloučenina 5.1.6 vytvářela zákal), a proto tento předpoklad nemůže být definitivně potvrzen.

7. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem připravila následující produkty:

- 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 3-(2-hydroxyethyl)-5-(3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on
- 3-(2-hydroxyethyl)-5-(4-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on

S výjimkou 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu (5.1.4) byly všechny tyto sloučeniny již dříve připraveny, ale jejich fyzikálně-chemická charakterizace je často neúplná, především pokud se jedná o spektrální údaje. V mé diplomové práci jsou tyto údaje doplněny.

Při testování biologické aktivity byla zjištěna střední antifungální účinnost u *N*-nesubstituovaných derivátů. Zavedení 2-hydroxyethylového zbytku na dusík mělo za následek snížení antifungální účinnosti.

Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu měl 5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on (72 %), nestačila však pro postup do další fáze testování. Aktivita 3-(2-hydroxyethyl)derivátů proti *M. tuberculosis* nebyla zatím testována.

Vliv na fotosyntetické procesy byl hodnocen u všech připravených sloučenin. *N*-nesubstituované deriváty vykazaly vysoké procento inhibice tvorby chlorofylu v *Chlorella vulgaris*, inhibice vývoje kyslíku v chloroplastech (OER) byla naopak vyšší u 3-(2-hydroxyethyl)-5-(2-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu než u odpovídajícího *N*-nesubstituovaného derivátu.

8. LITERATURA

1. GREENWOOD, D.; SLACK, R. C. B.; PEUTHERER, J. F. et al.: *Lékařská mikrobiologie* (z angl.orig. Medical microbiology: A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control), GRADA Publishing, Praha 1999, s. 17, 26 – 28, 52 – 53, 69 – 76, 215 – 224, 239 – 242, 564 – 581.
2. Revised WHO Fact Sheet No.194, *Antimicrobial resistance* [online] 2002 [cit 2007-03-01]. Dostupné z URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html>
3. TANG, E.; YANG, G.; YIN, J.: Studies on the synthesis of 5-(*p*-aminobenzylidene)-rhodanine and its properties. *Spectrochim Acta A, Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, 59, 651 – 656.
4. REDEMANN, C. E.; ICKE, R. N.; ALLEN G. A.: Rhodanine. In: *Org. Syntheses, Vol. 27*. Shiner, R. L. et al. (Edits.). John Wiley & Sons, Inc., New York 1947, 73 – 76.
5. BROWN, F. C.; BRADSHER, C. K.; LAWTON, E. N.: Mildew preventing activity of rhodanine derivatives. *J. Ind. Eng. Chem.* **1953**, 45, 1027 – 1030.
6. INAMORI, Y. et al.: Insecticidal and antifungal activities of aminorhodanine derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 1025 – 1027.
7. KERST, A. F.; DOUROS, J. D. Jr.; BROKL, M.: *Controlling algae with 5-(5-barbiturylidene)rhodanine*. USA pat. US 3,765,864. 1973-10-16. [cit 2007-03-05]. Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>
8. SUDO, K. et al.: Novel hepatitis C virus protease inhibitors: thiazolidine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 238, 643 – 647.
9. DAYAM, R. et al.: β -Diketo acid pharmacophore hypothesis. 1. Discovery of a novel class of HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 111 – 120.
10. SHIH, S. R. et al.: Selective human enterovirus and rhinovirus inhibitors: An overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules. *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 449 – 474.
11. HABIB, N. S. et al.: Synthesis and antimicrobial activity of rhodanine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 759 – 762.
12. SREE LAKSHMI, V.: Antimicrobial effects of nitrobenzaldehyde rhodanine. *Egypt. J. Microbiol.* **1989**, 24, 247 – 250.

13. FOYE, W. O.; AN, S. H.: Synthesis of *N*-glycosylthioureas, *N*-glycosylrhodanines, and *N*-glycosyl-2-aminothiazoles and their antimicrobial activity. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1059 – 1064.
14. ZERVOSEN, A. et al.: Interaction between penicilin-binding protein (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 961 – 969.
15. JOHNSON, S. L. et al: Anthrax lethal factor protease inhibitors: synthesis, SAR, and structural-based 3D QSAR studies. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 27 – 30.
16. SIM, M. M. et al.: Benzylidene rhodanine as novel inhibitors of UDP-*N*-acetylmuramate/L-alanine ligase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 697 – 699.
17. MA, Y. et al.: Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1407 – 1416.
18. STAINIER, C.; LAPIERE, C. L.: Quelques dérivés de la rhodanine à action tuberculostatique in vitro. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* **1958**, *23*, 335 – 345.
19. SORTINO, M. et al.: Synthesis and antifungal activity of (*Z*)-5-arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *15*, 484 – 494.
20. ORCHARD, M. D. et al.: Rhodanine-3-acetic acid derivates as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3975 – 3978.
21. MACKIE, A. et al.:Rhodanine derivatives as possible anthelmintics. *J. Chem. Soc.* **1954**, 3919 – 22.
22. KAWAKAMI, M. et al.: Synthesis and evaluation of novel rhodacyanine dyes that exhibit antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3151 – 3160.
23. AHN, J. H. et al: Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2996 – 2999.
24. CUTSHALL, N. S.; O'DAY, C.; PREZHDO, M.: Rhodanine derivatives as inhibitors of JSP-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3374 – 3379.
25. SILVA, A. A. R. et al.: Antiedematogenic activity of two thiazolidine derivatives: *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl)-4-hydroxybenzylidene)rhodanine (GS26) and *N*-tryptophyl-5-(3,5-di-*tert*-butyl)-4-hydroxybenzylidene)-2,4-thiazolidindione (GS28). *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1351 – 1355.

26. GIDDA, J. S. et al.: *Method of treating inflammatory bowel disease*. USA pat. US 5,216,002. 1993-01-06. [cit 2007-03-08]. Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>
27. BUE-VALLESKEY, J. M. et al.: *Compounds useful as hypoglycemic agents and for treating Alzheimer's disease*. USA pat. US 5,716,975. 1998-10-02. [cit 2007-03-08]. Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>
28. ESSWEIN, A. et al: *Rhodanine carboxylic acid derivatives for the treatment and prevention of metabolic bone disorders*. USA pat. US 6,673,816. 2004-06-01. [cit 2007-03-08]. Dostupné z URL: <http://www.freepatentsonline.com/>
29. OKA, M.; KATO, N.: Aldose reductase inhibitors. *J. Enzyme Inhib.* **2001**, *16*, 465 – 473.
30. HOTTA, N. et al.: Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative aldose reductase inhibitor – diabetes complications trial. *Diabetes Care* **2006**, *29*, 1538 – 44.
31. ŠPANINGEROVÁ, E.: Kondenzační produkty aldehydů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2004**.
32. BOYD, D. B.: On the rhodanine and their presence in biologically active ligands. *J. Mol. Struct. (Teochem)* **1997**, *401*, 227 – 234.
33. HARTL, J. et al.: *Farmaceutická chemie IV.*, Nakladatelství Karolinum, Praha **2006**, s. 35 – 37, 69 – 72.
34. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision [online] ver. 2007: [cit 2007-03-11]. Dostupné z URL <http://www.who.int/classifications/icd/en/>
35. ROGERS, T. R.: Pharmacology, metabolism, nutrition. *Curr. Opin. Crit. Care* **2001**, *7*, 238 – 241.
36. VAJPAI, R.; TIWARI, B. M. L.; TIWARI, K. S.: A comparative study of synthesis, characterisation and applications of 5-(salicylidene)rhodanine and 5-(2-hydroxynaphthalidene)rhodanine. *Asian J. Chem.* **1999**, *11*, 414 – 419.
37. BAJPAI, R.; TIWARI, K. S.; TIWARI, B. M. L.: Synthesis, characterisation and applications of some new 5-substituted-4-thiazolidinone-2-thioxo azo derivatives. *Asian J. Chem.* **2000**, *12*, 1199 – 1208.
38. MALLICK, S. K.; MARTIN, A. R.; LINGARD, R. G.: Synthesis and antimicrobial evaluation of some 5-(5-nitrofurylidene)rhodanines, 5-(5-

- nitrofurylidene)thiazolidine-2,4-diones, and their vinylogs. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 528 – 532.
39. GUPTA, S. P.; RANI, S.: Synthesis of fungitoxicity of some 5-substituted-3-polynitrophenyl rhodanines. *J. Indian Chem. Soc.* **1978**, *55*, 483 – 485.
40. BROWN, F. C.; BRADSHER, C. K.; SCOTT, W. C.: Synthesis and antimicrobial activity of some 5-(1-methylalkylidene)-2,4-thiazolidinediones. *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 1269 – 1271.
41. DAS, K.; PANDA D.; DASH, B.: Rhodanine derivatives. *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 58 – 60.
42. GUPTA, A. K. S. et al.: Antimicrobial and anticholinesterase activities of 5-(4-substituted phenyl)methylene-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidinylmethylamino derivatives. *Ind. J. Pharm. Sci.* **1983**, *45*, 165 – 168.
43. BROWN, F. C. et al.: Some 3-substituted rhodanines. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 384 – 388.
44. CHOPRA, I.: Approaches to antibacterial drug discovery. *Expert Opin. Investig. Drugs* **1997**, *6*, 1019 – 24.
45. GRANT, B. E. et al.: The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C β -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2179 – 2182.
46. GUALTIERI, M. et al.: *In vitro* activity of a new antibacterial rhodanine derivative against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 778 – 783.
47. NAYYAR, A.; JAIN, R.: Recent advances in new structural classes of anti-tuberculosis agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1873 – 1886.
48. KIEĆ-KONONOWICZ, K., SZYMAŃSKA E.: Antimycobacterial activity of 5-arylidene derivatives of hydantoin. *Farmaco* **2002**, *57*, 909 – 916.
49. MURO, C. et al.: Inhibitory activities of rhodanine derivatives on plant growth. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1368 – 1371.
50. SAGURA, J. J.; UNRUH, C. C.: *Light-sensitive rhodanine esters of maleic anhydride copolymers*. USA pat. US 2,824,087. 1958-02-18. [cit 2007-03-30]. Dostupné z URL: http://ep.espacenet.com/?locale=en_EP
51. CrossFire Beilstein [databáze online]. Elsevier MDL [cit. 2007-04-23]. Dostupné z URL: http://www.mdli.com/products/knowledge/crossfire_beilstein
52. COLLINS L. A.; FRANZBLAU, S. G.: Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against

- Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004-1009
53. MELNÍK, M.: Inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* by Cu(II) complexes with biologically active ligands. *J. Trace Microprobe Techn.* **1998**, *16*, 491-500
54. WELLBURN, A. R.: The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 307-313
55. KRÁLOVÁ, K.; ŠERŠEŇ, F.; SIDÓOVÁ, E: Photosynthesis inhibition produced by 2-alkylthio-6-R-benzothiazoles. *Chem. Pap.* **1992**, *46*, 348-350
56. LUO, J., LI, Y., ZHOU, M.: Condensation of aryl aldehydes with rhodanine in water media catalyzed by Tween 80. *Chemical Journal on Internet* **2006**, *8*, 17. [cit 2007-04-25]. Dostupné z URL: <http://www.chemistrymag.org/cji/2006/083017ne.htm>
57. DOLEŽEL, J.: Kondenzační produkty acetylpyrazinů s rhodaninem jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové **2004**.
58. WHITESITT, C. A. et al.: Synthesis and structure-activity relationships of benzophenones as inhibitors of cathepsin D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2157 – 2162.
59. KHODAIR, A. I.: A Convenient synthesis of 2-arylidene-5H-thiazolo[2,3-b]quinazoline-3,5[2H]-diones and their benzoquinazoline derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* **2002**, *39*, 1153 – 1160.
60. OHISHI, Y. et al.: Preparations of 5-alkylmethylidene-3-carboxymethylrhodanine derivatives and their aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1911 – 1919.
61. CARPENTIER, R. et al.: A second site for herbicide action in Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *808*, 293-299.