

OBSAH

1. Úvod a cíl diplomové práce	5
2. Teoretická část	6
2.1 Chalkony	6
2.2 Hemostáza a agregace destiček.....	6
2.2.1 Antiagregačně působící chalkony	8
2.3 Chronická žilní nedostatečnost a varixy	13
2.3.1 Chalkony s příznivými účinky na chronickou žilní nedostatečnost	13
2.4 Vazodilatační účinky	14
2.4.1 Vazodilatačně působící chalkony	16
2.5 Angiotenzin-konvertující enzym (ACE).....	18
2.5.1 Chalkony inhibující ACE.....	18
2.6 Lipidy v lidském těle	19
2.6.1 Chalkony ovlivňující lipidový metabolismus.....	20
2.7 Oxidační stres	22
2.7.1 Antioxidačně působící chalkony.....	23
3. Experimentální část.....	26
3.1 Obecná část.....	26
3.2 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů.....	27
3.3 Příprava acetylpyrazinů	30
3.4 Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-arylprop-2-en-1-onů Claisen-Schmidtovou kondenzací	33
4. Diskuse.....	39
5. Závěr.....	41
6. Seznam literatury	42
7. Přílohy.....	47
7.1 Příloha 1 <i>Abstrakt diplomové práce</i>	47
7.2 Příloha 2 <i>Abstract of diploma thesis</i>	48

1. Úvod a cíl diplomové práce

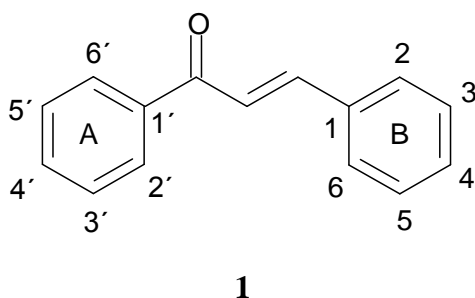
Cílem této práce byla příprava série pyrazinových analogů chalkonů s methoxylovou skupinou v poloze 4 na kruhu B a různými alkylovými řetězci na kruhu A. Práce navazuje na předchozí série pyrazinových analogů chalkonů připravených na této katedře.

V teoretické části se práce zabývá vlivem chalkonů a jim příbuzných sloučenin na kardiovaskulární systém. V přírodě se vyskytující chalkony charakterizuje přítomnost hydroxylových a methoxylových skupin. Sloučeniny s těmito substituenty jsou schopny ovlivňovat propustnost cév, agregaci krevních destiček, vazodilataci i žilní tonus. Proto byly syntetizovány pyrazinové analogy derivátů chalkonů s methoxyskupinou na fenylovém zbytku.

2. Teoretická část

2.1 Chalkony

Chalkony jsou sloučeniny, které se běžně nacházejí v přírodě. Jsou považovány za prekurzory všech flavonoidních sloučenin¹. Z chemického hlediska se jedná o 1,3-diarylprop-2-en-1-ony (**1**). Skládají se tedy ze dvou aromatických jader, která jsou spojena tříuhlíkatým α,β -nenasyceným řetězcem nesoucím karbonylové uskupení. Chalkony vyskytující se v přírodě mohou být různě substituovány na obou aromatických kruzích, nejčastěji nesou hydroxylové a methoxylové skupiny. Jednoduchá vazba mezi uhlíkem karbonylu a α -uhlíkem umožňuje výskyt dvou izomerních forem: *s-cis* a *s-trans*, přičemž termodynamicky stabilnější je *s-cis*-izomer. Co se týče izomerie dvojné vazby, chalkony se vyskytují nejčastěji jako *E*-izomery.



Chalkony vykazují široké spektrum biologických vlastností. K jejich farmakologickým účinkům patří antioxidační, baktericidní, antifungální, antikarcinogenní, protizánětlivé, vazodilatační, venotonické, antiagregační a jiné. Některé z nich již našly své uplatnění v praxi. Hesperidinmethylchalcon se jako součást přípravku Cyklo 3 Fort používá v léčbě chronické žilní nedostatečnosti dolních končetin². Jako inhibitor fosfodiesterasy III je využíván isolikviritigenin a jako choleretikum a diuretikum pak metochalcon³.

2.2 Hemostáza a agregace destiček

Proces hemostázy se skládá ze tří fází: vaskulární, destičkové a koagulační. V první fázi dochází po poranění tkání ke kontaktu organel z poškozených buněk s krví. Následuje vyplavení tkáňového tromboplastinu (tkáňového faktoru) a adenosindifosfátu (ADP). Zároveň dojde k vazokonstrikci, a tím snížení průtoku krve poškozenou oblastí. Druhou fází charakterizuje agregace trombocytů a jejich adheze k endoteliálnímu

povrchu. Přidává se další vyplavení adenosindifosfátu, produkce endoperoxidů, tromboxanu A₂ (TXA₂) a trombinu. V poslední fázi jsou aktivovány koagulační faktory. Existují dvě cesty aktivace těchto faktorů: vnitřní (intrinsic) a vnější (extrinsic). Oba systémy sestávají z množství vzájemně spojených proteasových reakcí, které přeměňují neaktivní proenzymy na aktivní formy. Ve vnitřním systému jsou aktivovány faktory XI, XII a kininy tzv. kontaktní aktivací, kontaktem krve s organelami poškozených buněk a s matrix cévní stěny. Tkáňový tromboplastin aktivuje vnější cestu, a tím i faktor VII za přispění vitamínu K. Nedílnou součástí aktivační kaskády tvoří právě vitamín K a vápenaté ionty, bez kterých by aktivace faktorů VII, IX, X, protrombinu a proteínu C nebyla možná. Vnitřní a vnější cesta se spojují v jednu společnou, v níž dochází k aktivaci faktoru X, k přeměně protrombinu na trombin, a tím konverzi fibrinogenu na nerozpustný fibrin⁴.

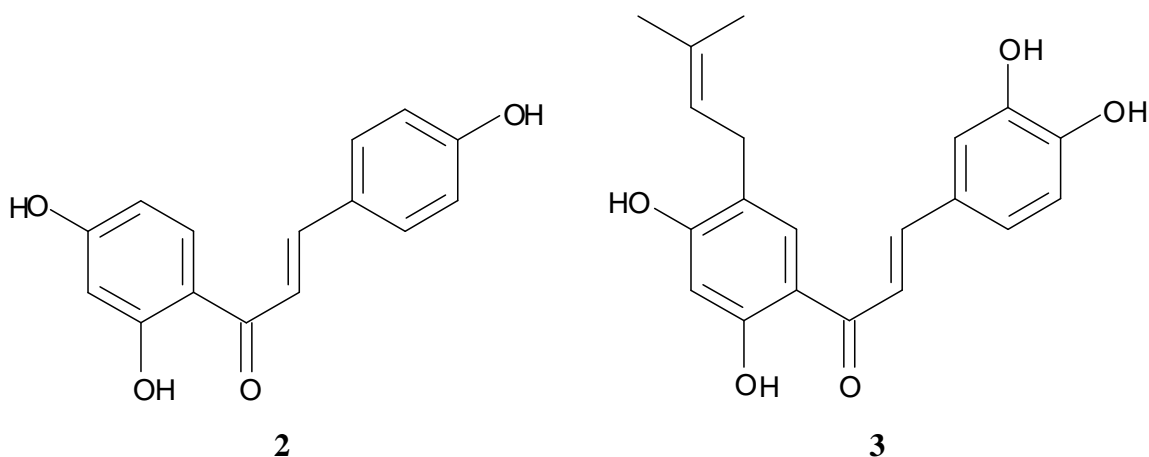
Úloha krevních destiček při hemostáze je mnohostranná. Jsou nepostradatelné pro normální funkci cévní stěny, účastní se procesu plazmatické koagulace a hrají klíčovou roli v primární hemostáze. Trombocyty mají diskovitý tvar a jejich buněčná membrána je nositelem základních hemostatických funkcí destiček – adheze, aktivace, agregace a prokoagulační schopnosti. Předpokladem prvních tří funkcí je přítomnost specifických glykoproteinů zakotvených v membráně – receptorů. V plazmě trombocytů se nachází specifické skladovací granule, jednak tzv. velmi hutné granule obsahující především ADP, jednak α -granule s obsahem von Willebrandova faktoru, fibrinogenu, trombospondinu a dalších činitelů podílejících se na hemostáze. Interakcí aktivátorů s povrchovými receptory dojde k nastartování řetězce metabolických dějů, které vedou až k uvolnění ADP a syntéze tromboxanu A₂ (TXA₂), hlavních mediátorů agregace. K těmto dějům patří metabolismus polyfosfoinozitudů, uvolňování vázaného vápníku a metabolismus kyseliny arachidonové. Tyto děje modulují cAMP a cGMP. Při poranění cévní stěny trombocyty adherují na odkryté subendotelové struktury, především kolagen a von Willebrandův faktor. Interakce trombocytů se subendoteliem aktivuje krevní destičky s následným uvolněním ADP a syntézou tromboxanu A₂. Ty pak vyvolávají agregaci okolních trombocytů. Adhezí a agregací krevních destiček vzniká tzv. primární hemostatická zátka⁵.

Agregace destiček a tvorba trombů v arteriální krvi přispívá ke vzniku aterosklerotických plátů a může způsobit vznik koronární okluze a infarktu myokardu. Látky, které agregaci inhibují, se proto podávají jako specifická profylaxe arteriální trombózy a hrají důležitou roli v sekundární prevenci infarktu myokardu⁴.

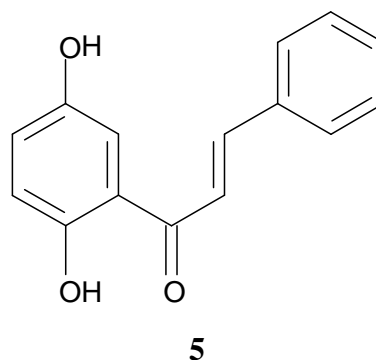
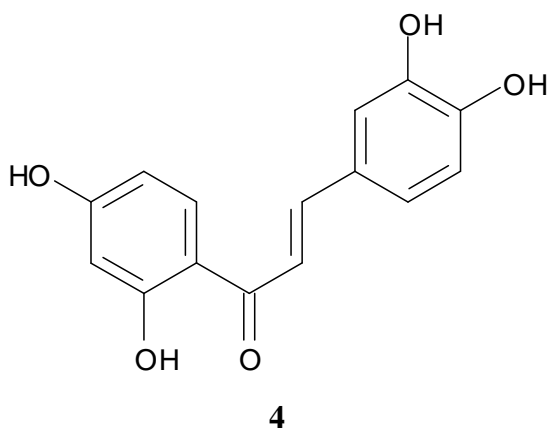
2.2.1 Antiagregačně působící chalkony

Některé z léčiv, která se používají jako antiagregancia, inhibují cyklooxygenasu, čímž blokují tvorbu agregačně působícího tromboxanu A₂. Tímto mechanismem se předpokládá, že působí proti agregaci trombocytů isolikviritigenin (2), brousochalkon A (3) a synteticky připravený butein (4) a jeho analogy. V testech *in vitro* na humánních trombocytech vykazoval isolikviritigenin (2) aktivitu srovnatelnou s kyselinou acetylsalicylovou. Inhiboval agregaci vyvolanou ADP a kolagenem⁶. Jiné prameny uvádějí dobré výsledky i u agregace způsobené trombinem⁷. Podstatou jeho účinku je pravděpodobně jednak inhibice cyklooxygenasy, jednak snížení aktivity lipoxygenasy a peroxidasy v trombocytech.

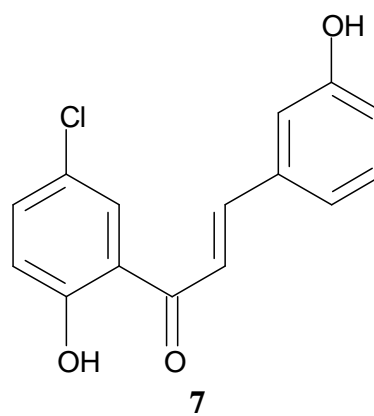
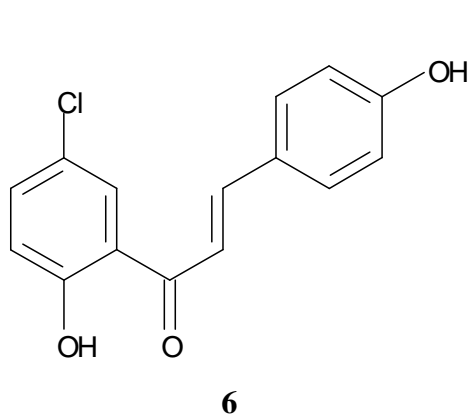
Antiagregační aktivita brousochalkonu A (3) byla pozorována v testech s králičími trombocyty agregovanými pomocí kyseliny arachidonové a kolagenu. Brousochalkon A (3), izolovaný z *Broussonetia papyrifera*, snižoval také adrenalinem navozenou agregaci destiček v plazmě. Jeho aktivita je přičítána schopnosti inhibovat cyklooxygenasu a snížit tvorbu tromboxanu.



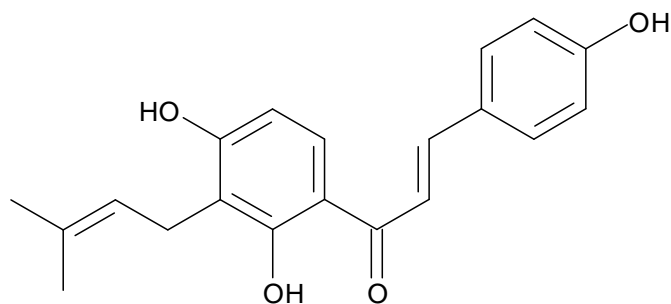
Další studie⁸ se zabývala antiagregačními účinky buteinu (4) a jeho analogů. Všechny sloučeniny inhibovaly agregaci králičích trombocytů vyvolanou kyselinou arachidonovou a některé i agregaci navozenou kolagenem. Vliv sloučenin na srážení lidské plazmy bohaté na destičky, které bylo indukováno adrenalinem, závisel na koncentraci. Butein (4) a chalkon 5 byly účinné již při nižších koncentracích⁶.



Byly studovány také synteticky připravené deriváty 1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onu. Nejvyšší antiagregační aktivitu vykazovaly sloučeniny **6** a **7**, druhá zmíněná pak předčila aktivitu pozitivní kontroly (kyselina acetylsalicylová a isolikviritigenin).

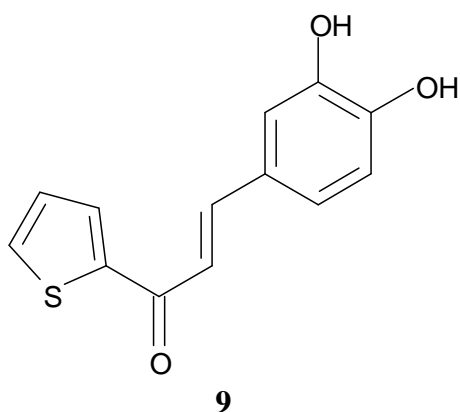


Isobavachalkon (**8**), izolovaný ze semen *Psoralea corylifolia*, inhiboval nejvýrazněji agregaci králičích destiček navozenou pomocí kyseliny arachidonové, zatímco v testech s kolagenem a destičky aktivujícím faktorem vykazoval účinnost menší⁶.

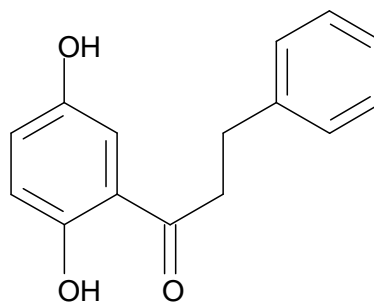


8

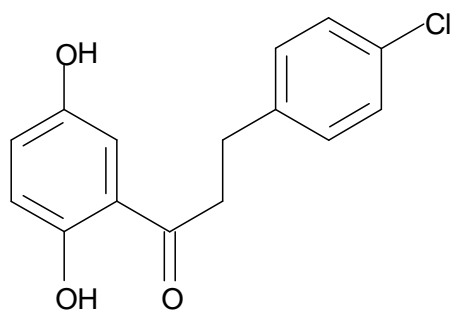
Ve studii z roku 2004 Ko *et al.* zkoumali vliv struktury sloučenin na jejich antiagregační aktivitu. Zjistili, že pokud je benzenový kruh B nahrazen thienylovým zbytkem, zvýší se inhibiční efekt na agregaci navozenou kyselinou arachidonovou. *O*-methylace v polohách C3 a C4 a demethylace v poloze C2' naopak účinnost sloučenin nezvýší. Ze studie vyplývá, že sloučeniny **9**, **10** a **11** jsou nadějnými inhibitory agregace trombocytů vyvolané kyselinou arachidonovou. Účinek lze pravděpodobně vysvětlit snížením aktivity cyklooxygenasy a produkce tromboxanu či inhibicí tromboxansynthasy. Sloučeniny **11**, **12** a **13** inhibovaly agregaci indukovanou PAF (platelet-activating factor), což může být zapříčiněno jejich schopností antagonizovat vápník nebo inhibovat intracelulární mobilizaci vápníku. Sloučeniny **10** a **11** vykazují inhibiční efekt na produkci oxidu dusnatého a na indukovatelnou expresi proteinu NO-synthasy. Zároveň sloučenina **11** inhibuje i aktivitu cyklooxygenasy-2⁹.



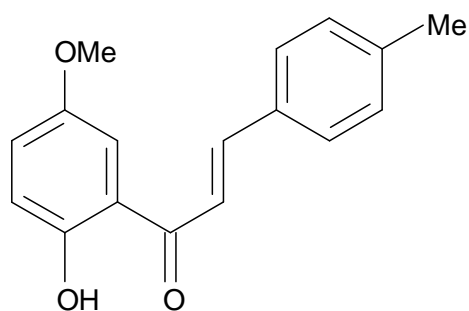
9



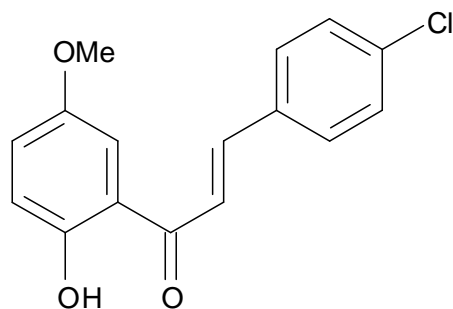
10



11

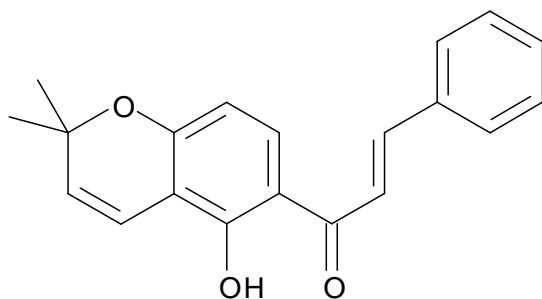


12

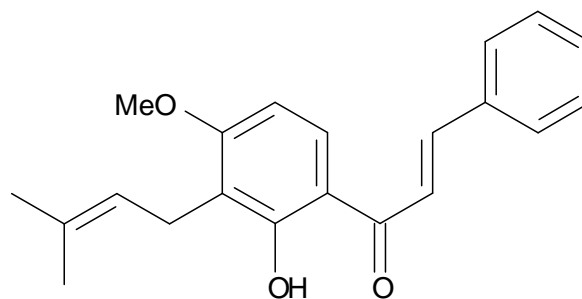


13

Z hexanové frakce extraktu z kořenů *Lonchocarpus sericeus* byly izolovány chalkony lonchokarpin (**14**) a derricin (**15**). Testy ukázaly, že tyto dvě látky významně inhibovaly agregaci trombocytů v lidské plazmě vyvolanou ADP, kyselinou arachidonovou, trombinem, kolagenem a adrenalinem. Přidání lonchokarpinu nebo derricinu k pentoxifylinu způsobilo potenciaci inhibice agregace oproti testům s lonchokarpinem či derricinem samotným. Předpokládá se, že tyto sloučeniny inhibují fosfodiesterasu nebo zvyšují intracelulární hladiny cyklického adenosinmonofosfátu a cyklického guanosinmonofosfátu či inhibují tvorbu tromboxanu¹⁰.

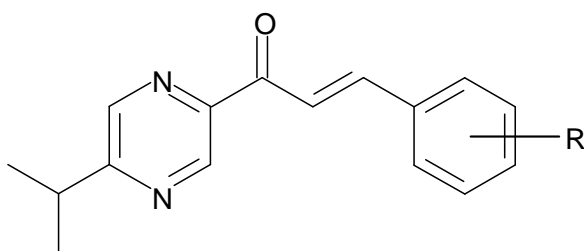


14



15

Sloučeniny **16** – **19**, které byly připraveny na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Faf UK, inhibovaly agregaci destiček navozenou kyselinou arachidonovou v závislosti na dávce. Sloučenina **16**, s methoxyskupinou v poloze 3 a hydroxylem v poloze 4 benzenového kruhu, vykazovala nejvyšší aktivitu z těchto látek a dokonce svým účinkem předčila kyselinu acetylsalicylovou, která byla použita jako pozitivní kontrola. Mezi deriváty s jednou hydroxyskupinou byl nejúčinnější 2-hydroxyderivát (**17**), zatímco účinnost ostatních látek byla přibližně stejná¹¹.



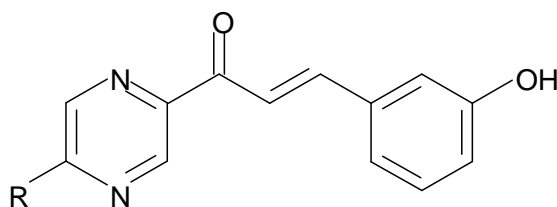
16: R = 3-OCH₃, 4-OH

17: R = 2-OH

18: R = 3-OH

19: R = 4-OH

Na katedře vznikla také série pyrazinových analogů chalconů s hydroxylovou skupinou v poloze 3 benzenového kruhu a různými alkyly v poloze 5 pyrazinu. Ze sloučenin **20** – **25** působil nejúčinněji na agregaci destiček navozenou kyselinou arachidonovou derivát **24** – s isobutylovým řetězcem. Naopak nejnižší účinek vyvolala látka **23** – s butylovým řetězcem. Aktivita těchto sloučenin může být vysvětlena inhibičním efektem na cyclooxygenasu a thromboxansynthasu¹².



20: R = H

21: R = propyl

22: R = isopropyl

23: R = butyl

24: R = isobutyl

25: R = *terc*-butyl

2.3 Chronická žilní nedostatečnost a varixy

Chronická žilní nedostatečnost dolních končetin je charakterizována symptomy, které vznikají v důsledku venózní hypertenze a následných strukturálních a funkčních abnormalit žil. Nejčastěji se projevuje bolestí, pocitem těžkých nohou, křečemi, svěděním, otoky, prominencí povrchových žil a změnami v trofice kůže².

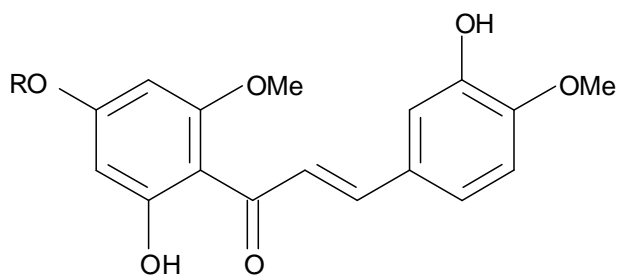
Varikózní žíly jsou dilatované, klikaté povrchové žíly vznikající v důsledku poruchy struktury a funkce chlopní *venae saphenae*, ochablosti žilní stěny nebo vysokého intraluminálního tlaku. Varixy mohou být rozděleny na primární a sekundární. Primární mají svůj původ v povrchovém žilním systému a vyskytují se dvakrát až třikrát častěji u žen než u mužů. Přibližně polovina pacientů má pozitivní rodinnou anamnézu. Sekundární varixy vznikají v důsledku hluboké žilní nedostatečnosti a nedostatečnosti perforujících žil (*venae perforantes*) nebo hluboké žilní okluze. To způsobuje zvětšení povrchových žil, které pak slouží jako kolaterály. Pacienty nejčastěji trápí tupá bolest nebo pocit tlaku v nohou, pocit těžkých nohou, občas se objevují lehké otoky kolem kotníků. Potíže lze zmírnit elevací končetin a omezením dlouhodobého stání. Rozsáhlé žilní varikozity mohou zapříčinit vznik kožních ulcerací, může se objevit i povrchová žilní trombóza¹³. Varixy postihují 20 až 60 % dospělé populace západního světa².

Léčba pacientů s chronickou žilní nedostatečností zahrnuje doporučení o změně životního stylu, používání kompresních punčoch, užívání venotonických léčivých přípravků a také chirurgické zákroky. Změna životního stylu snižuje vliv některých rizikových faktorů. Hlavní rizikové faktory představují nadváha, dlouhodobé stání a ženské pohlaví.

Léčiva používaná k podpůrné terapii tohoto onemocnění nejčastěji zvyšují žilní tonus, snižují kapilární permeabilitu, stimulují lymfatickou drenáž a upravují hemoreologické poruchy².

2.3.1 Chalkony s příznivými účinky na chronickou žilní nedostatečnost

Do této kategorie patří hesperidinmethylchalkon (**26**), který se již v praxi běžně používá společně s extraktem z kořene *Ruscus aculeatus* a kyselinou askorbovou ke zmírňování nepříjemných příznaků chronické žilní nedostatečnosti a varixů. Hesperidinmethylchalkon inhibuje snížení obsahu ATP v endoteliálních buňkách způsobené hypoxií. Ochranný efekt pro endotel může být vysvětlen ochranným účinkem na mitochondriální respirační aktivitu².



R = 6-O-(6-desoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl

26

2.4 Vazodilatační účinky

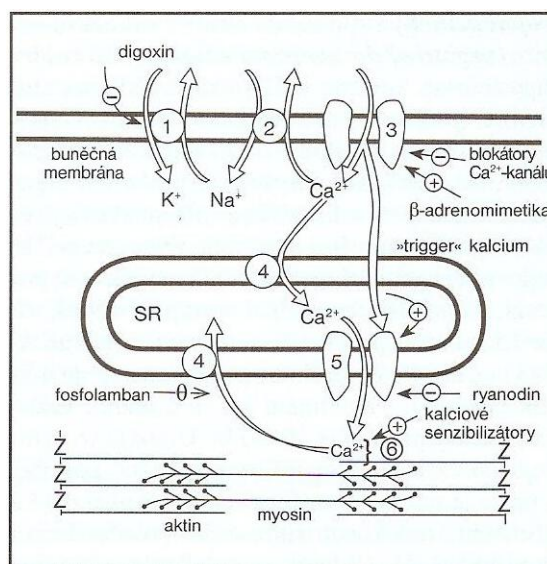
Jako vazodilatancia označujeme látky různých chemických struktur, které vyvolávají vazodilataci arterií a vén různými mechanismy. V terapii anginy pectoris se uplatňují vazodilatancia koronární. Periferní vazodilatancia se využívají při léčbě periferních vaskulárních onemocnění, jako je ischemická choroba dolních končetin, thrombangitis obliterans (Bürgerova choroba) a Raynaudův fenomén (konstrikce arteriál konců prstů). Speciální význam mají centrální vazodilatancia, která působí v centrálním nervovém systému (tzv. cerebrální vazodilatancia patřící mezi nootropika)¹⁴.

Jednou ze skupin vazodilatačně působících látek jsou nitráty. Mechanismus jejich účinku spočívá v uvolnění oxidu dusnatého. Ten aktivuje cytoplazmatickou guanylátcyklasu spojením s její hemovou skupinou a ovlivňuje tak přeměnu guanosintrifosfátu na cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP)⁴.

Kontrakce hladkého svalu závisí na koncentraci volného intracelulárního vápníku, proto inhibice transmembránového přenosu Ca^{2+} snižuje množství intracelulárního Ca^{2+} . Intracelulární koncentrace vápníku je zajišťována několika mechanismy: výměnou iontů vápníku za ionty sodíkové, vápníkovou pumpou a napětově i receptorově řízenými vápníkovými kanály. Na srdečních a cévních svalových buňkách jsou zastoupeny především kalciové kanály typu L, které se otevírají na dlouhou dobu a kanály typu T (přítomné v sinoatriálním uzlu), které se otevírají pouze krátkodobě, přechodně. V dráždivých buňkách dochází k aktivaci většiny kanálů depolarizací, takže jejich otevření závisí na napětí buněčné membrány. Otevřené kanály umožňují tok extracelulárního vápníku do buňky. Blokátory vápníkových kanálů specificky inhibují průnik vápenatých iontů napětově řízenými kalciovými L-kanály do buněk hladkých

svalů cévní stěny a kontraktilních a vodivých buněk myokardu (nepůsobí proto na příčně pruhované svaly, kde nedochází k pravidelným změnám elektrického napětí membrány). Vedle anginy pectoris mají blokátory vápníkových kanálů hlavní terapeutické uplatnění u hypertenze a srdečních arytmií. Po jejich podání klesá intracelulární koncentrace vápníku a výsledným účinkem je snížení kontraktility a dráždivosti, které se u anginy pectoris projevuje snížením tonu věnčitých tepen v místě excentrické stenózy a v oblasti rezistenčních arteriol. Snížení kontraktility myokardu snižuje metabolické nároky myokardu na kyslík. Dilatace arteriol v systémovém cévním řečišti vyvolává pokles krevního tlaku a někdy reflektoricky zvýšení srdeční frekvence. Antianginózní účinky jsou podmíněny především koronární vazodilatací a snížením periferní cévní rezistence.

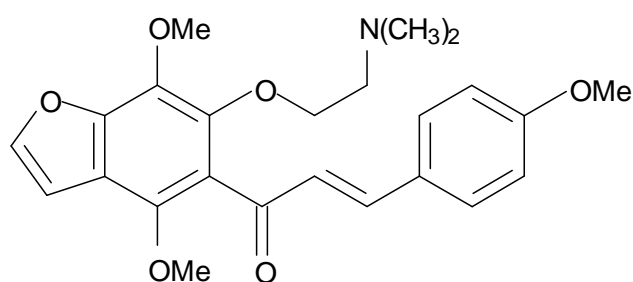
Předpokládá se, že účinek ostatních vazodilatancií je dán jednak tím, že snižují množství volného intracelulárního vápníku, a jednak tím, že interferují se specifickými enzymatickými procesy, které vyžadují volný intracelulární vápník. Tato interference může spočívat v zabránění mobilizace intracelulárně vázaného Ca^{2+} z kalmodulinu, ve zvýšení resekvestrace Ca^{2+} do nitrobuněčných zásob nebo zvýšeném vypuzování Ca^{2+} z buněk⁴.



Obr. 2 Schéma buněčné membrány kardiální buňky s místy účinku některých látek ovlivňujících srdeční kontraktilitu⁴

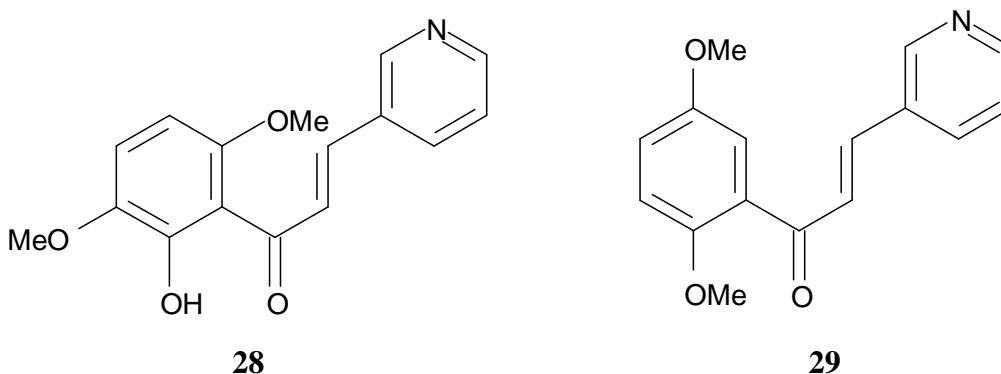
2.4.1 Vazodilatačně působící chalkony

Mezi vazodilatačně působící látky z řad chalkonů patří mecinaron (**27**), který byl odvozen od khellinu a jiných derivátů benzofuranu. Mecinaron byl připraven a poté studován v preklinických studiích, z nichž vyplynulo, že působí jako kompetitivní antagonist vápenatých iontů. Mechanismem účinku na cévy a myokard se však liší od verapamilu a nifedipinu. Dilatuje jak periferní, tak mozkové cévy. Mecinaron vykazoval také účinky antibradykininové, antiserotoninové a antiagregační. Do praktického použití se však tato sloučenina nedostala.



27

Koronárně-vazodilatační aktivita byla studována u pyridinových analogů chalkonů. Sloučeniny **28** a **29** zvyšovaly průtok kočičím srdcem izolovaným podle Langendorfa. Jejich aktivita byla srovnatelná s khellinem⁶.



28

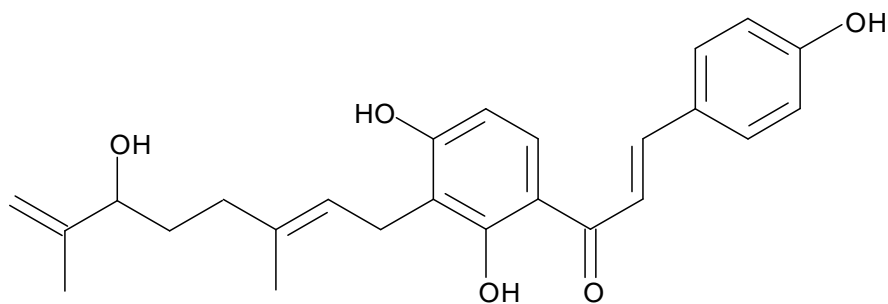
29

Butein (**4**) má vazodilatační účinky závislé na endotelu, které jsou zprostředkovány oxidem dusnatým. Zvyšuje také hladinu cAMP a cGMP v buňkách. Nahromadění cGMP inhibuje fosfodiesterasu III, což vede k dalšímu zvýšení hladiny cAMP a zesílení

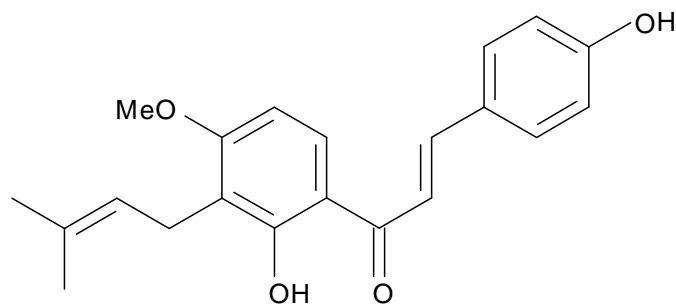
vazodilatačního účinku⁶. Fosfodiesterasa je enzym lokalizovaný především v myokardu a hladkých svalech, který rozkládá cAMP⁴.

Další již výše zmiňovanou sloučeninou s vazodilatačními účinky je isolikviritigenin (2). Jeho účinky byly studovány na potkaních aortách kontrahovaných fenylefrinem. Ze studií je patrné, že mechanismus působení isolikviritigeninu na cévy spočívá v inhibici fosfodiesterasy III a zvýšení intracelulárních hladin cAMP. Inhibice fosfodiesterasy III stojí i za pozitivně inotropním účinkem této látky.

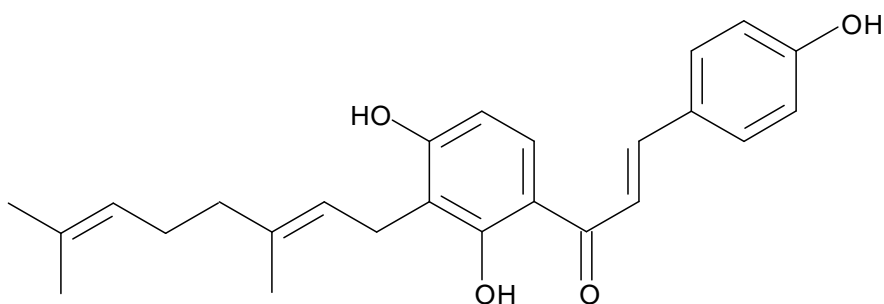
Z kořenů *Angelica keiskei* Koidzumi bylo izolováno několik látek ze skupiny chalkonů. Ukázalo se, že některé z nich inhibovaly fenylefrinem indukovanou vazokonstrikci potkaní aorty. Nejúčinnější byl xanthoangelol B (30). Inhiboval vazokonstrikci v cévách s intaktním i poškozeným endotelem a autoři studie předpokládají, že jeho účinek tkví v inhibici vzestupu intracelulární hladiny volných vápenatých iontů. Druhý nejsilnější účinek prokázal 4-hydroxyderricin (31) a třetí byl xanthoangelol (32). Účinek těchto látek se projevil pouze u cév s intaktním endotelem a zřejmě tedy závisí jak na ovlivnění hladiny intracelulárních vápenatých iontů, tak na produkci EDRF/NO (EDRF = endothelium-derived relaxing factor) v endotelu⁶.



30



31



32

2.5 Angiotenzin-konvertující enzym (ACE)

Renin-angiotenzinový systém (RAS) hraje dominantní úlohu v regulaci vodního hospodářství, elektrolytové rovnováhy a krevního tlaku. Rozsáhlá aktivace tohoto systému je považována za hlavní příčinu renovaskulární hypertenze. Nejdůležitější složkou RAS, kterou lze zároveň velmi dobře regulovat, je angiotenzin-konvertující enzym (ACE). Jedná se o dipeptidylkarboxypeptidasu (EC 3.4.15.1), která inaktivuje vazodilatorickou sloučeninu bradykinin a katalyzuje tvorbu angiotenzinu II odstraněním dipeptidu z C-konce řetězce angiotenzinu I. Ukázalo se, že inhibice ACE snižuje krevní tlak na zvířecích modelech a u lidí s různými typy hypertenze. ACE inhibitory se používají také v léčbě jiných kardiovaskulárních chorob, jako je městnavé srdeční selhávání, infarkt myokardu a diabetická nefropatie¹⁵.

2.5.1 Chalkony inhibující ACE

Butein (4), jedna z hlavních aktivních látek stonků *Rhus verniciflua*, se tradičně používá v léčbě bolesti, parazitárních onemocnění a trombózy v Koreji. Farmakologické účinky této sloučeniny již byly popsány v několika studiích. Vykazuje účinky antioxidantní, antiflogistické a vazodilatační, indukuje apoptózu, inhibuje protein-kinasu, glutathion-reduktasu a HIV-1 proteasu. Ve studii z roku 2003 bylo prokázáno, že butein snižuje krevní tlak také prostřednictvím inhibice ACE. Předpokládá se, že je to způsobeno tvorbou chelátových komplexů mezi aromatickými hydroxyly buteinu a zinkovými ionty v aktivním centru enzymu¹⁵.

2.6 Lipidy v lidském těle

Z lipidů se v plazmě nachází hlavně cholesterol, triacylglyceroly, fosfolipidy a volné mastné kyseliny. Cholesterol a triacylglyceroly jsou v krvi transportovány ve formě lipoproteinů, což jsou elipsoidní částice, skládající se z jádra nepolárního lipidu, který je obklopen polárními lipidy a proteinem, tzv. apoproteinem. Jednotlivé lipoproteiny se od sebe liší velikostí, tvarem a konkrétním typem a množstvím proteinu a lipidu, které obsahují. Základní krevní lipoproteiny jsou čtyři: chylomikrony, LDL (low density lipoproteins), VLDL (very low density lipoproteins) a HDL (high density lipoproteins).

Chylomikrony jsou lipoproteiny s nejmenší hustotou neboli denzitou. Hustotou se mění relativní obsah bílkoviny, tzn. čím více lipidů, tím nižší je relativní obsah bílkoviny a tím nižší je hustota. Chylomikrony obsahují převážně triacylglyceroly odvozené z diety. Tvoří se v tenkém střevě a lymfou se dostávají do systémového oběhu (obr. 3). Triacylglyceroly chylomikronů jsou hydrolyzovány účinkem lipoproteinové lipasy – enzymu lokalizovaného v endotelu kapilár. Konečným produktem degradace chylomikronů v oběhu je tzv. chylomikronový zbytek. Tato částice obsahuje specifické povrchové proteiny, jmenovitě apoprotein B48 a E. Apoprotein E má afinitu k cílovému receptoru na plazmatické membráně v játrech. Tento zbytek je bohatý na cholesterol dietního původu a je vázán a následně degradován lyzozomálními enzymy. Tímto způsobem se cholesterol z diety dostává do jater.

VLDL mají druhou nejnižší hustotu. Částice vzniká v játrech a má za úkol transportovat triacylglyceroly, které jsou tvořeny v játrech. VLDL také přenášejí cholesterol – buď syntetizovaný, nebo přijatý v potravě. Podobně jako triacylglyceroly chylomikronů jsou také tyto triacylglyceroly hydrolyzovány lipoproteinovou lipasou. Konečnou částicí degradace VLDL je opět jeho zbytek, který se označuje jako IDL (intermediate density lipoprotein). Tato částice obsahuje specifické apoproteiny B100 a E a je vychytávána z oběhu buď interakcí se specifickým receptorem v játrech, nebo je konvertována na LDL účinkem jaterní lipasy.

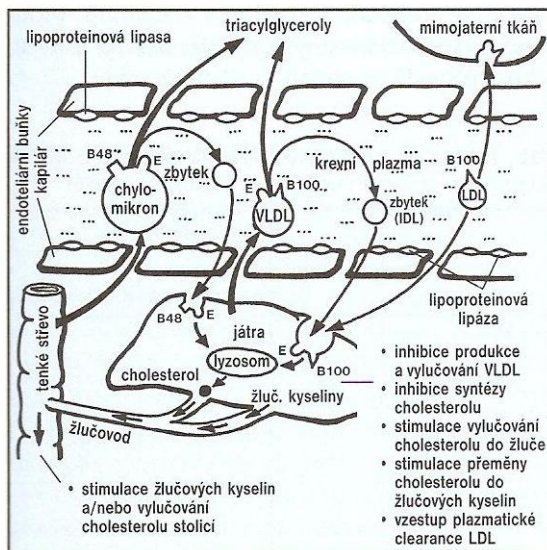
LDL obsahují nejvíce cholesterolu a apoproteinu B100, který je původně přítomen ve VLDL. LDL je vychytáván z oběhu vazbou se specifickým LDL-receptorem, který se nachází jak v játrech, tak v tzv. extrahepatických tkáních. Deficience LDL-receptoru má za následek hypercholesterolémii typu IIa, tzv. familiární hypercholesterolémii.

Prekurzory HDL jsou tvořeny v játrech a v oběhu jsou konvertovány na vyzrálé HDL. HDL hrají úlohu v metabolismu chylomikronů a VLDL a uplatňují se při

transportu cholesterolu z periferních tkání, včetně arterií, nazpět do jater, kde je cholesterol zužitkován. Tento zpětný transport cholesterolu může být základem inverzní korelace, která existuje mezi ischemickou chorobou srdeční a koncentracemi HDL v plazmě.

Uvedené skupiny však nejsou homologní, uvnitř uvedených lipoproteinových tříd se nacházejí podskupiny, které se liší densitou a velikostí. Rozlišujeme například LDL I-III, které se významně liší i aterogenním potenciálem – nejvyšší nebezpečí představují malé denzní LDL III. Stejně tak apoproteiny nemají jen úlohu nosičů lipidových částic, ale fungují i jako kofaktory enzymů, účastní se výměny lipidů mezi jednotlivými lipoproteinovými třídami, umožňují vazbu lipoproteinů na specifické receptory.

Zvýšené koncentrace plazmatického cholesterolu a cholesterolu plus triacylglycerolů bývají spojeny se zvýšeným rozvojem aterosklerózy, a tím i zvýšeným rizikem ischemické choroby srdeční a dalších kardiovaskulárních poruch. Samotné výrazné zvýšení plazmatických triacylglycerolů je spojeno s rizikem pankreatitidy a steatózy jater a má vztah (především při snížené koncentraci HDL) i k rozvoji ischemické choroby srdeční⁴.



Obr. 3 Přehled tvorby a utilizace lipoproteinů⁴

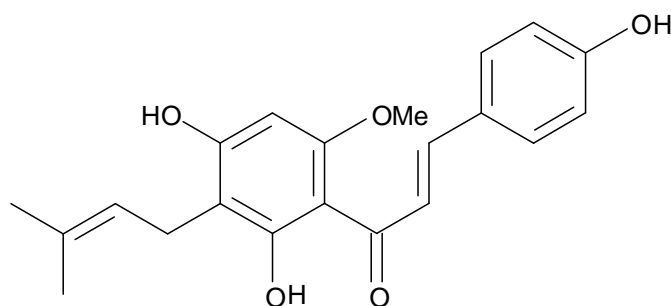
2.6.1 Chalkony ovlivňující lipidový metabolismus

4-Hydroxyderricin (**31**) způsobil ve studii na krysách (SHRSP = stroke-prone spontaneously hypertensive rats) výrazný pokles sérových hladin cholesterolu, fosfolipidů a triacylglycerolů ve VLDL frakci, což by mohlo znamenat, že je schopen

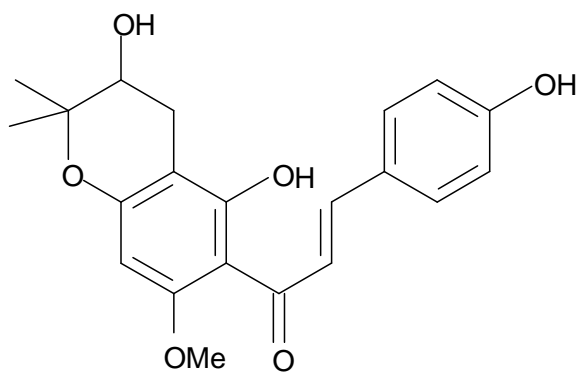
snížit sérový VLDL. Snižoval také hladiny volných mastných kyselin v séru. V játrech snižoval obsah triacylglycerolů, avšak nikoli cholesterolu ani fosfolipidů. Předpokládá se, že 4-hydroxyderricin zlepšuje metabolismus sérových lipoproteinů útlumem sekrece VLDL a inhibicí syntézy cholesterolu v játrech. Sloučenina také pravděpodobně inhibuje aktivitu HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A) reductasy¹⁶.

I další chalkon obsažený ve žluté šťávě ze stonků *Angelica keiskei* Koidzumi prokazoval schopnost ovlivňovat metabolismus lipidů. Bylo zjištěno, že xanthoangelol (**32**) významně snižoval obsah cholesterolu a fosfolipidů v LDL frakci, což vedlo ke snižování koncentrace sérového cholesterolu. V játrech snižoval obsah triacylglycerolů a celkový obsah cholesterolu, a tím i hmotnost jater. Pokles obsahu cholesterolu v játrech může být způsoben zvýšením exkrece fekálního cholesterolu a tendencí zvyšovat aktivitu cholesterol-7 α -hydroxylasy. Ukázalo se, že xanthoangelol významně zvyšuje PPAR α mRNA expresi. Jelikož PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) reguluje transkripci genů, které se účastní metabolismu mastných kyselin, lze se domnívat, že by mohla sloučenina podporovat přeměnu mastných kyselin na acyl-koenzym A a β -oxidaci acyl-koenzymu A na acetyl-koenzym A. To může být příčinou snížení obsahu triacylglycerolů v játrech. Na základě schopnosti xanthoangelolu zvyšovat expresi LDL-R (LDL receptor) mRNA lze usuzovat, že je schopen podporovat uptake LDL v séru. Z toho je možné odvodit, že xanthoangelol pravděpodobně zlepšuje metabolismus cholesterolu zvýšením uptake LDL¹⁷.

Xanthohumol (**33**) a xanthohumol B (**34**) inhibují diacylglycerol-acyltransferasu (DGAT). Tento enzym katalyzuje přenos acylu z acyl-CoA na diacylglycerol. Jeho inhibicí se snižuje tvorba triacylglycerolů, a tím i nebezpečí rozvoje aterosklerózy⁶.



33



34

2.7 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká, když tvorba oxidantů nebo kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS) překročí antioxidační kapacitu určitého místa. To způsobí oxidaci důležitých makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy, uhlovodíky a DNA. ROS zahrnují volné radikály jako superoxid (O_2^-), hydroxylový (OH) a peroxylový (RO_2) radikál a neradikálové typy jako peroxid vodíku (H_2O_2) a kyselina chlorná (HOCl). Existují také reaktivní dusíkové radikály jako radikál oxidu dusnatého (NO) a oxidu dusičitého (NO_2^-), neradikálový peroxynitrit (ONOO^-) a alkyl-peroxynitráty (R-ONO_2). Odhaduje se, že až 1 % kyslíku je za fyziologických podmínek redukováno pouze částečně na superoxid místo úplné redukce na vodu. Několik funkčních enzymů mitochondrií je vnímavých k poškození způsobenému ROS, což vede k pozměněné syntéze ATP, poruše regulace vápníku v buňkách a změně mitochondriální permeability. Vše zmiňované predisponuje buňky k nekróze a apoptóze. V přírodě se může kolaps mitochondriálního membránového potenciálu projevit v důsledku přerušení dýchacího řetězce, kdy jsou elektrony využívány spíše pro tvorbu tepla než pro syntézu ATP. Dlouhodobé odpojení dýchacího řetězce vede ke snížení syntézy ATP a zvýšení přenosu elektronů na kyslík za vzniku superoxidu¹⁸.

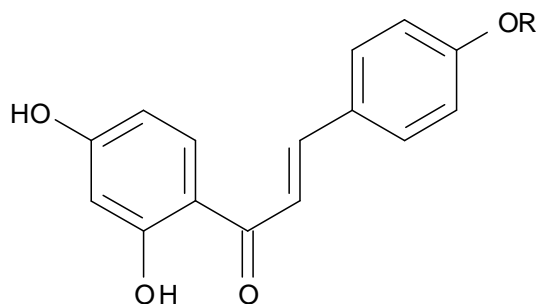
Jako odpověď na nadměrnou tvorbu ROS v průběhu dýchání a metabolických procesů si savci vyvinuli několik antioxidačních systémů, které zahrnují zhášeče volných radikálů a enzymy. Pravděpodobně nejdůležitějším antioxidačním enzymem je superoxidodismutasa (SOD). Existují tři hlavní buněčné formy tohoto enzymu: CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2) a extracelulární superoxidodismutasa (SOD3). Tyto enzymy zodpovídají v různých buněčných kompartmentech za detoxikaci

superoxidových radikálů na peroxid vodíku a vodu. Další enzymy – glutathionperoxidasa (GPx) a glutathionkatalasa katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu¹⁸.

2.7.1 Antioxidačně působící chalkony

Pro vysokou antioxidační účinnost je důležitá přítomnost karbonylové skupiny a dvojně vazby a dále přítomnost a uspořádání hydroxylových skupin. Na účinku *ortho*-dihydroxysloučenin se podílí rovněž jejich schopnost chelatovat kovové ionty. Přítomnost katecholového seskupení na kruhu B je důležitá také pro zhášení singletového kyslíku. Podle některých studií se na antioxidačním působení může podílet i jejich schopnost stabilizovat membrány snížením jejich fluidity. Zjistilo se, že butein (**4**) výrazně inhibuje peroxidaci lipidů v potkaních jaterních mikrosomech a snižuje produkci superoxidového aniontu jak v makrofázích, tak v systému hypoxanthin-xanthinoxidasa. V jiné studii bylo prokázáno, že díky své schopnosti zhášet volné radikály a chelatovat ionty železa a mědi je butein důležitým inhibitorem peroxidace lipidů a LDL⁶.

Velmi dobře jsou prostudovány také antioxidační vlastnosti obsahových látek lékořice. Apioisolikviritin (**35**) významně snižuje ztráty pyramidálních buněk v hippocampu způsobené ischemizací s následnou reperfuzí.

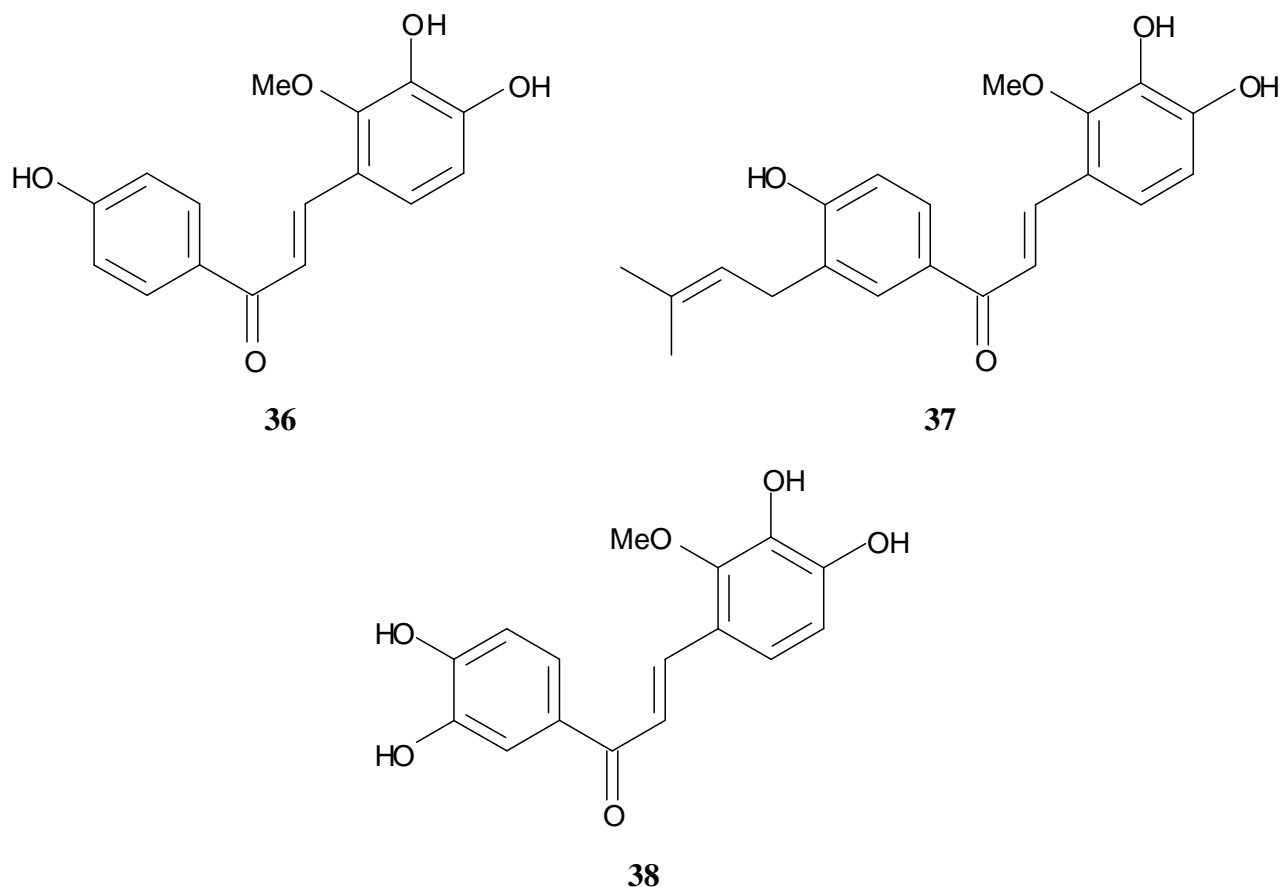


R = 2-O-(β-D-apiofuranosyl)-β-D-glukopyranosyl

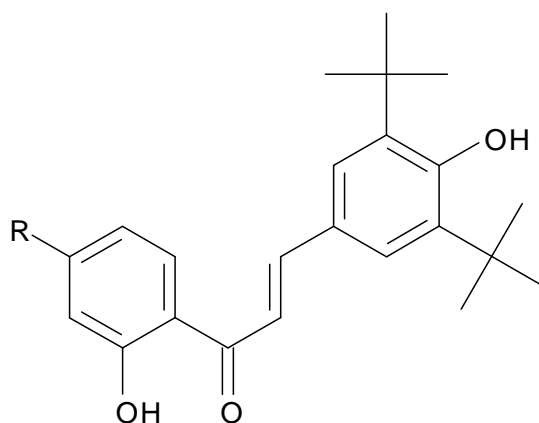
35

Ve studii zaměřené na zjištění antioxidačního působení chalkonů izolovaných z *Glycyrrhiza inflata* byly nejučinnější likochalkon B (**36**) a D (**37**). Hydroxylovaný analog likochalkonu B – **38**, izolovaný z *Glycyrrhiza uralensis*, zhášel 1,1-difenyl-

2-pikrylhydrazylový (DPPH) radikál efektivněji než likochalkon B. Vysoká antioxidační aktivita sloučeniny **38** je patrně dána přítomností dvou katecholových seskupení a delokalizací elektronů v jeho molekule.



Podle některých pramenů je však přítomnost katecholového nebo pyrogallolového seskupení zodpovědná za prooxidační, mutagenní a karcinogenní vlastnosti některých sloučenin, např. kvercetin. Ve snaze získat antioxidační sloučeniny bez těchto rizikových účinků byly studovány flavonoidní analogy 2,6-(di-*tert*-butyl)-4-methylfenolu (butylhydroxytoluen, BHT) **39**, **40** a **41**. V testu oxidace LDL vyvolané měďnatými ionty byly tyto sloučeniny účinnější než α -tokoferol, BHT a kvercetin. U sloučeniny **41** bylo provedeno také hodnocení antioxidační aktivity *in vivo* na potkaních srdcích a bylo zjištěno, že tento chalkon chrání srdeční svalovinu před poškozením způsobeným ischemizací a následnou reperfuzí lépe než allopurinol (inhibitor xanthinoxidasy) a rutin (kvercetin-3-*O*-rutosid) a může být využit pro prevenci post-ischemické dysfunkce myokardu. Jeho kardioprotektivní účinky jsou patrně dány schopností zhášet peroxidový radikál⁶.



39: R = H

40: R = OMe

41: R = OH

Antioxidační účinky byly studovány také u obsahových látek chmele a piva. Xanthohumol (**33**), hlavní prenylovaný chalcon chmele, měl antioxidační aktivitu vyšší než α -tokoferol, ale nižší než kvercetin. Kombinace xanthohumolu a α -tokoferolu zcela inhibovala oxidaci LDL navozenou měďnatými ionty. Z kardiovaskulárních účinků je významná také schopnost xanthohumolu a xanthohumolu B (**34**) inhibovat diacylglycerol-acyltransferasu (DGAT). Jeho inhibicí se snižuje tvorba triacylglycerolů, a tím i nebezpečí rozvoje aterosklerózy⁶.

3. Experimentální část

3.1 Obecná část

Výchozími sloučeninami syntéz byly pyrazin-2-karbonitril (Fluka) a 4-methoxybenzaldehyd (Fluka). Produkty byly děleny sloupcovou chromatografií za podmínek uvedených u jednotlivých sloučenin (viz dále) s použitím akvarijního motorku jako zdroje přetlaku. Následně byly rekrystalizovány z vroucího bezvodého ethanolu.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice) a složení vyvíjecích soustav je vždy uvedeno u jednotlivých látek.

Před měřením teploty tání, elementární analýzy, IČ a NMR byly vzorky sloučenin uloženy na 24 hodin do exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly změřeny na mikrovýhřevném bloku podle Bötia a nejsou korigovány.

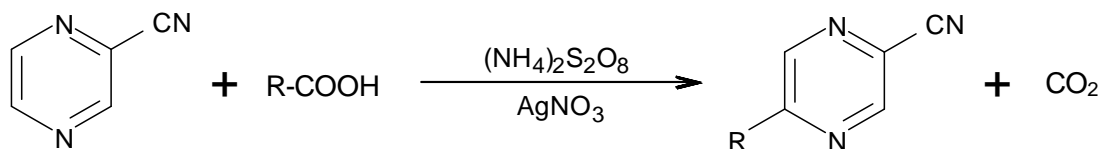
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

IČ spektra byla stanovena na spektrofotometru NICOLET 6700, metodou ATR-IR a vlnočty jsou uváděny v cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-Vx BB 300. Chemické posuny jako hodnoty δ jsou uváděny v ppm, jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan.

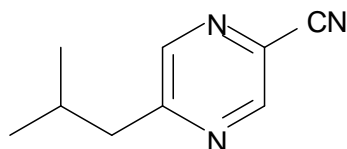
3.2 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

Obecný postup:



10,5 g (0,1 mol) pyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno ve 300 ml vody o teplotě 80 °C. K tomuto roztoku bylo přidáno 1,7 g (0,01 mol) dusičnanu stříbrného a příslušná kyselina (0,1 mol). Poté byl asi během půl hodiny za stálého míchání přikapán roztok 25,1 g peroxidisíranu amonného v 70 ml vody. V průběhu přikapávání byla udržována teplota v rozmezí 75 – 80 °C a při stálé teplotě byla směs míchána hodinu. Zchladlá reakční směs byla zalkalizována 10 % roztokem hydroxidu sodného na pH 9 – 10. Směs byla několik hodin kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtřepok byl vysušen bezvodým síranem sodným a po zfiltrování naadsorbován na 150 g silikagelu (Silica gel 60 Fluka, 0,063 – 0,200 mm) a podroben sloupcové chromatografii s použitím 500 g silikagelu a soustavy lékařský benzín + ethylacetát 8:2.

5-isobutylpyrazin-2-karbonitril



K syntéze bylo použito 10,2 g (0,1 mol) kyseliny isovalerové.

Sumární vzorec: C₉H₁₁N₃

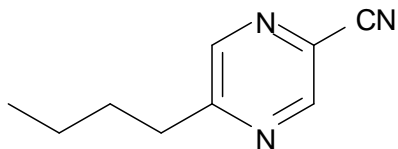
Molekulová hmotnost: 161,20

Vzhled: nažloutlá kapalina

Výtěžek: 9,0 g (56 %)

Identita látky byla ověřena pomocí TLC porovnáním s dříve připraveným standardem¹⁹.

5-butyropyrazin-2-karbonitril



K syntéze bylo použito 10,2 g (0,1 mol) kyseliny valerové.

Sumární vzorec: $C_9H_{11}N_3$

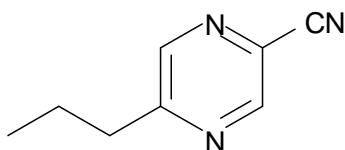
Molekulová hmotnost: 161,20

Vzhled: nažloutlá kapalina

Výtěžek: 11,0 g (68 %)

Identita látky byla ověřena pomocí TLC porovnáním s dříve připraveným standardem¹⁹.

5-propylpyrazin-2-karbonitril



K syntéze bylo použito 8,8 g (0,1 mol) kyseliny máselné.

Sumární vzorec: $C_8H_9N_3$

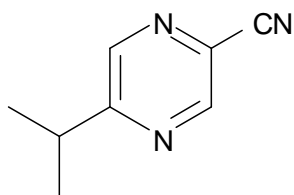
Molekulová hmotnost: 147,18

Vzhled: nažloutlá kapalina

Výtěžek: 5,4 g (37 %)

Identita látky byla ověřena pomocí TLC porovnáním s dříve připraveným standardem¹⁹.

5-isopropylpyrazin-2-karbonitril



K syntéze bylo použito 8,8 g (0,1 mol) kyseliny isomáselné.

Sumární vzorec: $C_8H_9N_3$

Molekulová hmotnost: 147,18

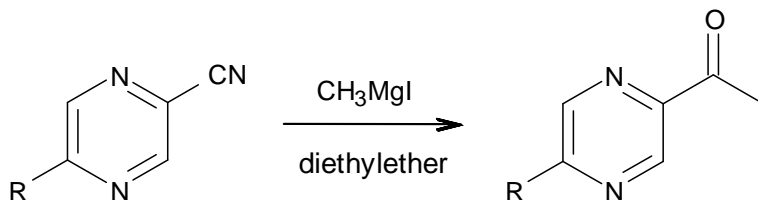
Vzhled: nažloutlá kapalina

Výtěžek: 7,2 g (49 %)

Identita látky byla ověřena pomocí TLC porovnáním s dříve připraveným standardem²⁰.

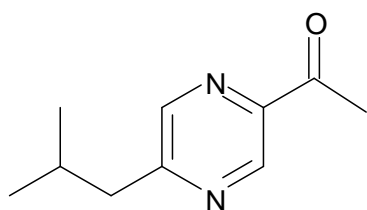
3.3 Příprava acetylpyrazinů

Obecný postup:



Ke 49,9 g (0,3 mol) methylmagnesiumjodidu ve 200 ml absolutního etheru byl za míchání a při teplotě -10 až $+10$ °C přikapán roztok nitrilu (0,128 mol) v 50 ml absolutního etheru. Při uvedené teplotě byla směs míchána celkem hodinu a poté byla rozložena vylitím na led. Vyloučená sraženina byla částečně rozpuštěna přidáním 50 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné objemově 1:1 a potom byla kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtřepok byl vysušen bezvodým síranem sodným a ether oddestilován na rotační vakuové odparce. Výsledný produkt byl přečištěn destilací za sníženého tlaku.

5-isobutyl-2-acetylpyrazin



K syntéze bylo použito 10,4 g (0,064 mol) 5-isobutylpyrazin-2-karbonitrilu.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$

Molekulová hmotnost: 178,23

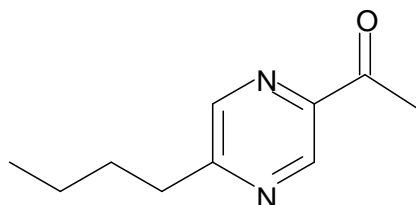
Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: $128 - 130$ °C / 1,73 kPa ($115 - 120$ °C / 1,47 kPa)¹⁹

Výtěžek: 5,4 g (47 %)

Identita sloučeniny byla ověřena pomocí TLC (lékařský benzín + ethyl-acetát 8 : 2) podle dříve připraveného standardu¹⁹.

5-butyl-2-acetylpyrazin



K syntéze bylo použito 11,0 g (0,068 mol) 5-butylpyrazin-2-karbonitrilu.

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄N₂O

Molekulová hmotnost: 178,23

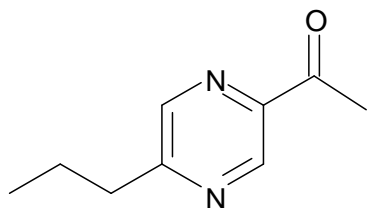
Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 126 – 129 °C / 1,99 kPa (125 – 130 °C / 1,99 kPa)¹⁹

Výtěžek: 6,1 g (50 %)

Identita sloučeniny byla ověřena pomocí teploty varu a TLC (lékařský benzín + ethyl-acetát 8 : 2) podle dříve připraveného standardu¹⁹.

5-propyl-2-acetylpyrazin



K syntéze bylo použito 5,4 g (0,037 mol) 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu.

Sumární vzorec: C₉H₁₂N₂O

Molekulová hmotnost: 164,20

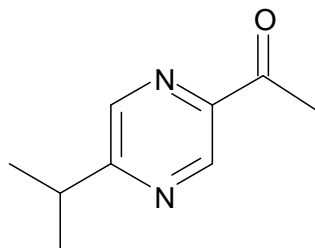
Vzhled: nažloutlá kapalina

Teplota varu: 103 – 105 °C / 1,20 kPa (118 – 122 °C / 1,99 kPa)¹⁹

Výtěžek: 2,7 g (44 %)

Identita sloučeniny byla ověřena pomocí TLC (lékařský benzín + ethyl-acetát 8 : 2) podle dříve připraveného standardu¹⁹.

5-isopropyl-2-acetylpyrazin



K syntéze bylo použito 14,4 g (0,098 mol) 5-isopropylpyrazin-2-karbonitrilu.

Sumární vzorec: C₉H₁₂N₂O

Molekulová hmotnost: 164,20

Vzhled: nažloutlá kapalina

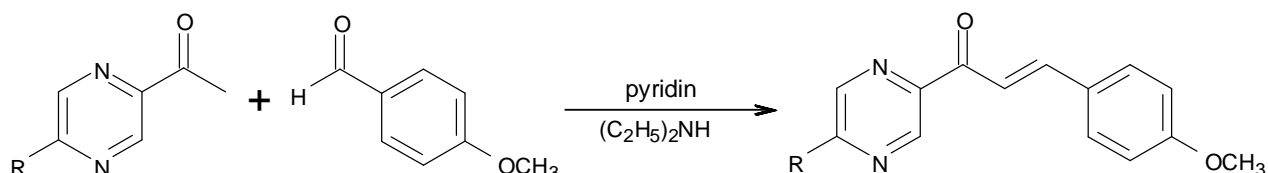
Teplota varu: 108 – 110 °C / 1,59 kPa (105 – 107 °C / 1,07 kPa)²⁰

Výtěžek: 8,2 g (51 %)

Identita sloučeniny byla ověřena pomocí TLC (lékařský benzín + ethyl-acetát 8 : 2) podle dříve připraveného standardu²⁰.

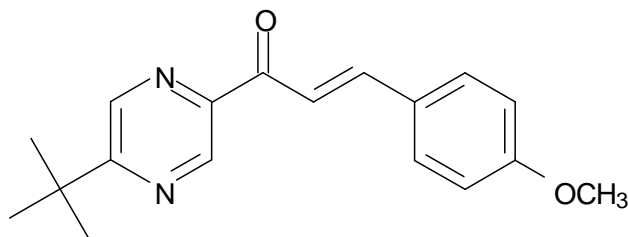
3.4 Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-arylprop-2-en-1-onů Claisen-Schmidtovou kondenzací

Obecný postup:



Příslušný acetylpyrazin (0,015 mol) a 4-methoxybenzaldehyd (0,015 mol) byly rozpuštěny v 6,6 ml bezvodého pyridinu. Po přidání diethylaminu (0,015 mol) byla směs zahřívána hodinu na glycerolové lázni při teplotě 80 – 120 °C. Po zchladnutí byla směs nalita do 300 ml ledové vody okyselené kyselinou octovou na pH 3 a uložena na 24 hodin do lednice. Z reakční směsi se vždy vyloučil produkt olejovitého charakteru, takže po vytřepání do etheru a vysušení bezvodým síranem sodným byla směs podrobena dvojnásobné sloupcové chromatografii. Analyticky čistý produkt byl poté získán krystalizací z bezvodého ethanolu.

(E)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on



Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 75 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9 : 1 (v/v)

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 150 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9 : 1 (v/v)

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,36

Vzhled: žluté jehličky

Teplota tání: 114 – 117 °C

Výtěžek: 0,05 g (1 %)

Elementární analýza:

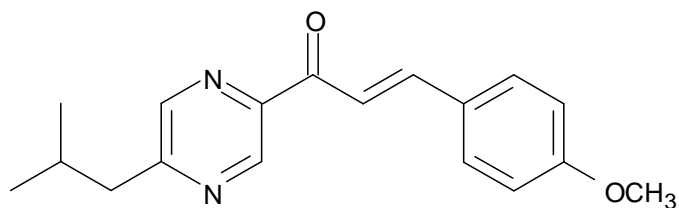
	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Změřeno	73,05	7,00	9,53

IČ spektrum: 1660 (C=O), 1585 (C=C)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3'), 8.72 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6'), 8.05 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H3), 7.93 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H2), 7.73-7.61 (2H, m, AA', BB', H2'', H6''), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3'', H5''), 3.86 (3H, s, OCH₃), 1.44 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 167.4, 161.9, 146.0, 145.1, 143.3, 139.8, 130.7, 127.7, 118.1, 114.4, 55.4, 37.0, 29.7

(E)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on



Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 65 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9:1

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 115 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9:1

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,36

Vzhled: drobné žluté krystalky

Teplota tání: 96 – 98 °C

Výtěžek: 1,07 g (24 %)

Elementární analýza:

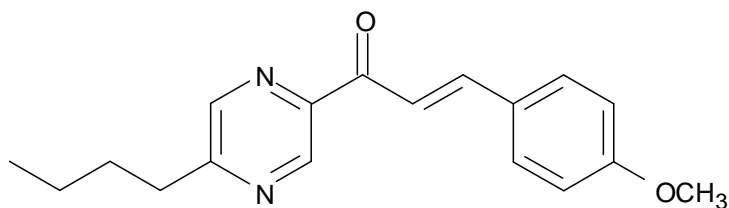
	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Změřeno	72,91	6,94	9,93

ÍČ spektrum: 1662 (C=O), 1587 (C=C)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.28 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3'), 8.48 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6'), 8.05 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H3), 7.93 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H2), 7.72-7.62 (2H, m, AA', BB', H2'', H6''), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3'', H5''), 3.85 (3H, s, OCH₃), 2.78 (2H, d, *J*=7.0 Hz, CH₂), 2.26-2.08 (1H, m, CH), 0.97 (6H, d, *J*=7.0, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 161.9, 160.2, 146.4, 145.2, 144.0, 143.2, 130.7, 127.6, 117.9, 114.4, 55.4, 44.7, 29.1, 22.3

(E)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on



Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 100 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 8:2

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 75 g silikagelu (Silpearl pro TLC, Kavalier)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 8:2

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,36

Vzhled: světle žluté krystaly

Teplota tání: 74 –75 °C

Výtěžek: 0,30 g (4 %)

Elementární analýza:

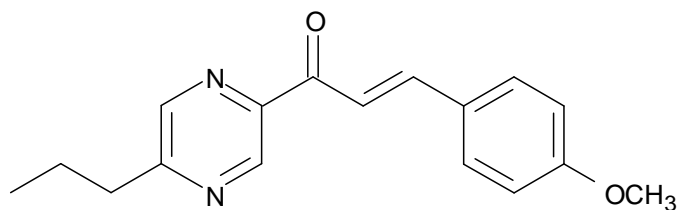
	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Změřeno	72,62	7,03	9,56

IČ spektrum: 1662 (C=O), 1591 (C=C)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.26 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3'), 8.51 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6'), 8.05 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H3), 7.93 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H2), 7.73-7.62 (2H, m, AA', BB', H2'', H6''), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3'', H5''), 3.85 (3H, s, OCH₃), 2.91 (2H, t, *J*=7.5 Hz, CH₂), 1.84-1.70 (2H, m CH₂), 1.48-1.33 (2H, m, CH₂), 0.96 (3H, t, *J*=7.5, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 161.9, 161.1, 146.4, 145.1, 144.0, 142.7, 130.7, 127.7, 117.0, 114.4, 55.4, 35.5, 31.4, 22.4, 13.8

(E)-3-(4-methoxyfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on



Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 100 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 8:2

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 75 g silikagelu (Silpearl pro TLC, Kavalier)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9:1

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈N₂O₂

Molekulová hmotnost: 282,34

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 109 – 111 °C

Výtěžek: 0,31 g (4 %)

Elementární analýza:

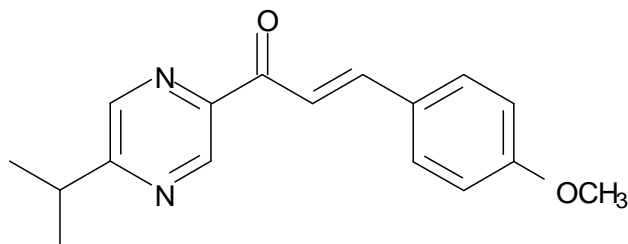
	% C	% H	% N
Vypočteno	72,32	6,43	9,92
Změřeno	72,13	6,65	10,205

IČ spektrum: 1664 (C=O), 1593 (C=C)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3'), 8.51 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6'), 8.05 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H3), 7.92 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H2), 7.72-7.62 (2H, m, AA', BB', H2'', H6''), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3'', H5''), 3.85 (3H, s, OCH₃), 2.88 (2H, t, *J*=7.5 Hz, CH₂), 1.91-1.73 (2H, m CH₂), 1.00 (3H, t, *J*=7.5, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 161.9, 160.8, 146.4, 145.1, 144.0, 142.7, 130.7, 127.6, 118.0, 114.4, 55.4, 37.7, 22.6, 13.8

(E)-1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on



Podmínky 1. chromatografie:

stacionární fáze: 150 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 9:1

Podmínky 2. chromatografie:

stacionární fáze: 100 g silikagelu (Silica gel 60 Merck, 0,040 – 0,063 mm)

mobilní fáze: lékařský benzín + ethyl-acetát 95:5

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈N₂O₂

Molekulová hmotnost: 282,34

Vzhled: drobné žluté krystalky

Teplota tání: 100 – 101 °C

Výtěžek: 0,09 g (2 %)

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	72,32	6,43	9,92
Změřeno	72,07	6,71	10,01

IČ spektrum: 1662 (C=O), 1583 (C=C)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3'), 8.55 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6'), 8.05 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H3), 7.93 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H2), 7.72-7.64 (2H, m, AA', BB', H2'', H6''), 6.98-6.88 (2H, m, AA', BB', H3'', H5''), 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.31-3.12 (1H, m CH), 1.38 (6H, d, *J*=6.9, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 165.4, 161.9, 146.6, 145.1, 143.9, 141.4, 130.7, 127.7, 118.0, 114.4, 55.4, 34.3, 22.0

4. Diskuse

Úkolem mé diplomové práce byla příprava série pyrazinových analogů chalkonů. Původně jsem měla připravit analogy se dvěma hydroxylovými skupinami na benzenovém kruhu. O přípravu těchto sloučenin se již dříve pokusila J. Křiváková²¹. Pro reakci používala 2,3-dihydroxybenzaldehyd a 2,4-dihydroxybenzaldehyd s nechráněnými hydroxylovými skupinami a požadované prop-2-en-1-ony se jí nepodařilo získat. Ve své práci jsem se proto rozhodla ochránit hydroxylové skupiny aldehydu před vstupem do Claisen-Schmidtovy kondenzace za použití 3,4-dihydro- α -pyranu^{8, 22, 23}. Bohužel reakce aldehydu s 3,4-dihydro- α -pyranem, tedy samotné ochránění, neprobíhala s uspokojivými výsledky. Bylo získáno malé množství znečištěného produktu, vlastně směsi výchozích látek a sloučenin s jednou ochráněnou hydroxyskupinou, s druhou ochráněnou nebo s oběma skupinami ochráněnými, což potvrdila NMR analýza. Proto bylo od této práce upuštěno a začala jsem syntetizovat sérii pyrazinových analogů derivátů chalkonů s methoxylovou skupinou v poloze 4 fenylového zbytku a různými alkyly v poloze 5 pyrazinového kruhu. Analogické sloučeniny s methoxy skupinou v poloze 2 byly již dříve na katedře připraveny^{24, 25}. Dále byly připraveny některé analogy s methoxy skupinou v poloze 3 benzenového kruhu a pyrazinový analog chalkonu s methoxy skupinou v poloze 4 na aromatickém jádře a bez substituce alkylem na pyrazinovém kruhu²⁴.

Deriváty chalkonů jsem připravila Claisen-Schmidtovou kondenzací, která se k syntéze chalkonů používá na katedře již dlouho^{26, 27, 28}. Některé meziprodukty pro tuto kondenzaci byly na katedře k dispozici v dostatečném množství, jiné jsem musela sama připravit. Všechny chalkony byly získány jako *E*-isomery. Výtěžky analyticky čistých produktů se pohybovaly v rozmezí 1 – 24 % teoretického výtěžku. Nízké výtěžky byly dosaženy i u dříve připravených chalkonů s methoxylovými skupinami na kruhu B. Příčinou může být nepříznivý vliv methoxy skupiny na průběh Claisen-Schmidtovy kondenzace a podobná lipofilita výchozích sloučenin a produktu. Následkem toho lze produkt oddělit od výchozích složek pouze opakovaným chromatografickým dělením a opakovanou krystalizací z ethanolu. Pokusila jsem se také o přípravu derivátu s hexylovým zbytkem v poloze 5 pyrazinu. Ten byl dvakrát podroben sloupcové chromatografii a několikrát překrystalizován z bezvodého ethanolu. Přesto nebyl izolován v dostatečné čistotě, a proto nebyl zahrnut do dalších analýz, ani do této práce.

Čistota produktů byla ověřena tenkovrstvou chromatografií, teplotou tání a elementární analýzou. Struktura připravených sloučenin byla potvrzena NMR a IČ spektry. Podle rešerše provedené v databázi organických sloučenin²⁹ se ve všech případech jedná o nové, v literatuře dosud nepopsané sloučeniny.

U připravených sloučenin dosud nebyly, a ani v budoucnu nebudou, hodnoceny účinky vůči bakteriím a houbám, protože u methoxylovaných derivátů připravených dříve nebyla zaznamenána výrazná antimikrobní účinnost^{26, 30, 31}. Ani při jejich testování pro *M. tuberculosis* H₃₇Rv nebyl žádný methoxyderivát vybrán pro další vývoj³².

Mnohem zajímavějších výsledků bylo dosaženo při hodnocení antiagregační aktivity. Jak studie zmíněné v teoretické části, tak některé novější studie^{33, 34, 35, 36} potvrzují antiagregační účinky chalkonů a jejich analogů. Ve studii provedené čínskými autory³⁶ se jasně projevil příznivý vliv methoxy substituce na antiagregační aktivitu a také některé 3-(3-methoxy-4-hydroxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ony připravené na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv inhibovaly agregaci trombocytů indukovanou arachidonovou kyselinou silněji než kyselina acetylsalicylová⁷. Proto i sloučeniny připravené v mé diplomové práci budou v budoucnu podrobeny hodnocení antiagregační aktivity.

5. Závěr

Byly připraveny výchozí látky pro přípravu acetylpyrazinů:

- 5-isobutylpyrazin-2-karbonitril
- 5-butylpyrazin-2-karbonitril
- 5-propylpyrazin-2-karbonitril
- 5-isopropyl-2-karbonitril

Byly připraveny meziproducty přípravy chalkonů, které sloužily jako výchozí látky pro Claisen-Schmidtovu kondenzaci:

- 5-isobutyl-2-acetylpyrazin
- 5-butyl-2-acetylpyrazin
- 5-propyl-2-acetylpyrazin
- 5-isopropyl-2-acetylpyrazin

Pyrazinové analogy chalkonů s methoxylovou skupinou v poloze 4 na kruhu B a různými alkylovými zbytky v poloze 5' na kruhu A připravené Claisen-Schmidtovou kondenzací:

- (*E*)-1-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- (*E*)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- (*E*)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- (*E*)-3-(4-methoxyfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- (*E*)-1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on

Žádný z výsledných produktů dosud nebyl popsán v literatuře.

6. Seznam literatury

- ¹ SAWLE, P., MOULTON, B. E., JARZYKOWSKA, M., GREEN, C. J., FORESTI, R., FAIRLAMB, I. J. S., MOTTERLINI, R.: Structure-activity relationships of methoxychalcones as inducers of heme oxygenase-1. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 7, 1484-1494.
- ² BOYLE, P., DIEHM, C., ROBERTSON, C.: Meta-analysis of clinical trials of Cyclo 3 Fort in the treatment of chronic venous insufficiency. *Int. Angiol. Sep* **2003**, 22, 3, 250-62.
- ³ TYLLOVÁ, V.: Chalkony jejich analogy jako potenciální léčiva VIII. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2008**, 47 s.
- ⁴ LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. dopl. přeprac. vyd. Praha: Galén, **2007**. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0
- ⁵ BUREŠ, J.: *Základy vnitřního lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, **2003**. 870 s. ISBN 80-7262-208-0 (Galén), ISBN 80-246-0673-9 (Karolinum)
- ⁶ OPLETALOVÁ, V., JAHODÁŘ, L., JUN, D., OPLETAL, L.: Chalkony (1,3-diarylpropen-1-ony) a jejich analogy jako potenciální terapeutika chorob kardiovaskulárního systému. *Česk. Slov. Farm.* **2003**, 52, 12-19.
- ⁷ JUN, D., CHLUPÁČOVÁ, M., HRONEK, M., OPLETAL, M.: Platelet antiaggregating activity of 2',5'-diazachalcones. 3rd International Symposium on Natural Drug Proceedings, Naples, October 2-4, **2003**.
- ⁸ HSIEH, H.-K., LEE, T.-H., WANG, J.-O., WANG, J.-J., LIN, C.-N.: Synthesis and antiinflammatory effect of chalcones and related compounds. *Pharm. Res.* **1998**, 15(1), 39-46.
- ⁹ KO, H.-H., HSIEH, H.-K., LIU, C.-T., LIN, H.-C., TENG, C.-M., LIN, C.-N.: Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: potent inhibition of platelet aggregation. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, 56, 10, 1333-1337.
- ¹⁰ FONTENELE, J. B., LEAL, L. K. A. M., FERREIRA, M. A. D., SILVEIRA, E. R., VIANA, G. S. B.: Antiplatelet effect of lonchocarpin and derricin isolated from *Lonchocarpus sericeus*. *Pharm. Biol.* **2005**, 43, 8, 726-731.
- ¹¹ OPLETALOVÁ, V., CHLUPÁČOVÁ, M., POSLEDNÍKOVÁ, M., KUNEŠ, J., SILVA, L., BUCHTA, V., JUN, D.: Synthesis and biological evaluation of substituted (E)-1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-3-phenylprop-2-en-1-ones. Joint Meeting of the

Czech Pharmaceutical Society, German Pharmaceutical Society and Austrian Pharmacetical Society, Regensburg, October 6-9, **2004**.

- ¹² OPLETAL, L., JUN, D., OPLETALOVÁ, V., CHLUPÁČOVÁ, M., HRONEK, M., KUČA, K.: Platelet antiaggregating activity of substituted (E)-3-(3-hydroxyphenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. Joint Meeting of the Czech Pharmaceutical Society, German Pharmaceutical Society and Austrian Pharmacetical Society, Regensburg, October 6-9, **2004**.
- ¹³ FAUCI, A. S., KASPER, D. L., LONGO, D. L., BRAUNWALD, E., HAUSER, S. L., JAMESON, J. L., LOSCALZO, J.: *Harrison's principles of internal medicine* [online], publisher McGraw-Hill, 17th Edition, **2008**, ISBN 978-0-07-146632-2. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com/spb/ovidweb.cgi?&S=GIGIFPENHHDDFDGENCGLDBJJAILLAA00&New+Database=Single%7c1&Jump+to+Browse=1>
- ¹⁴ HARTL, J., DOLEŽAL, M., KRINKOVÁ, J., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V.: *Farmaceutická chemie III*. 1. vyd. Praha: Karolinum, **2006**. 117 s. ISBN 80-246-0195-8
- ¹⁵ KANG, D. G., KIM, Y. C., SOHN, E. J., LEE, Y. M., LEE, A. S., YIN, M. H., LEE, H. S.: Hypotensive effect of butein *via* the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, 26, 9, 1345-1347.
- ¹⁶ OGAWA, H., OHNO, M., BABA, K.: Hypotensive and lipid regulatory actions of 4-hydroxyderricin, a chalcone from *Angelica keiskei*, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, 32, 19-23.
- ¹⁷ OGAWA, H., OKADA, Y., KAMISAKO, T., BABA, K.: Beneficial effect of xanthoangelol, a chalcone compound from *Angelica keiskei*, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, 34, 238-243.
- ¹⁸ FORBES, J. M., COUGHLAN, M. T., COOPER, M. E.: Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. **2008**, 57(6), 1446-54. Dostupné z: http://ovidsp.tx.ovid.com/spb/ovidweb.cgi?&S=OPNBFPCBABDDOCJBNCGLOCLCPDJAA00&Link+Set=S.sh.14|7|sl_10
- ¹⁹ OPLETALOVÁ, V., PATEL, A., BOULTON, M., DUNDROVÁ, A., LACINOVÁ, E.: 5-Alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic

-
- intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, 61 (7), 1093 – 1101
- ²⁰ KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M., OPLETALOVÁ, V., JAMPÍLEK, J., DOLEŽEL, J., DOHNAL, J., POUR, M., KUNEŠ, J., VOŘÍŠEK, V.: New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine rings derived from RP-HPLC study. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2008**, 73, 1 – 18.
- ²¹ KŘIVÁKOVÁ, J.: Pyrazinové analogy chalkonů jako potenciální léčiva II. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **1998**, 47 s.
- ²² LIN, C.-N., LEE, T.-H., HSU, M.-F., WANG, J.-P., KO, F.-N., TENG, C.-M.: 2',5'-Dihydroxychalcone as potent chemical mediator and cyclooxygenase inhibitor. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, 49(5), 530-536.
- ²³ SOGAWA, S., NIHRO, Y., UEDA, H., IZUMI, A., MIKI, T., MATSUMOTO, H., SATOH, T.: 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1993**, 36(24), 3904-3909.
- ²⁴ DOSEDĚL, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VI. *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2005**, 43 s.
- ²⁵ ŠVÉDOVÁ, L.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VII. *Rigorózní práce*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2007**, 51 s.
- ²⁶ OPLETALOVÁ, V., HARTL, J., PATEL, A., PALÁT, K. Jr., BUCHTA, V.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco.* **2002**, 57, 135-144.
- ²⁷ OPLETALOVÁ, V., POUR, M., KUNEŠ, J., BUCHTA, V., SILVA, L., KRÁĚOVÁ, K., MELTROVÁ, D., PETERKA, M., POSLEDNÍKOVÁ, M.: Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(Nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, 71, 44-58.
- ²⁸ CHLUPÁČOVÁ, M.; OPLETALOVÁ, V.; KUNEŠ, J.; SILVA, L.; BUCHTA, V.; DUŠKOVÁ, L; KRÁĚOVÁ, K.: Synthesis and biological evaluation of some ring-substituted (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2005**, XXXIII, 31 – 43.

-
- ²⁹ CrossFire Beilstein [databáze online]. Elsevier MDL [cit. 2009-04-23]. Dostupné z URL: <http://www.info.crossfirebeilstein.com/>.
- ³⁰ CHLUPÁČOVÁ, M., OPLETALOVÁ, V., ŠNAJDR, I., DOSEDĚL, M., SILVA, L., BUCHTA, V.: Synthesis and comparison of antifungal activities of chalcones and their pyrazine analogues. Book of Abstracts of the 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Brno, August 28 – September 1, 2005, PO-38; ISBN 80-210-3763-6.
- ³¹ CHLUPÁČOVÁ, M., OPLETALOVÁ, V., DOSEDĚL, M., ŠVÉDOVÁ, L., SILVA, L., BUCHTA, V. Syntéza a antifungální hodnocení (*E*)-3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů. Sborník příspěvků XXXIV. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, 12.-14. září 2005, s. 66; ISBN 80-7305-533-3.
- ³² CHLUPÁČOVÁ, M., OPLETALOVÁ, V., ŠNAJDR, I., DOSEDĚL, M., ŠVÉDOVÁ, L.: Antimykobakteriální hodnocení syntetických methoxychalkonů a jejich analogů. Zborník 36. konferencie Syntéza a analýza liečiv, Bratislava, 11. - 13. Septembra 2007, s. 73; ISBN 978-80-968251-7-2]
- ³³ CRESPO, A., MEYERS, C., COELHO, A., YÁÑEZ, M., FRAIZ, N., SOTELO, E., MAES, B. U. W., LAGUNA, R., CANO, E., LEMIÈRE, G. L. F., RAVIÑA, E.: Pyridazines part 41: Synthesis, antiplatelet activity and SAR of 2,4,6-substituted 5-(3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl)- or 5-(3-phenylprop-2-enoyl)pyridazin-3(*2H*)-ones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1080–1083.
- ³⁴ JANTANA, I., RAWEHA, S. M., SIRATB, H. M., JAMILB, S., MOHD YASINA, Y.H., JALILA, J., JAMALA, J.A.: Inhibitory effect of compounds from Zingiberaceae species on human platelet aggregation. *Phytomedicine.* **2008**, *15*, 306–309.
- ³⁵ MEYERS, C., YÁÑEZ, M., ELMAATOUGI, A., VERHELST, T., COELHO, A., FRAIZ, N., LEMIÈRE, G. L. F., GARCÍA-MERA, X., LAGUNA, R., CANO, E., MAES, B. U. W., SOTELO, E.: 2-Substituted 4-, 5-, and 6-[(1*E*)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]pyridazin-3(*2H*)-ones and 2-substituted 4,5-bis[(1*E*)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]pyridazin-3(*2H*)-ones as potent platelet aggregation inhibitors: Design, synthesis, and SAR studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 793–797.

³⁶ ZHAO, L.-M., JIN, H.-S., SUN, L.-P., PIAOA, H.-R., QUANA, Z.-S.: Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxychalcone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5027–5029.