

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

**Nové deriváty 1,3,5-
triazinu obsahující
chalkonový strukturní
motiv: syntéza a
hodnocení biologické
aktivity**

Diplomová práce

KRISTÝNA BRABCOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Eva Havránková, Ph.D.

Ústav chemických léčiv
Program Farmacie
Brno 2022

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor:	Kristýna Brabcová Farmaceutická fakulta Masarykova univerzita Ústav chemických léčiv
Název práce:	Nové deriváty 1,3,5-triazinu obsahující chalkonový strukturní motiv: syntéza a hodnocení biologické aktivity
Studijní program:	Farmacie
Vedoucí práce:	RNDr. Eva Havránková, Ph.D.
Rok:	2022
Počet stran:	127
Klíčová slova:	Inhibitory bakteriální CA, VRE, Antioxidanty, ABTS, s-Triazin, Sulfonamid, Chalkon, Hydroxyalkylamin

Bibliographic record

Author: Kristýna Brabcová
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Chemical Drugs

Title of Thesis: New 1,3,5-triazine derivatives containing
chalcone structural motif: synthesis and
evaluation of biological activity

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: RNDr. Eva Havránková, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 127

Keywords: Bacterial CA inhibitors, VRE, Antioxidants, ABTS,
s-Triazine, Sulfonamide, Chalcone,
Hydroxyalkylamine

Anotace

Inhibitory karboanhydrázy jsou aktuálním cílem výzkumu v mnoha oblastech, zahrnujících léčbu rakoviny, glaukomu, obezity, epilepsie, zá-
nětlivých onemocnění, neurodegenerativních chorob či patogenní in-
fekce. Tato diplomová práce se zabývá syntézou inhibitorů bakteriální
karboanhydrázy založených na *s*-triazinovém skeletu. Tříkrokovou syn-
tézou bylo připraveno dvanáct nových potenciálně účinných látek. U
několika vybraných zástupců byla stanovena jejich antimikrobiotická
aktivita, jako minimální inhibiční koncentrace zvolených *Enterococcus*
spp. Zkoušené látky vykazovaly středně silnou až výraznou aktivitu,
s velkým potenciálem pro vývoj účinného a bezpečného antimikrobioti-
ka v dalším výzkumu. U všech syntetizovaných látek byla rovněž stan-
ovena antioxidační aktivita metodou zhášení radikálu ABTS.

Abstract

Carbonic anhydrase inhibitors are a current research target in many areas, including the treatment of cancer, glaucoma, obesity, epilepsy, inflammatory diseases, neurodegenerative diseases, and pathogenic infections. This thesis deals with the synthesis of bacterial carbonic anhydrase inhibitors based on the *s*-triazine skeleton. Twelve new potentially active compounds were prepared by a three-step synthesis. For a few selected representatives, their antimicrobial activity was determined as the minimum inhibitory concentration of selected *Enterococcus f* spp.. The tested compounds exhibited moderate to significant activity, with great potential for developing effective and safe antimicrobials in further research. The antioxidant activity of all synthesized compounds was also determined by the ABTS radical quenching assay.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Nové deriváty 1,3,5-triazinu obsahující chalkonový strukturní motiv: syntéza a hodnocení biologické aktivity** zpracovala sama. Veškeré prameny a zdroje informací, které jsem použila k sepsání této práce, byly citovány v textu a jsou uvedeny v seznamu použitých pramenů a literatury.

V Brně 19. dubna 2022

.....
Kristýna Brabcová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce, RNDr. Evě Havránkové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi při vypracovávání diplomové práce věnovala. Také bych jí ráda poděkovala za její ochotu pomoci kdykoliv, kdy jí bylo zapotřebí. Mé poděkování patří také doc. PharmDr. Ing. Radce Opatřilové, Ph.D., MBA za pomoc a cenné rady při stanovování antioxidační aktivity. Týmu Ing. Marcely Nejezchlebové děkuji za spolupráci při stanovování antibiotické aktivity. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a svým blízkým za velkou podporu.

Obsah

Seznam obrázků	13
Seznam schémat	15
Seznam tabulek	16
Seznam pojmů a zkratk	17
1 Úvod	21
2 Karboanhydrázy	22
2.1 Lidské karboanhydrázy.....	25
2.2 Bakteriální karboanhydrázy.....	25
2.3 Struktura enzymu	28
3 Inhibice karboanhydráz a mechanismus účinku	32
3.1 Inhibitory karboanhydrázy jako antiinfektiva	36
3.2 Inhibitory karboanhydrázy jako antioxidanty	41
4 Chemická struktura inhibitorů mikrobiálních karboanhydráz	45
4.1 Inhibitory založené na triazinovém skeletu	47
5 Cíl práce	54
6 Výsledky a diskuze	55
6.1 Syntéza monosubstituovaného triazinu.....	57
6.2 Syntéza disubstituovaného triazinu	59
6.3 Příprava chalkonových substituentů	62
6.4 Syntéza trisubstituovaného triazinu	66
6.5 Měření antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	69
6.6 Měření antibiotické aktivity	72
7 Experimentální část	75
7.1 Obecné informace	75

OBSAH

7.2	Metodický postup syntézy monosubstituovaného <i>s</i> -triazinu.....	76
7.3	Metodický postup syntézy disubstituovaného <i>s</i> -triazinu.....	79
7.4	Metodický postup syntézy chalkonových substituentů.....	84
7.5	Metodický postup syntézy trisubstituovaného <i>s</i> -triazinu.....	86
7.6	Metodický postup měření antioxidační aktivity	98
7.7	Metodický postup měření antibiotické aktivity	99
8	Závěr	101
	Použité zdroje	102
	Rejstřík	124

Seznam obrázků

Obr. 1: Princip vycytávání CO ₂ z atmosféry. Převzato z (Huang, a další, 2019).....	24
Obr. 2: Struktura nejběžněji se vyskytujících bakteriálních karboanhydráz se zobrazením kavit s aktivními místy. Převzato z (Capasso & Supuran, 2014).....	27
Obr. 3: Obecná struktura aktivního místa karboanhydráz. Převzato z (Ghiasi, Hemati, & Zahedi, 2017).....	29
Obr. 4: Sekundární struktura α-CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).....	30
Obr. 5: Sekundární struktura β-CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).....	30
Obr. 6: Sekundární struktura γ-CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).....	31
Obr. 7: Inhibice CA koordinací na Zn ²⁺ kationt. Převzato z (Supuran, 2015).....	33
Obr. 8: Inhibice CA interakcí s OH ⁻ aniontem. Převzato z (Supuran, 2015).....	33
Obr. 9: Inhibice CA interakcí se vstupem kavity. Převzato z (Supuran, 2015).....	34
Obr. 10: Inhibice CA interakcí mimo kavitu. Převzato z (Supuran, 2015).....	34
Obr. 11: Inhibice katalytické aktivity α-CA. Převzato z (Supuran, 2012).....	35
Obr. 12: Hydrolyza derivátů kumarinu. Převzato z (Maresca, a další, 2009).....	36
Obr. 13: Příklad registrovaných CAI s antimikrobiotickou aktivitou. Převzato z (Abutaleb, Elhassany, Nocentini, Hewitt, Elkashif, & Cooper, 2021).....	37
Obr. 14: Srovnání struktury gram-negativních a gram-pozitivních bakterií. Převzato z (Latham, 2021).....	38
Obr. 15: Stabilizace benzensulfonamidu v kavitě α-CA u <i>Vibrio cholerae</i> . Převzato z (Bonardi, a další, 2021).....	40
Obr. 16: Přínos endogenní produkce ROS. Převzato z (Juránek, Nikitovic, Kouretas, Hayes, & Tsatsakis, 2013).....	41
Obr. 17: Patofyziologická endogenní produkce ROS. Převzato z (Arfin, a další, 2021).....	42
Obr. 18: Glykosidické deriváty chalkonu, resp. fenolu. Převzato z (Zaro, Bortolotti, Riafrecha, Concellón, Morbidoni, & Colinas, 2016).....	44

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 19: Klinicky používané sulfonamidy a sulfamáty. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).....	45
Obr. 20: Obecná struktura inhibitorů karboanhydráz. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).....	46
Obr. 21: Glykosidické CAI. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).	47
Obr. 22: Struktura triazinu. Převzato z (Gharat, Prabhu, & Khambete, 2022).....	47
Obr. 23: Tirapazamin – nové léčivo proti rakovině. Převzato z (Cascioferro S. , a další, 2017).....	48
Obr. 24: Příklad klinicky používaných inhibitorů na bázi sulfonamidu. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).....	49
Obr. 25: Základní struktura sulfonamidů. Převzato z (Apaydin & Török, 2019).....	49
Obr. 26: Základní struktura chalkonu. Převzato z (Uchil, Murali, & Nayak, 2021).	52
Obr. 27: Struktura produktů 1A-C.	58
Obr. 28: Struktura produktů 2A-F.....	60
Obr. 29: Struktura chalkonů.....	62
Obr. 30: Struktura produktů 3A-K.....	68

Seznam schémat

Schéma 1: Schématické znázornění katalytické aktivity karboanhydrázy. Převzato z (Kim, a další, 2020).....	23
Schéma 2: Obecné schéma syntézy produktů 3A-K.....	56
Schéma 3: Obecné schéma syntézy meziproduktů 1A-C.....	58
Schéma 4: Obecné schéma syntézy produktů 2A-F.....	60
Schéma 5: Obecný průběh aldolové kondenzace.....	62
Schéma 6: Bazicky katalyzovaná aldolová kondenzace.....	64
Schéma 7: Kysele katalyzovaná aldolová kondenzace.....	66
Schéma 8: Obecné schéma syntézy produktů 3A-K.....	68

Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled monosubstituovaných produktů 1A-C.....	59
Tab. 2: Přehled disubstituovaných produktů 2A-F.....	60
Tab. 3: Vliv změny reakčního času na výtěžnost reakce	61
Tab. 4: Přehled reakčních podmínek.....	65
Tab. 5: Přehled trisubstituovaných produktů 3A-K.....	69
Tab. 6: Antioxidační aktivita produktů 3A-K.....	70
Tab. 7: Antimikrobiotická aktivita produktů 3A-K a chalkonových meziproduktů proti ECFM.....	72
Tab. 8: Antimikrobiotická aktivita produktů 3A-K a chalkonových meziproduktů proti ECFS.....	73

Seznam pojmů a zkratk

- ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
- antibiotická rezistence – schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace daného antibiotika, daná přirozenou odolností a získanou rezistencí *Převzato z* (Rozsypal, 2001).
- antimikrobiotikum – antibiotika v užším slova smyslu a chemoterapeutika *Převzato z* (Pokludová, Bureš, & Hera, 2016).
- antioxidanty – látky zabraňující oxidaci, zpomalující oxidační reakce, inhibující reakce vyvolané účinkem kyslíku a peroxidů *Převzato z* (Velký lékařský slovník: Antioxidanty).
- CA – karboanhydráza
- CAI – inhibitor karboanhydrázy
- enzym – bílkovina, která je v malém množství schopna výrazně urychlit (katalyzovat) průběh určité biochemické reakce nebo děje, které by bez ní probíhaly jen velmi pomalu či vůbec *Převzato z* (Velký lékařský slovník: Enzym).
- ESKAPE – *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.*
- ESP – enterokokový povrchový protein; faktor virulence podílející se na adhezi enterokoků ke sliznici hostitelské tkáně a na tvorbě biofilmu *Převzato z* (Trojánec, 2006).
- farmakofor – soubor sterických a elektronických vlastností nezbytných k zajištění optimálních supramolekulárních interakcí se specifickým biologickým cílem a k ovlivnění jeho biologické odpovědi *Převzato z* (Koščová & Provazní, 2016).

SEZNAM POJMŮ A ZKRATEK

- inhibice – potlačení, útlum, zabránění *Převzato z* (Velký lékařský slovník: Inhibice).
- isoenzym – enzym existující v organismu ve dvou nebo více chemicky různých, ale funkčně podobných variantách, které obvykle vznikají v různých orgánech či tkáních *Převzato z* (Velký lékařský slovník: Isoenzym).
- MIC – minimální inhibiční koncentrace; nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě není pozorován bakteriální růst *Převzato z* (Mgr. Jana Kopecká & Mgr. Gabriela Rotková, 2017).
- MRSA – methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
- NMR – nukleární magnetická rezonance; absorpční spektroskopie detekující absorpci radiofrekvenční záření jádru atomů v molekulách, přičemž aktivní jsou pouze jádra se spinovým kvantovým číslem jiným než rovným nule *Převzato z* (Nukleární magnetická rezonance: Úvod do NMR, 2013).
- oxidační stres – porucha rovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a antioxidační kapacitou organismu *Převzato z* (Maňasková, 2012).
- patogen – živý původce nemoci (bakterie, vir, hniloba), choroboplodný zárodek schopný poškozovat a vyvolávat onemocnění *Převzato z* (Kreml) a (Zahradníček, 2013).
- potenciace – zesílení účinku *Převzato z* (Velký lékařský slovník: Potenciace).
- spektroskopie IR – infračervená spektroskopie; absorpční spektroskopie detekující absorpci infračerveného záření (různé vlnové délky) při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly *Převzato z* (Infračervená spektrometrie: Infračervená Spektroskopie, 2013).

- spektroskopie UV-VIS – absorpční spektrometrie v oblasti ultrafialového a viditelného záření; absorpční spektroskopie detekující absorpci elektromagnetického záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změně energetického stavu molekuly (elektronový, vibrační a rotační stav) v závislosti na vlnové délce absorbovaného záření *Převzato z (Molekulová absorpční spektrometrie: Teorie UV-VIS spektrometrie).*
- vazba iontová – typ chemické vazby, ve které jeden atom získá jeden nebo více elektronů na úkor druhého atomu; vzniká při velkém rozdílu elektronegativit vázaných atomů *Převzato z (Cídllová & Mokrý, Obecná chemie: Iontová vazba, 2018).*
- vazba koordinační – typ chemické vazby, ve které jeden atom (donor – atom ligandu) poskytne celý elektronový pár a druhý atom (akceptor – centrální atom) ho přijme *Převzato z (Cídllová, Mokrý, & Valová, 2018).*
- vazba kovalentní – typ chemické vazby založený na společném sdílení dvojic elektronů (vazebných elektronových párů) mezi vázanými atomy; oba elektrony jsou společné oběma atomům a mají navzájem opačný spin *Převzato z (doc. Mgr. Hana Cídllová, Mokrý, & Valová, Obecná chemie: Chemická vazba, 2018).*
- vodíkové můstky – typ chemické vazby vznikající u molekul, které obsahují atom vodíku vázaný k silně elektronegativnímu prvku a obsahují atomy s volným elektronovým párem *Převzato z (doc. Mgr. Hana Cídllová, Mokrý, & Valová, Obecná chemie: Slabé vazebné interakce, 2018).*
- VRE – vankomycin-rezistentní enterokoky

1 Úvod

Protimikrobní rezistence a hledání nových efektivních antibiotik je stále diskutovanějším tématem, které zasahuje celý svět. Ačkoliv je šíření rezistence proti antiinfektivům přirozeně se vyskytujícím jevem, v dnešní době je značně urychlováno nesprávným používáním antibiotik, nadbytečnou preskripcí a nevhodnou prevencí infekcí u lidí i u zvířat. Na druhé straně stojí země s nízkým HDP, jejichž obyvatelé žijí převážně v chudobě, bez dostatku zdrojů vč. medikace a bez správných hygienických návyků, což vytváří ideální podmínky pro šíření a mutaci patogenů. Kombinací těchto jevů dochází ke vzniku nových odolných kmenů, proti kterým jsou momentálně dostupná antiinfektiva neúčinná nebo jejich účinnost rapidně klesá.

Každoročně jsou vyvíjeny desítky nových antiinfektiv, pouze minimum z nich však prokáže dostatečnou aktivitu v průběhu klinických zkoušek, aby bylo registrováno a vstoupilo na trh. S postupem času tak klesá šance na úspěšnou léčbu závažných infekcí, navíc dochází k reintrodukci dříve potlačených infekčních onemocnění. Stále častěji se dnes vyskytují případy tuberkulózy, pseudomembranózní kolitidy, černého kašle, malárie a zápalu plic různé etiologie. (Ventola, 2015) (Lindmeier, 2018) (Uchil, Murali, & Nayak, 2021)

V popředí problémů s rezistencí stojí tzv. multirezistentní kmeny odolné proti celé řadě antiinfektiv, a to i přes jejich odlišnou chemickou strukturu či mechanismus účinku. Nalézt novou účinnou látku k léčbě těchto infekcí je velmi obtížné a většinou nerentabilní. Výzkum v této oblasti proto není farmaceutickými firmami moc podporován, a to i přes snahu Světové zdravotnické organizace (WHO) a podobných zdravotnických iniciativ. (Cumberland, Chaib, Bagozzi, & Dias, 2017) (Capasso & Supuran, 2017) (Uchil, Murali, & Nayak, 2021)

Působení na mikroby ovlivněním činnosti jejich karboanhydrázy se ukazuje jako dobrý směr výzkumu se solidními výsledky. Dosavadní výzkumy naznačují, že inhibitory bakteriální karboanhydrázy mohou působit selektivně bez výraznějších nežádoucích účinků způsobených interakcí s lidskou karboanhydrázou. Je však obtížné takto vysoce selektivní inhibitory nalézt. Unikátní mechanismus účinku, který je rozdílný od všech doposud známých antibiotik, by umožnil léčbu rezistentních infekcí a do klinické praxe by se tak mohla dostat nová řada efektivních léčiv dostupných pro zdravotnické systémy po celém světě.

2 Karboanhydrázy

Karboanhydrázy (CA, EC 4.2.1.1) jsou označením pro širokou skupinu metaloenzymů katalyzujících hydrataci CO₂ za vzniku hydrogenuhlíčanového aniontu a vodíkového protonu. Tento proces je klíčový pro řadu biochemických pochodů, především pro regulaci pH, dýchání, sekreci elektrolytů a pro fotosyntézu, sekundárně se podílí na metabolických drahách zahrnující lipogenezi, glukoneogenezi, močovinový cyklus, kalcifikaci a kostní resorpci. (Supuran, 2018) (Guler, Capasso, & Supuran, 2015) (Aggarwal, Boone, Kondeti, & McKenna, 2012)

Běžně se vyskytuje ve všech známých doménách, tj. *Archaea*, *Bacteria* i *Eukarya*. (Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, 2008) Dle genetického kódu lze tyto metaloenzymy rozdělit do několika rodin: α , β , γ , δ , ζ , η , θ , ι . U bakterií lze nalézt zástupce z jakékoli rodiny, někdy i více typů v jednom mikroorganismu. U živočichů a hub se vyskytují pouze α - a β -rodiny, protozoa vykazují přítomnost α -, β - i η -rodiny. Mořské rozsivky jsou zatím jediným známým organismem s výskytem δ - a ζ -rodiny. Nejnověji objevená ι -CA byla nalezena u mořských rozsivek *Thalassiosira pseudonana*, u bakterie druhu *Burkholderia territorii* a dále u několika druhů řas a sinic. (Supuran, 2012) (Vullo, a další, 2014) (Supuran, 2016) (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020) (Nocentini, Supuran, & Capasso, 2021) (Orhan, Senturk, & Genisel, 2022)

Hydratace CO₂ patří k základním biochemickým reakcím nutným k přežití většiny živých organismů. Toho lze využít k ovlivnění jejich stavu, aktivity a životaschopnosti pomocí inhibice či naopak aktivace přítomné karboanhydrázy. Lze toho dosáhnout interakcí s kationtem kovu, jenž je základem její enzymatické aktivity, či jinými mechanismy. (Supuran, 2008) (Supuran, 2013) (Supuran, 2018) (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020)

Katalytická aktivita karboanhydrázy probíhá následujícím způsobem:

1. hydroxidový aniont koordinovaný na zinečnatý kationt a vodu ve struktuře karboanhydrázy atakuje CO₂ za vzniku hydrogenuhlíčitanu, který je uvolněn do okolního média (vody);
2. protonový transfer H⁺ (označen jako „W“ ve Schéma 1) z nově vznikající koordinační vazby vody a zinečnatého kationtu na hydrogenuhlíčanový aniont, čímž dochází k regeneraci nukleofilního

centra karboanhydrázy; zároveň je tento krok rychlost určujícím krokem. (Nocentini, Angeli, Carta, Winum, Zalubovskis, & Carradori, 2021)

Průběh hydratace CO_2 je názorně představen na katalytické aktivitě α -CA ve Schéma 1.

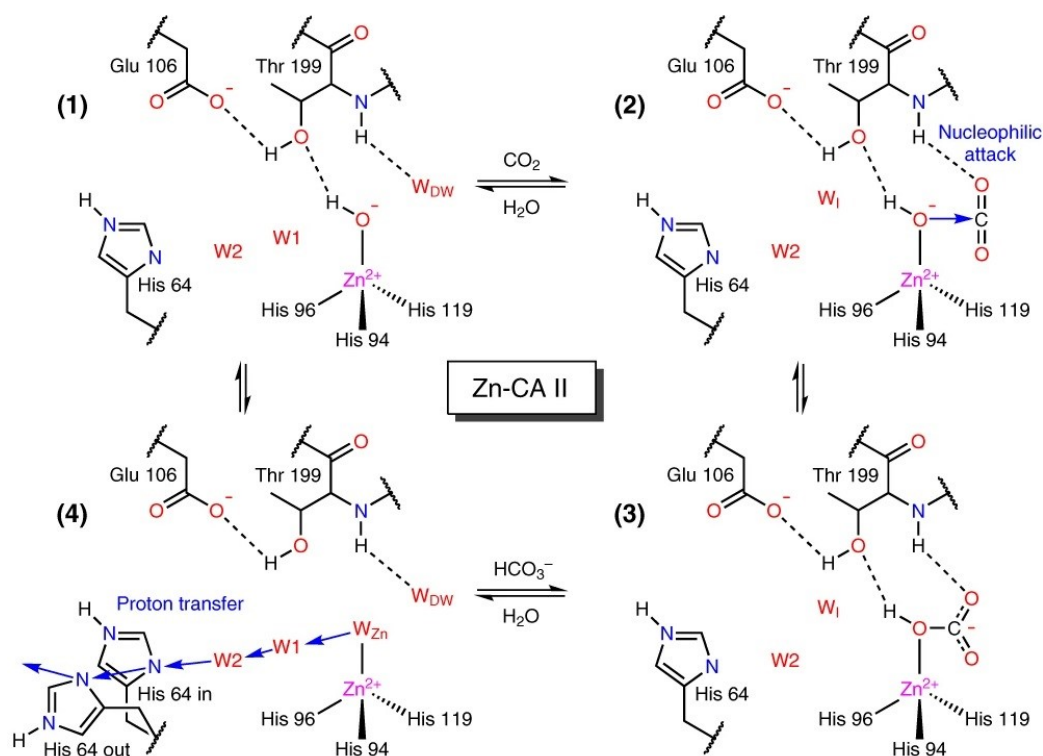
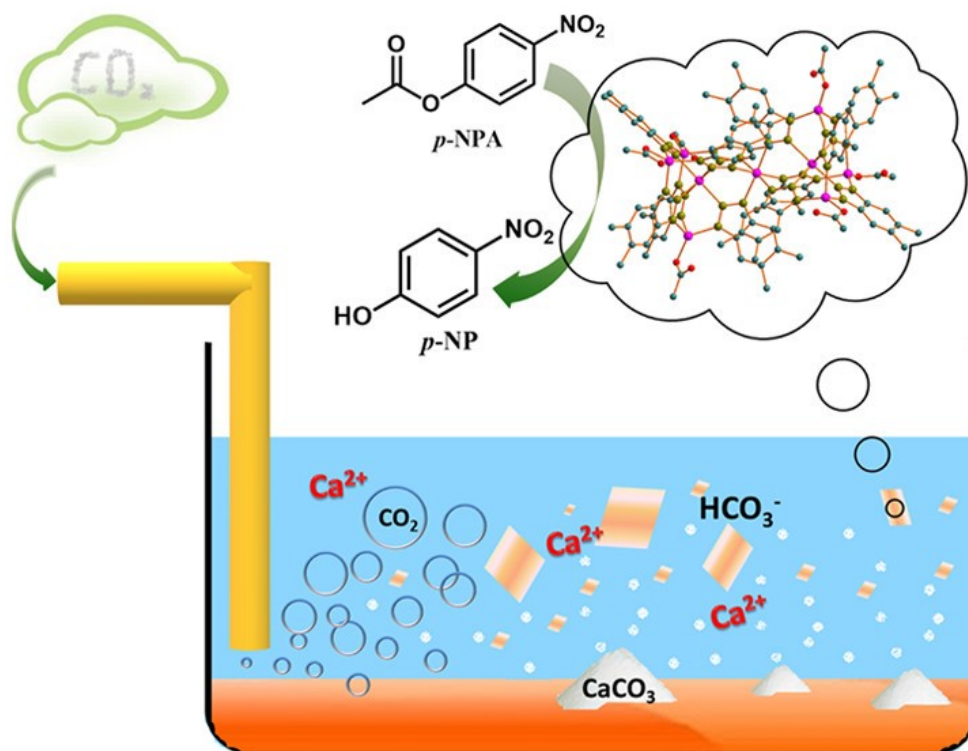


Schéma 1: Schématické znázornění katalytické aktivity karboanhydrázy. Převzato z (Kim, a další, 2020).

Proton H^+ (označen jako „ W^H “) je při transferu přenášen z aktivního místa při zinečnatém kationtu („ W_{Zn} “) pomocí sítě vodíkových můstků mezi aminokyselinovými zbytky přítomnými v kavitě („ W_1 “, „ W_2 “) až k histidinovému zbytku His 64. Do interakce skrze vodíkové můstky vstupuje rovněž přítomné médium, tj. voda („ W_{dw} “).

Nejvíce se klinicky využívá potlačení aktivity karboanhydráz. Inhibice vybraných isoformů lidské karboanhydrázy vykazuje diuretický, antiglaukomatický, antikonvulzivní a antiflogistický účinek, působí rovněž proti obezitě, v léčbě rakoviny a dalších indikacích. Inhibice karboanhydráz u patogenů lze využít v léčbě infekcí bakteriálního, mykotického či protozoárního původu. (Supuran, 2016) (Supuran, 2018) (Supuran, 2021)

Naopak aktivace karboanhydrázy se dostává do popředí zájmu v péči o životní prostředí. Jeví potenciál pro redukci atmosférického CO_2 biogenní precipitací uhličitanu vápenatého, a to činností extracelulární karboanhydrázy kultivované pomocí *Bacillus cereus*. Bakterie nejprve hydratuje CO_2 za vzniku hydrogenuhličitanového aniontu, který následně vysráží ve formě CaCO_3 . Kombinací této mikrobiální aktivity s vodovodními systémy by mohlo dojít k významnému snížení obsahu CO_2 v atmosféře a minerální produkt by byl ukládán jako součást zemského podloží, jak je znázorněno na Obr. 1. Za tímto účelem jsou vyvíjena nová CA-mimetika. (Shen, Li, Pan, Lin, Zhu, & Yu, 2017) (Jin, Zhang, Zhang, & Chen, 2018) (Huang, a další, 2019) (Verma, Bhaduri, Kumar, & Deshpande, 2021)



Obr. 1: Princip vychytávání CO_2 z atmosféry. Převzato z (Huang, a další, 2019).

Tato chemická přeměna je zároveň principem tvorby pevné schránky některých druhů mlžů a plžů a také je hlavním faktorem kalcifikace korálů. Ve výzkumu jsou dnes sledovány různé možnosti využití pro lidský průmysl a životní prostředí. (Li, Chen, Zhou, Zhu, & Yu, 2013) (Nocentini, Supuran, & Capasso, 2021)

Nově se výzkum zaměřil na aktivátory karboanhydrázy i v klinickém prostředí při léčbě Alzheimerovy choroby a jiných neurodegenerativních poruch souvisejících se ztrátou paměti. (Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, 2008) (Nocentini & Supuran, 2019)

2.1 Lidské karboanhydrázy

Doposud bylo v lidském organismu identifikováno 15 isoenzymů, přičemž přesný výskyt a funkce v organismu byla objasněna jen u některých z nich. Obecně se karboanhydrázy účastní glukoneogeneze, lipogeneze a ureogeneze. Řadí se do α -rodiny, v jejich aktivním místě je tudíž navázán zinečnatý kation. (Supuran, 2018) (Supuran, 2018)

hCA I a II jsou přítomné v cytoplazmě, hCA IV navázaná na membránu, hCA V_A a V_B v mitochondriích, hCA IV se nachází v některých slizničních sekretech (slzy, sliny) a transmembránové hCA IX, XII a XIV (v neaktivní formě hCA VIII, X a XI) jsou přítomné v organismu ubikvitárně. (Mikuš, Krajčiová, & Mikulová, 2018) (Provensi, Nocentini, Passani, Blandina, & Supuran, 2021) Neaktivní formy karboanhydrázy neobsahují zinečnatý kation a jsou označovány jako CA-příbuzné proteiny. (Aggarwal, Boone, Kondeti, & McKenna, 2012)

Další isoformy se nachází v centrální nervové soustavě a v choroidním plexu, jejich funkce zde však zatím nebyla podrobně objasněna, pouze že se podílí na nervových pochodech souvisejících s pamětí a negativními emocemi, především strachem. (Provensi, Nocentini, Passani, Blandina, & Supuran, 2021)

2.2 Bakteriální karboanhydrázy

Patogenní bakterie, proti kterým by mohla být nová antibakteriální léčba zaměřena, lze rozdělit na základě struktury karboanhydráz. α -CA byly nalezeny u *Neisseria* spp., *Helicobacter pylori* a *Vibrio cholerae*, β -CA u *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enterica* a *Haemophilus influenzae*. β -Isoenzymy jsou produkovány i patogenními houkami, resp. plísněmi. Inhibitory β -CA tudíž často vykazují kromě bakteriostatické aktivity také fungistatický účinek. Jejich spektrum účinku se tak rozšiřuje o mykózy vyvolané např. *Candida albicans*, *Candida*

glabrata, *Cryptococcus neoformans* či *Malassezia globosa*. (Supuran, 2013) (Capasso & Supuran, 2014) (Supuran & Capasso, 2017) (Supuran, 2018)

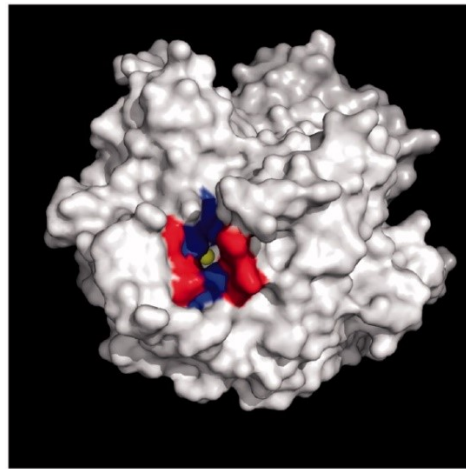
γ -CA jsou u bakterií rozšířené jen minimálně, genetická informace pro jejich expresi byla nalezena např. u druhů *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. β a γ -CA se nachází v cytoplasmě a podílí se na distribuci a metabolizaci HCO_3^- , např. pomocí karboxyláz. (Capasso & Supuran, 2014) (Ferraroni, 2019)

V bakteriálních mikroorganismech se α -CA podílí na udržování pH a výměně elektrolytů (HCO_3^- , H^+) podobně jako u eukaryotních organismů. Je zakotvena v membráně jako transmembránový protein, jehož aktivní místo se nachází vně buňky. To z něj činí vhodný cíl pro zaměření účinku antimikrobiotika. α -CA přivádí CO_2 z vnějšího prostředí ve formě HCO_3^- jako substrát jedné z metabolických cest, které zajišťují výživu mikroorganismu. (Capasso & Supuran, 2014)

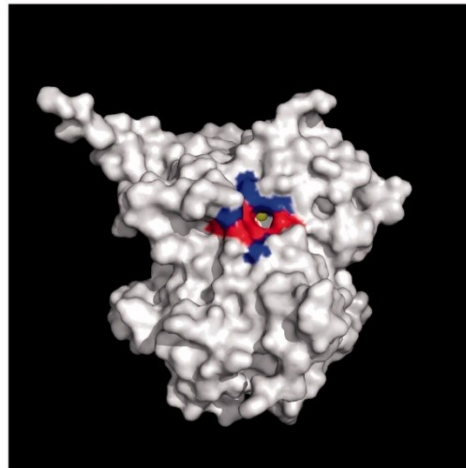
Spolu s β -CA se podílí i na typicky mikrobiálních pochodech zajišťujících přežití mikroorganismu v nevhodných podmínkách. Dosavadní výsledky naznačují, že transmembránové karboanhydrázy obecně podporují růst za aerobních podmínek. Produkují endogenní HCO_3^- jako kompenzaci nízkého parciálního tlaku CO_2 a extrémních hodnot pH v okolním prostředí buňky. (Nishimori, Onishi, Hiroaki, & Supuran, 2008) (Aggarwal, Boone, Kondeti, & McKenna, 2012)

U patogenních bakterií jsou tak CA obecně důležité pro napadení a kolonizaci hostitelského organismu. Esenciální role CA byla prokázána u *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Helicobacter pylori* a je zkoumána u druhu *Pseudomonas aeruginosa*. (Supuran, 2008) (Capasso & Supuran, 2014) (Aggarwal, Chua, Pinard, Szébenyi, & McKenna, 2015)

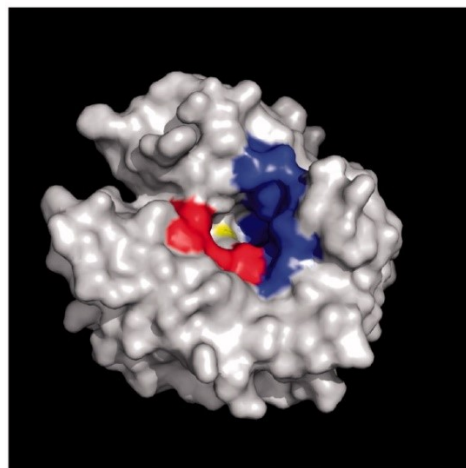
Mezi jednotlivými rodinami karboanhydráz je rozdíl i v lokalizaci aktivního místa. To je vnořeno do vnitřní struktury enzymu v různé hloubce, může být i téměř celé odhalené. Také je různě tvarované a dosahuje odlišné šířky. Největší kavitu lze nalézt u γ -CA, menší u α -CA, přičemž nejmenších rozměrů dosahuje u zástupců β rodiny. Jejich srovnání je zobrazeno pomocí trojrozměrné struktury v Obr. 2. (Supuran, 2012) (Capasso & Supuran, 2014)



γ -CA



β -CA



α -CA

Obr. 2: Struktura nejběžněji se vyskytujících bakteriálních karboanhydráz se zobrazením kavit s aktivními místy. Převzato z (Capasso & Supuran, 2014).

Rozdílná je i koordinační vazba na zinečnatý kation, kterou nemusí zaujímat pouze molekula vody, resp. OH⁻, ale i aminokyselinové zbytky (Asp u *Mycobacterium tuberculosis*), které reagují na okolní pH – při pH > 8 se Asp odkloní od aktivního místa a vytvoří vazbu s Arg poblíž. Tím uvolní místo pro koordinaci H₂O. (Supuran, 2012)

Je-li hydroxidový aniont v molekule obsažen, je stabilizován buď amidovou skupinou Thr-199 nebo karboxylovou skupinou z Asp-37. Sekundární strukturou bakteriální karboanhydrázy je α- nebo β-skládaný list, který je doplněn jednou či více šroubovicemi, a tvoří základ monomerní jednotky spojující se dále do homodimerů. (Covarrubias, Larsson, Högbom, Mowbray, & Unge, 2005)

2.3 Struktura enzymu

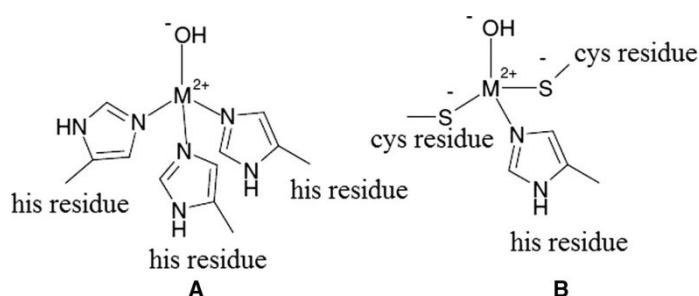
Podrobná rentgenová měření přesně popsala strukturu této skupiny metaloenzymů s unikátním charakterem aktivního místa. To je zanořené ve vnitřní části enzymu v různé hloubce za vstupem. Tvoří jej hydrofilní a hydrofobní část skládající se z několika aminokyselin (Val, Leu, Trp, Tyr, Asn, His, Thr). K tomu se pojí kation kovu v koordinační vazbě s molekulou vody, resp. jejím hydroxidovým aniontem, který se chová jako nukleofil. (Supuran, 2008) (Supuran, 2016)

Nejběžněji se u karboanhydráz vyskytuje jako kation kovu zinečnatý kation, typický pro α, β, δ, η a nejspíše i θ rodiny. γ-CA váží nejčastěji železnatý kation, jsou však aktivní i při vazbě zinečnatého či kobaltnatého kationtu. Karboanhydrázy z ζ rodiny mají ve svém aktivním místě zinečnatý či kademnatý kation. (Supuran, 2011) (Capasso & Supuran, 2014)

ι-karboanhydrázy mají na svém aktivním místě nejčastěji manganatý kation, aktivní jsou však i se zinečnatým kationtem. Mohou být aktivní dokonce i bez přítomnosti kationtu kovu, kdy je katalytická aktivita pravděpodobně zprostředkována aminokyselinovými zbytky (Thr-106, Tyr-124, Ser-199). Protonový transfer H⁺ je pak zprostředkován His-197, popř. zbytkem tyrosinu nacházejícím se u vstupu kavity. (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020) (Nocentini, Supuran, & Capasso, 2021) (Petreni, De Luca, Scaloni, Nocentini, Capasso, & Supuran, 2021)

Kation kovu je v enzymu navázán na tři aminokyselinové zbytky, u α, γ, δ a nejspíše i u θ-CA jsou jimi tři histidinové zbytky (His-94, -96 a -

119), znázorněno strukturou A v Obr. 3. U β a ζ -CA je kation koordinován dvěma cysteinovými a jedním histidinovým zbytkem, znázorněno strukturou B v Obr. 3. U η -CA dvěma histidinovými a jedním glutaminovým zbytkem. V případě ι -CA nebyla stabilizační struktura aktivního místa jednoznačně potvrzena, nejspíše se na ní podílí dva histidinové zbytky, jeden zbytek kyseliny asparagové a kyseliny glutamové. (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020)



Obr. 3: Obecná struktura aktivního místa karboanhydráz. Převzato z (Ghiasi, Hemati, & Zahedi, 2017).

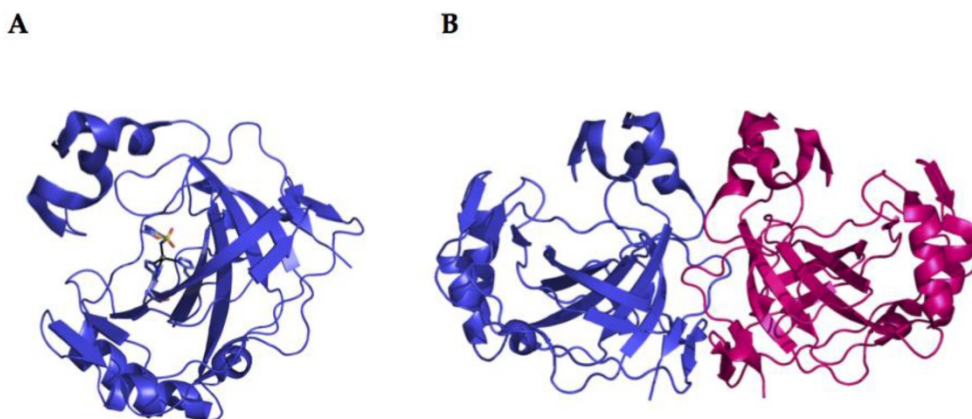
Čtvrtým ligandem je H_2O , resp. OH^- , a koordinace zinku tak získává podobu tetraedru. Molekula vody je ve své poloze dále stabilizována atomem dusíku z amidové skupiny blízkého Thr-199, na něž je napojena Glu-106 a takto vytváří ochrannou formaci v kavitálním vstupu. (Domsic, Avvaru, Kim, & Agbandje-McKenna, 2008) (Supuran, 2012) (Capasso & Supuran, 2014) (Ferraroni, 2019)

Při katalytické aktivitě probíhá transfer protonu H^+ přes přilehlý aminokyselinový zbytek His-64, který umožňuje jeho přesun z vazby v molekule vody do okolního vodního prostředí, jež v těsné blízkosti karboanhydrázy a jejího aktivního místa vytváří síť vodíkových můstků. (Domsic, Avvaru, Kim, & Agbandje-McKenna, 2008)

Mezi jednotlivými rodinami se liší i hloubka zanoření aktivního místa – kation kovu je umístěn hlouběji ve struktuře enzymu u α -CA než u β -CA. Šířka kavity je srovnatelná u α a γ -CA, kavita β -CA je užší. U neaktivních forem karboanhydráz je aktivní místo, resp. jeho vstup zablokován aminokyselinovými zbytky, např. dvojicí Asp-Arg. (Aggarwal, Chua, Pinard, Szebenyi, & McKenna, 2015) (Bonardi, a další, 2021)

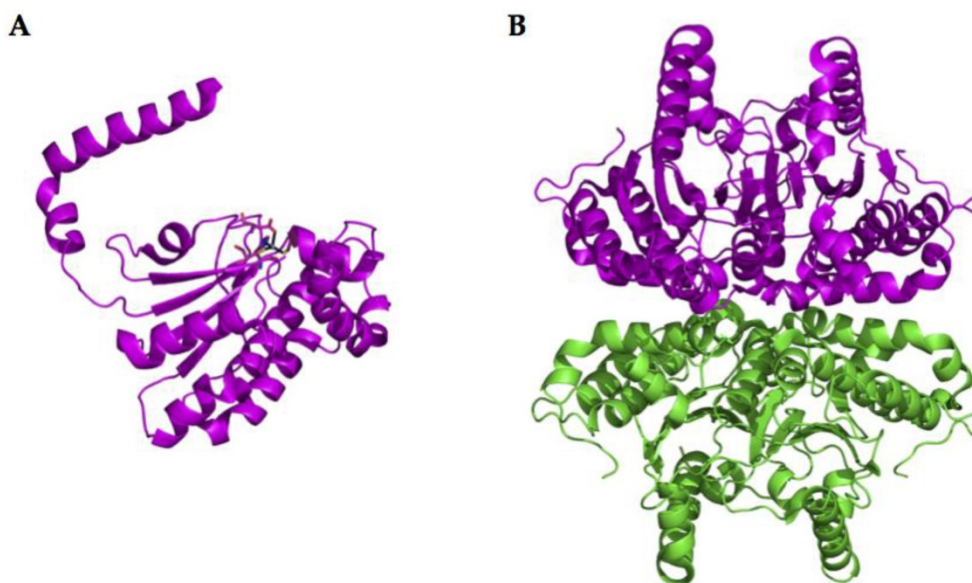
Důležitá je rovněž sekundární struktura, kterou karboanhydrázy mohou zaujmout. α -CA většinou setrvávají v monomerním stavu (znázorněn jako struktura A na Obr. 4), ačkoliv jsou známy i jejich dimery (znázorněn jako struktura B na Obr. 4), např. hCA IX a XII. Obě formy

jsou katalyticky aktivní. Základem monomeru je β -skládání list, který je obklopený několika α -šroubovicemi.



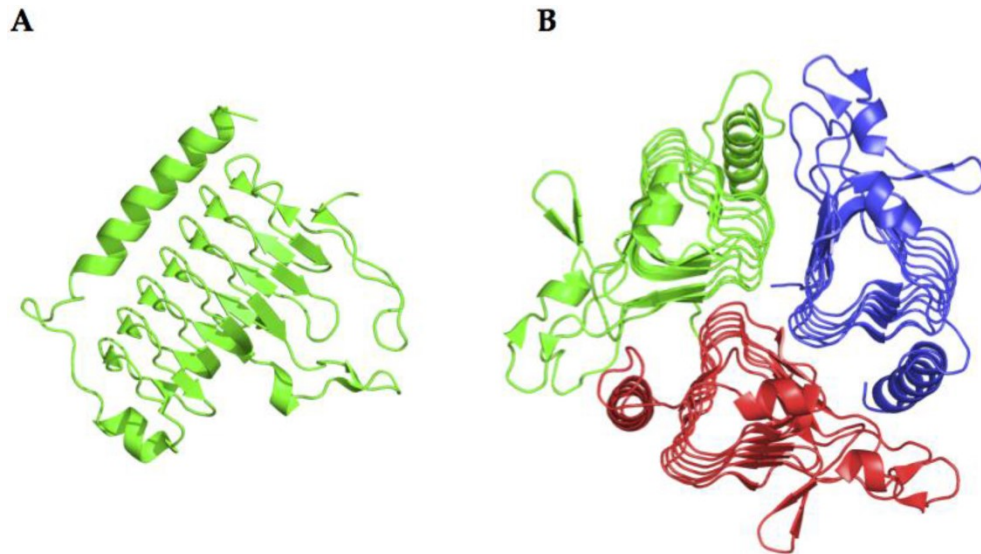
Obr. 4: Sekundární struktura α -CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).

β -CA jsou funkční pouze jako dimery či vyšší oligomery, např. tetramer znázorněný v Obr. 5 (struktura B). Základem jedné monomerní jednotky je β -skládání list spolu s α -šroubovicemi (struktura A v Obr. 5) a samostatně je neaktivní. Podobně jsou složeny i θ -CA. (Aggarwal, Chua, Pinard, Szebenyi, & McKenna, 2015) (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020)



Obr. 5: Sekundární struktura β -CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).

γ -CA vytváří homotrimery (struktura B v Obr. 6), jejichž monomerní jednotky se skládají z paralelních vláken β -šroubovic (struktura A v Obr. 6). (Ferraroni, 2019) U δ , η a ι -CA zatím nebylo možné jednoznačně určit přesnou strukturu enzymů, a to ani za použití krystalové rentgenografie. (Del Prete, Nocentini, Supuran, & Capasso, 2020)



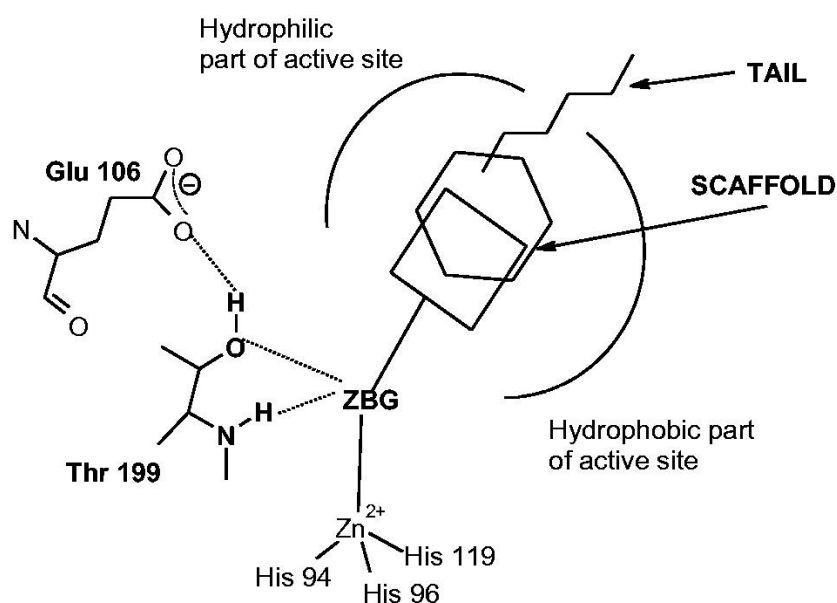
Obr. 6: Sekundární struktura γ -CA. Převzato z (Supuran & Capasso, 2017).

3 Inhibice karboanhydráz a mechanismus účinku

S pokrokem výzkumných metod je neustále rozšiřován seznam účinných inhibitorů karboanhydrázy. Věda přichází na stále nové funkční skupiny, potažmo sloučeniny, které jsou této inhibice schopné na dostatečnou míru, aby o nich mohlo být uvažováno ve vývoji léčivých přípravků. Zdokonalení rentgenové krystalografie a zvýšení její dostupnosti umožnilo zobrazení těchto inhibitorů přímo v komplexu s karboanhydrázou. Lze tedy zcela přesně určit mechanismus účinku, je-li komplex dostatečně stabilní pro extrakci a zobrazení. (Supuran, How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?, 2015)

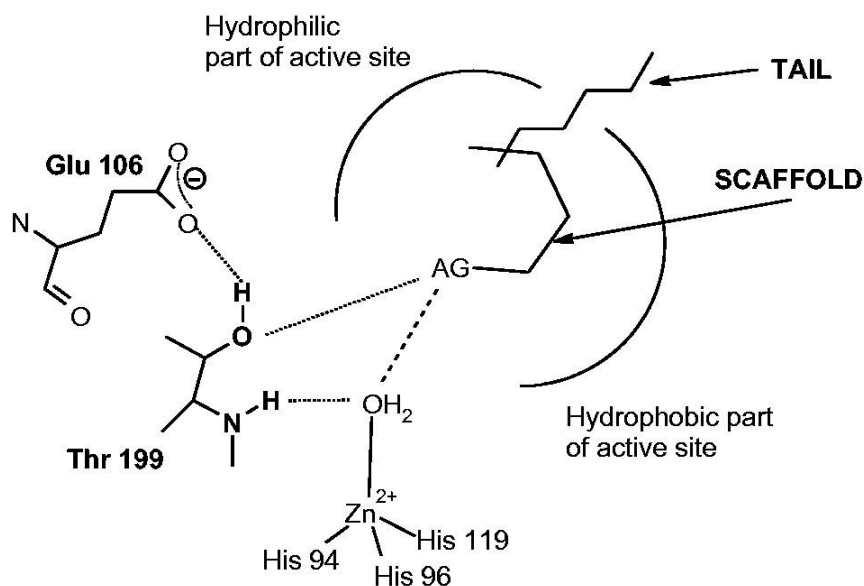
Doposud byly rozeznány čtyři mechanismy inhibice karboanhydrázy, a to:

1. koordinace inhibitoru se zinečnatým kationtem v aktivním místě (sulfonamidy, aniontové inhibitory, dithiokarbamáty, karboxyláty, hydroxamáty), viz Obr. 7;
2. interakce s molekulou vody, resp. OH^- koordinovaného se zinečnatým kationtem v aktivním místě, za vzniku vodíkových můstků (fenoly, karboxyláty, polyaminy, sulfokumariny), viz Obr. 8;
3. blokáce kavity s aktivním místem interakcí inhibitoru se vstupem do kavity (kumariny), viz Obr. 9;
4. vazba mimo kavitu s aktivním místem (benzylsulfonyl-benzoová kyselina), viz Obr. 10.



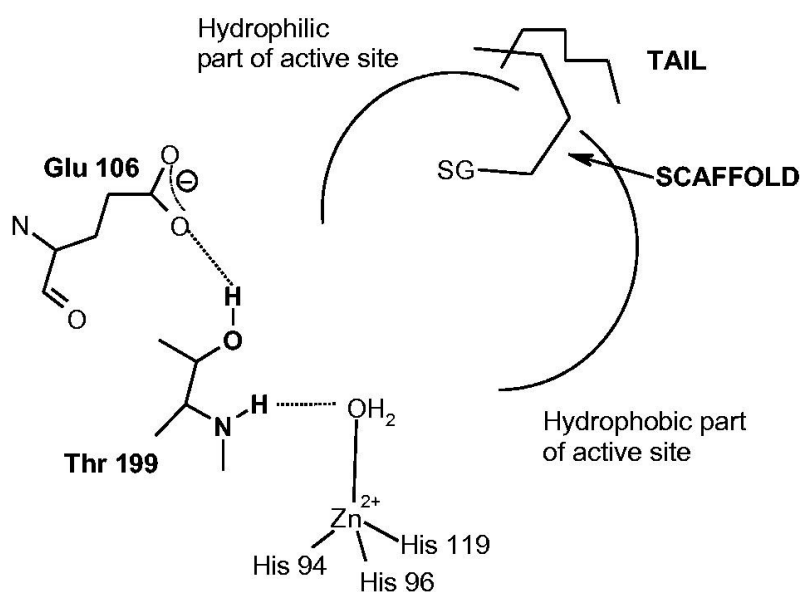
Obr. 7: Inhibice CA koordinací na Zn^{2+} kationt. Převzato z (Supuran, 2015).

(ZBG = Zinc-binding group, tj. funkční skupina vstupující do interakce se zinečnatým kationtem; Scaffold = skelet účinné látky; Tail = ocasní část molekuly účinné látky)



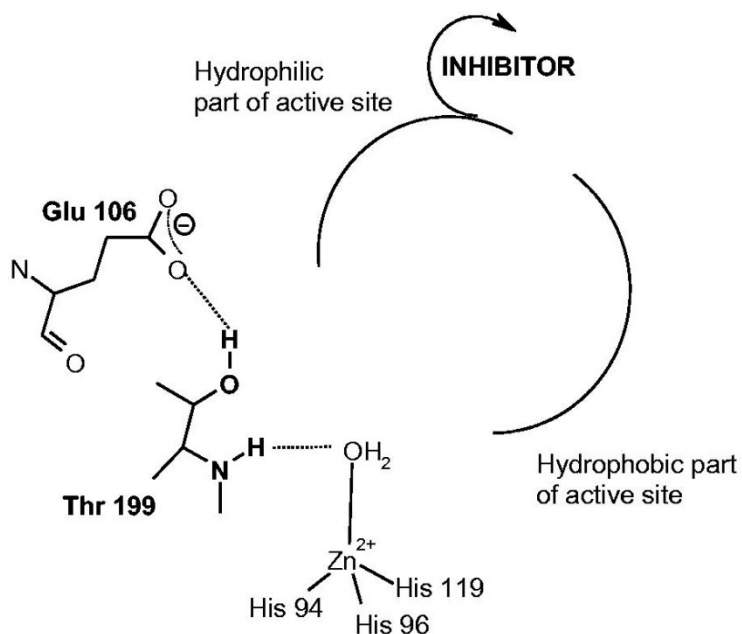
Obr. 8: Inhibice CA interakcí s OH^- aniontem. Převzato z (Supuran, 2015).

(AG = Anchoring Group; tj. funkční skupina vstupující do interakce s koordinovanou molekulou vody; Scaffold = skelet účinné látky; Tail = ocasní část molekuly účinné látky)



Obr. 9: Inhibice CA interakcí se vstupem kavity. Převzato z (Supuran, 2015).

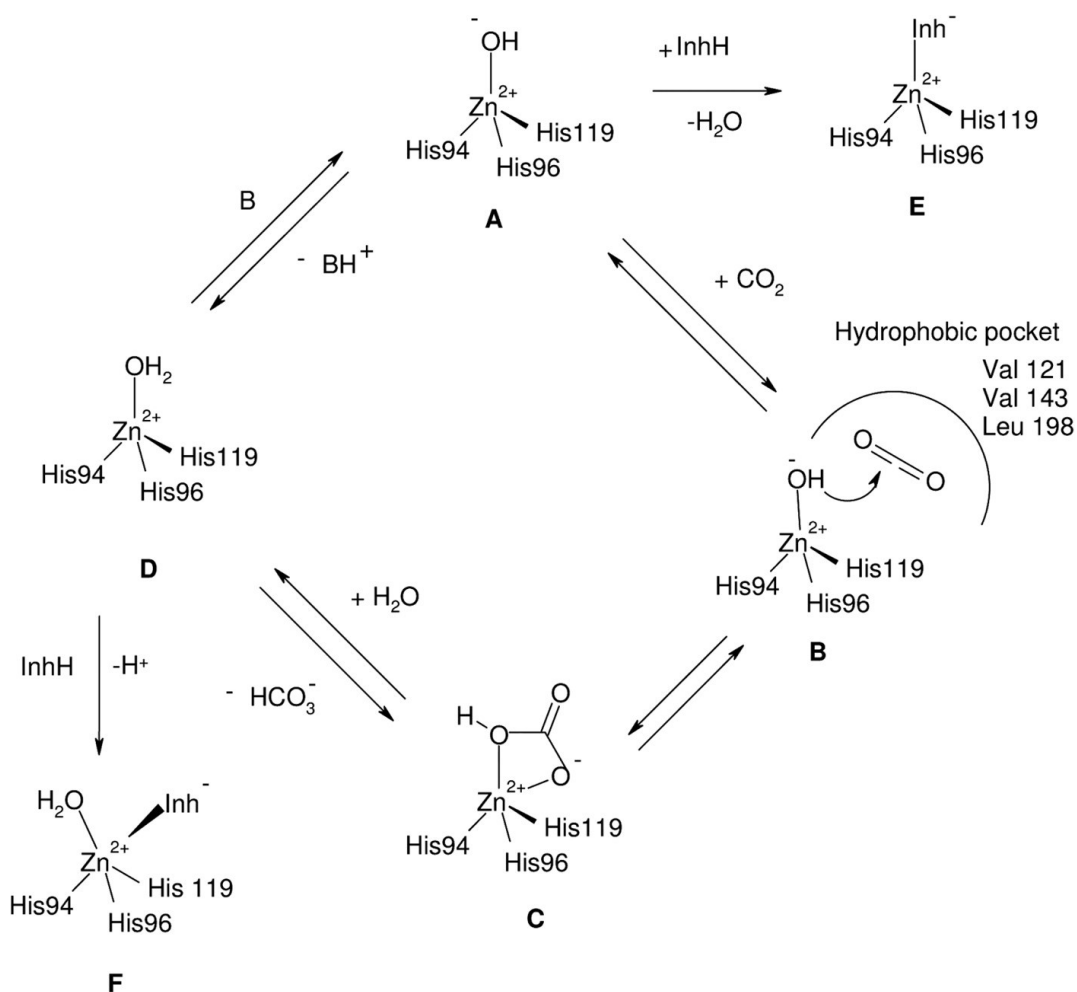
(SG = Sticky Group, tj. funkční skupina okludující kavitální vstup spolu se skeletem; Scaffold = skelet účinné látky; Tail = ocasní část molekuly účinné látky)



Obr. 10: Inhibice CA interakcí mimo kavitu. Převzato z (Supuran, 2015).

Zvláštní kategorií jsou inhibitory s neznámým mechanismem účinku. Tato skupina zahrnuje například sekundární a terciární sulfonamidy, imatinib a nilotinib. (Supuran, 2015)

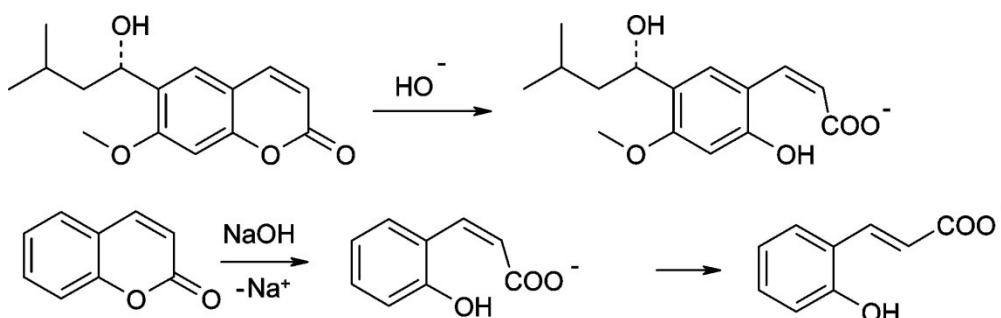
Některé inhibitory se při kontaktu s molekulou vody, vázanou koordinační vazbou na zinečnatý kation, deprotonizují za vzniku aniontu, který teprve vstupuje do kontaktu přímo se zinečnatým kationtem. Nahrazuje tak molekulu vody v koordinační vazbě (viz Obr. 11), která je součástí stabilního tetraedru. Působí tak sulfonamidy, polyaminy, některé karboxyláty a sulfokumariny. (Supuran, 2013)



Obr. 11: Inhibice katalytické aktivity α -CA. Převzato z (Supuran, 2012).

(Inh = inhibitor CA, v neutrálním stavu (InhH) či ve stavu aniontu (Inh⁻))

Kumariny a některé laktony se chovají jako proléčiva a před vazbou do vstupu aktivního místa enzymu podléhají hydrolýze, která je aktivuje. Příklad hydrolýzy dvou kumarinových derivátů je uveden na Obr. 12. (Maresca, a další, 2009) (Supuran, 2013)



Obr. 12: Hydrolýza derivátů kumarinu. Převzato z (Maresca, a další, 2009).

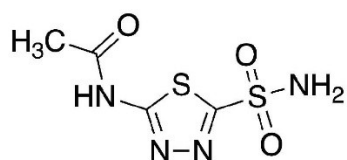
Na zcela odlišné místo se váží CA aktivátory, a to do vstupu kavity obsahující aktivní místo, kde potencují transfer protonu H^+ mezi koordinovanou molekulou vody a vodním prostředím v okolí karboanhydrázy. (Supuran, 2012)

3.1 Inhibitory karboanhydrázy jako antiinfektiva

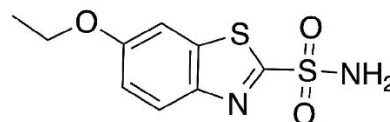
Karboanhydráza představuje pro patogeny vhodný nástroj k překonání obranných mechanismů hostitelského organismu, mezi něž patří i extrémní hodnoty pH (HCl v žaludku, vysoký parciální tlak CO_2 v plicích). Primárně mění hodnoty pH na ty výhodnější pro daný patogen (*Pseudomonas aeruginosa*) a v důsledku funguje jako sekundární podpora hlavního mechanismu kolonizace (*Helicobacter pylori*). (Marcus, Moshfegh, Sachs, & Scott, 2005) (Nishimori, a další, 2007) (Supuran & Capasso, 2020) (Campestre, a další, 2021)

Blokace karboanhydrázové aktivity vede k omezení růstu a zne-možnění kolonizace hostitelského organismu či přímo k narušení přirozeného vnitřního prostředí mikrobu. Důsledkem jsou změny pH a metabolismu, což vede k odchylkám v biosyntetických pochodech či k jejich úplnému přerušování. V určitém případě může dokonce inhibice CA přímo potlačit virulenci původce onemocnění (*Vibrio cholerae*). (Capasso & Supuran, 2015) (Capasso & Supuran, 2015) (Supuran & Capasso, 2020) (Urbanski, Vullo, Parkkila, & Supuran, 2021)

Výrazné inhibice α -CA bylo dosaženo v testech *in vivo* na bakteriích *Neisseria* spp., *Helicobacter pylori*, *Brucella suis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter* spp. a *Enterococcus* spp., a to včetně rezistentních kmenů VRE a *Neisseria gonorrhoeae*. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly stanoveny u registrovaných CAI (acetazolamid, ethoxzolamid na Obr. 13) i u nově syntetizovaných látek z řad sulfonamidových či fenolických derivátů. Výsledky byly porovnány se současně klinicky používanými antimikrobiotiky v daných indikacích, přičemž CAI opakovaně vykazovaly vyšší mikrobiostatický efekt. (Supuran, 2011) (Abutaleb, Elhassanny, Nocentini, Hewitt, Elkashif, & Cooper, 2021) (Giovannuzzi, a další, 2022)



Acetazolamide (AZM)



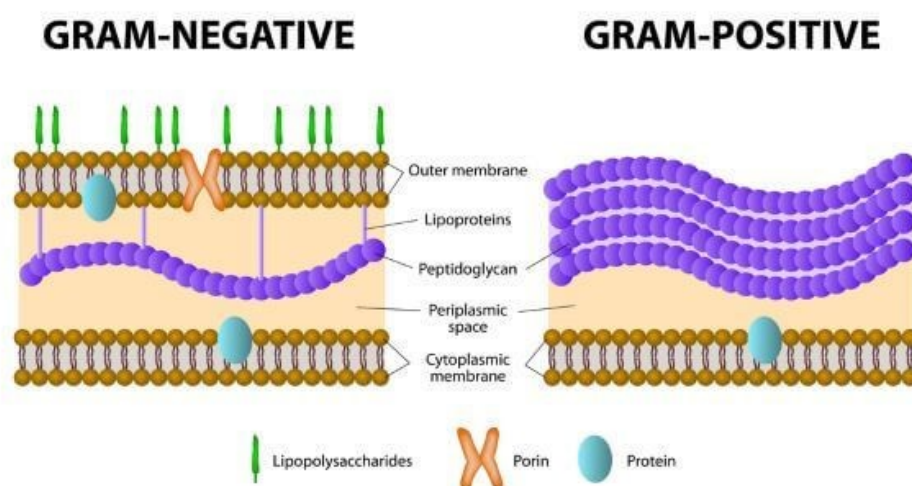
Ethoxzolamide (EZM)

Obr. 13: Příklad registrovaných CAI s antimikrobiotickou aktivitou. Převzato z (Abutaleb, Elhassanny, Nocentini, Hewitt, Elkashif, & Cooper, 2021).

U některých patogenů lze zacílit účinek léčiva současně na cytoplazmatickou β -CA i transmembránovou α -CA, například u *Helicobacter pylori*. Selektivní inhibice β -CA je pozorována poměrně omezeně (většinou dochází i k menšímu ovlivnění α -CA). Pozorována je u druhů *Clostridium perfringens* a *Staphylococcus aureus*, včetně methicilin-rezistentních kmenů (MRSA). Inhibice je však selektivní vůči bakteriální CA bez významnějšího ovlivnění lidské CA. (Nishimori, a další, 2007) (Nishimori, Onishi, Takeuchi, & Supuran, 2008) (Annunziato, a další, 2016) (Modak, Tikhomirova, Gorrell, Rahman, Kotsanas, & Korman, 2019) (Rahman, Tikhomirova, Modak, Hutton, Supuran, & Roujeinikova, 2020) (Vullo, Kumar, Scozzafava, Ferry, & Supuran, 2017) (Urbanski, Vullo, Parkkila, & Supuran, 2021)

Vysoká efektivita a selektivita jsou obzvláště důležité v případě ovlivnění gramnegativních bakterií, které mají oproti grampozitivním bakteriím druhou vnější membránu navíc (podrobné morfologické srovnání membrán těchto dvou typů bakterií je uvedeno na Obr. 14). Je proto těžší efektivně potlačit jejich růst a léčit závažné nosokomiální infekce, které přenáší. Navíc se u nich snadno vyvíjí rezistence na klinicky podávaná antibiotika, resp. antimikrobiotika, v posledních něko-

lik letů stále rychleji. Příklady rezistentních gramnegativních bakterií jsou *Enterobacter* sp. B13, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*. Ze zkoušených látek vykazovaly nejsilnější inhibiční aktivitu vůči α -CA deriváty s prodlouženou molekulou na bázi 4-aminoalkyl-benzensulfonamidu, deriváty fenolu a deriváty kyseliny benzoové. (Annunziato, a další, 2016) (Eminoglu, a další, 2016) (Supuran & Capasso, 2020) (Abutaleb, Elhassany, Nocentini, Hewitt, Elkashif, & Cooper, 2021) (Giovannuzzi, a další, 2022)



Obr. 14: Srovnání struktury gram-negativních a gram-pozitivních bakterií. Převzato z (Latham, 2021).

3.1.1 Vankomycin-rezistentní enterokoky

Bakteriální rod *Enterococcus* je přirozenou součástí mikroflóry lidských i zvířecích organismů. Disponuje mnoha různými mechanismy vhodnými pro překonání nehostinných podmínek životního prostředí, mezi něž patří i efektivní předávání genetické informace. U patogenních druhů se tudíž rychle rozvinula antibiotická rezistence a byly zařazeny mezi tzv. ESKAPE (ESKAPE = *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) patogeny. *Enterococcus faecium* spolu s druhem *Enterococcus faecalis* jsou souhrnně označovány jako VRE, tj. vankomycin-rezistentní enterokoky. Kromě vankomycinu jsou rezistentní i vůči dalším běžně klinicky užívaným antibiotikům jako jsou erythromycin,

tetracyklin, rifampicin, ciprofloxacín, penicilinová antibiotika a ampicilin. (Maleki, a další, 2021) (Uchil, Murali, & Nayak, 2021)

Virulenci patogenních druhů napomáhá několik faktorů, a to enzymatická výbava (gelatináza, cytolysin, hyaluronidáza, karboanhydráza), agregační substance a specifický povrchový protein ESP (enterokokový povrchový protein), který se podílí na kolonizaci cílových tkání. (Maleki, a další, 2021) Ve výzkumu je již delší dobu projevována snaha o vývoj antibiotika účinného proti VRE, pokud možno s minimálním rizikem vzniku rezistence. Zkoumané látky zahrnují mj. heterocyklické struktury (triaziny, oxadiazoly, pyrazoly, indoly, benzimidazoly), chalkony a sulfonamidové deriváty. (Uchil, Murali, & Nayak, 2021) (Supuran & Capasso, 2020)

Cílem účinku těchto látek je právě bakteriální karboanhydráza, konkrétně α -CA přítomná u obou rezistentních druhů. U druhu *Enterococcus faecium* se lze zaměřit i na γ -CA, která není u druhu *Enterococcus faecalis* exprimována.

Biologickou aktivitu výrazně ovlivňuje lipofilita molekuly a substituce objemnějšími alkylovými substituenty zesiluje inhibiční potenciál až několikanásobně. Zároveň zůstává zachována nízká toxicita vůči lidskému organismu. (Capasso & Supuran, 2014) (Kaur, a další, 2020)

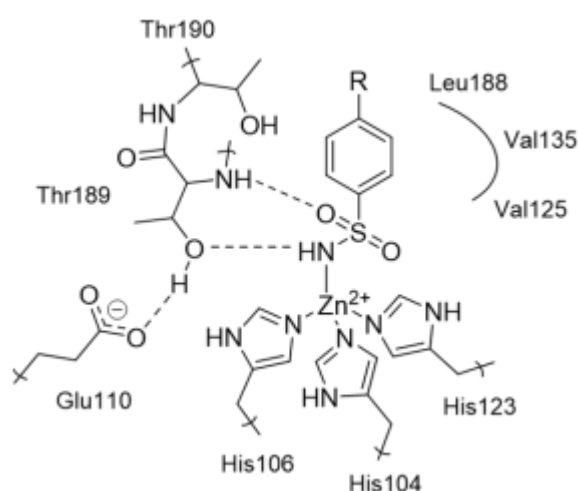
3.1.2 Protozoa

α -, β - a η -karboanhydrázy jsou přítomné rovněž v říši protozoa (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani chagasi*, *Plasmodium falciparum*), lze tedy předpokládat širokospektrý efekt CAI antimikrobiotik zahrnující i jiné infekční patogeny než bakterie. (Capasso & Supuran, Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets, 2015)

Na protozoa nejspíše CAI účinkují podobným mechanismem jako na bakterie. Ovlivňují činnost α i η -CA, tj. karboanhydráz s nejvyšší příbuzností ze všech dalších rodin CA. V terapii by mohly být CAI použity v případě infekcí způsobených *Plasmodium falciparum* (intracelulární patogen z řad prokaryotických organismů), *Trypanosoma* spp. (především druh *Trypanosoma cruzi*). I zde je pozorováno selektivní potlačení činnosti mikrobiální CA bez ovlivnění lidské CA. (Annunziato, a další, 2016) (Del Prete, De Luca, De Simone, Supuran, & Capasso, 2016) (Vermelho, Cardoso, Ricci Junior, dos Santos, & Supuran, 2017)

3.1.3 Zvýšení selektivity

Jedním z možných přístupů pro zvýšení selektivity CA inhibitorů je zaměřit se na vstup a stěny kavity aktivního místa a na aminokyseliny, které je tvoří a s nimiž mohou CAI interagovat. Interakce lze dosáhnout připojením funkčních skupin schopných vytvářet vodíkové či solné můstky (jmenovitě amino-, imino- a hydroxy-skupiny) a jejich deriváty vytvořené alkylací, acylací, arylsulfonací, kondenzací a dalšími reakcemi. Příklad ukotvení CAI v kavitě na základě interakce s aminokyselinovými zbytky je uveden na Obr. 15. (Supuran, 2012) (Bonardi, a další, 2021)



Obr. 15: Stabilizace benzensulfonamidu v kavitě α -CA u *Vibrio cholerae*. Převzato z (Bonardi, a další, 2021).

Výše zmíněné funkční skupiny vytvářejí tzv. „ocas“ molekuly, který dosahuje dle své délky do různých částí kavity, někdy až po její vstup. Zároveň ovlivňují celkovou hydrofilitu/lipofilitu molekuly, stejně tak i její polaritu, což je potřeba zvážit ve vztahu k zamýšlené lékové formě (např. vodné kapky v léčbě glaukomu). (Supuran, 2012)

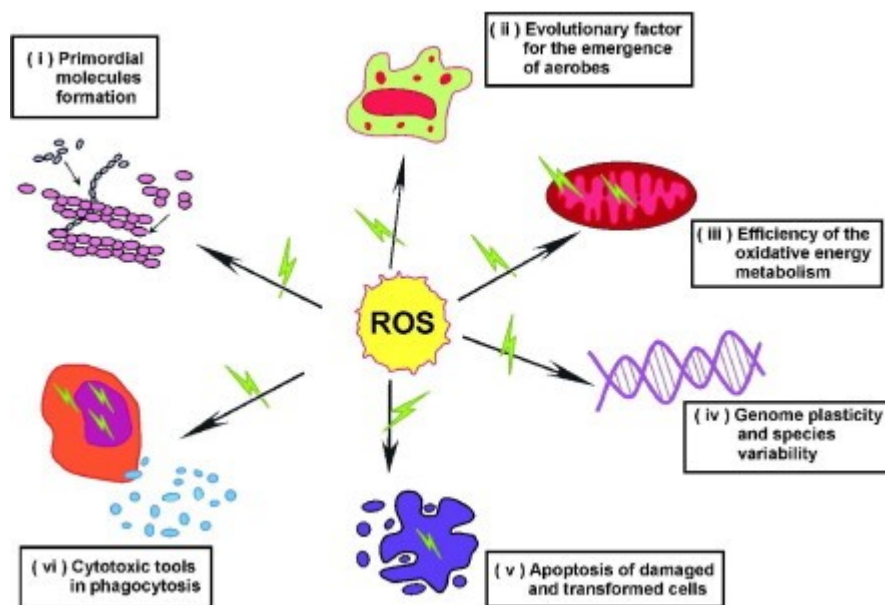
Na účinnost CAI má výrazný vliv i flexibilita celého skeletu sloučeniny. Mohou-li se natáčet a napínat vazby v molekule inhibitoru, může celá sloučenina zaujmout co nejlepší konformaci pro dosažení aktivního místa. Skelet a ocas inhibitoru se pak mohou přizpůsobit tvaru kavity a stabilizovat svoji pozici interakcí s aminokyselinovými zbytky v okolí. Vcelku vysoký stupeň flexibility umožňují aminové linkery mezi skeletem, hlavní funkční skupinou a ostatními částmi molekuly, popř. delší

alkylové linkery. (Bozdog, a další, 2014) (Supuran, 2018) (Supuran, 2021) (Bonardi, a další, 2021)

3.2 Inhibitory karboanhydrázy jako antioxidanty

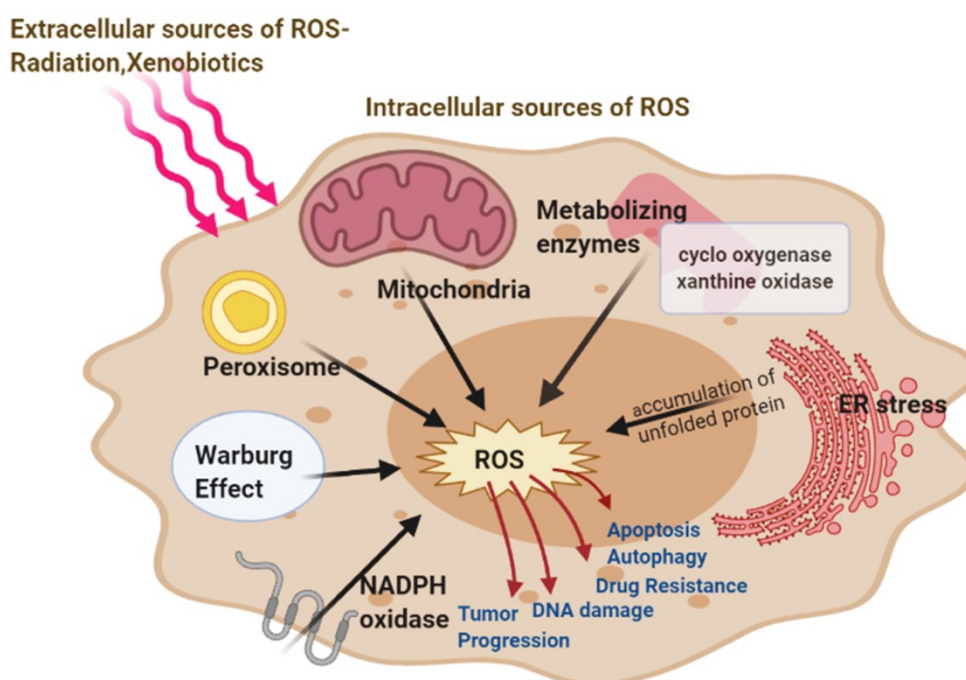
Oxidační stres je hluboce zkoumaným fenoménem, definovaným jako nerovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty v organismu, kdy lze zaznamenat narůstající převahu na straně prooxidantů. (Sies H. , Oxidative Stress: Introductory Remarks, 1985) To vede k narušení redoxní signalizace a regulace organismu, což má za následek poškození endogenních molekul až buněčnou smrt. (Sies & Jones, 2007)

Oxidace a redukce jsou jedněmi z mnoha reakcí, které se odehrávají v organismu zcela přirozeně a mají důležitou úlohu, pokud nad nimi organismus neztratí kontrolu. Účastní se buněčné signalizace, zahrnující např. elektronový transfer či fosforylaci/defosforylaci. Podílí se i na metabolických pochodech, např. odbourávání prooxidačních metabolitů (superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál), a dalších procesech, které jsou uvedené na Obr. 16. (Gagné, 2014) (Sies H. , 2015) (Sies H. , 2019) (Jaganjac, Milkovic, Zarkovic, & Zarkovic, 2022)



Obr. 16: Přínos endogenní produkce ROS. Převzato z (Juránek, Nikitovic, Kouretas, Hayes, & Tsatsakis, 2013).

Při deregulaci těchto pochodů dochází k nadměrné produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Na konci řetězce reakcí stojí lipoperoxidace, oxidační poškození genetické informace a oxidační poškození tkání, jak je znázorněno na Obr. 17. To může být projevem stárnutí, přítomností toxického xenobiotika či nemoci. Potlačení nadměrné produkce těchto reaktivních chemických entit se proto dostává do popředí zájmu medicíny a s ní souvisejícího výzkumu. (Shankar & Mehendale, 2014) (Chatterjee, 2016) (Jaganjac, Milkovic, Zarkovic, & Zarkovic, 2022)



Obr. 17: Patofyziologická endogenní produkce ROS. Převzato z (Arfin, a další, 2021).

Vývoj účinných antioxidantů je klíčový především v prevenci a terapii neurodegenerativních chorob, které kombinují stárnutí a patofyziologické podněty zároveň. Bylo by možné zastavit rozvoj Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby či roztroušené sklerózy a zmírnit následky cerebrální ischemie. (Chatterjee, 2016) (Ortiz, a další, 2017) (Jaganjac, Milkovic, Zarkovic, & Zarkovic, 2022)

Dle dosavadních výsledků by antioxidanty mohly být efektivní i v boji proti rakovině. Nadměrná produkce ROS propaguje šíření rakoviny, na druhou stranu se endogenní ROS účastní ochranných mechanismů vedoucích ke zničení nádoru. (Feinendegen, 2002) (Halliwell, 2007)

(Juránek, Nikitovic, Kouretas, Hayes, & Tsatsakis, 2013) (Milkovic, Gasparovic, Cindric, Mouthury, & Zarkovic, 2019)

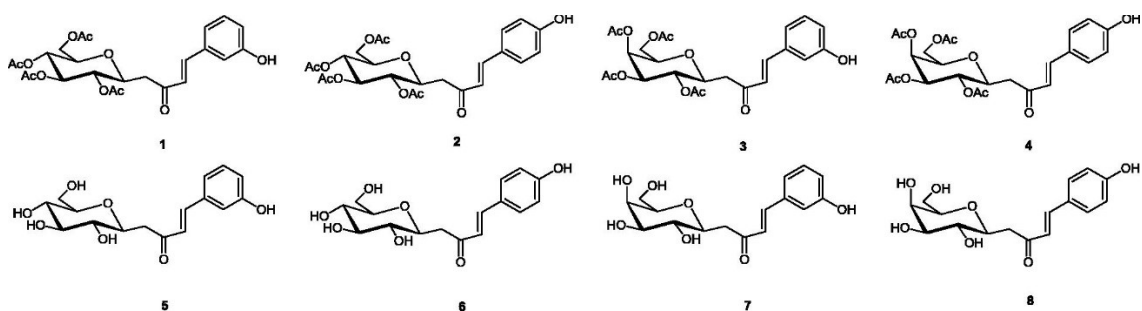
Jako účinné antioxidanty se prokazují právě inhibitory karboanhydráz, zejména ty založené na *s*-triazinovém skeletu. Jejich antioxidační působení jde zároveň v synergii s antimikrobiotickým účinkem. Infekce způsobené vnějšími patogeny vždy doprovází oxidační stres, a to jako ochranný prvek imunitního systému. Nadprodukce ROS a RNS však vyvolává zánět, snižuje reaktivitu tkáně na léčbu a vede k trvalému poškození buněk a buněčných struktur. (Palanisamy, Kirk, Ackart, Shanley, Orme, & Basaraba, 2011) (Zaro, Bortolotti, Riafrecha, Concellón, Morbidoni, & Colinas, 2016)

Z *s*-triazinových derivátů byla výrazná antioxidační aktivita prokázána u struktur obsahujících benzensulfonamidový motiv a další substituenty tvořené aromátem s hydroxylovou či jinou kyslíkatou funkční skupinou. Ty jsou zřejmě zodpovědné za antioxidační efekt celé struktury. Hydroxylová skupina se pravděpodobně účastní elektronového transferu s prooxidantem za vzniku kationtového radikálu, který je stabilizován delokalizací elektronu v aromatickém systému. (Lolak, Boga, Tuneg, Karakoc, Akocak, & Supuran, 2020) (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Havránková, a další, 2021)

Ještě větší stabilizaci poskytuje chalkonový motiv, kde se delokalizace účastní také keto-skupina a dvojitá vazba mezi benzenovými jádry. Tento efekt je navíc potencován elektron-akceptorním charakterem keto-skupiny. Kromě vychytávání radikálů chalkonový motiv potlačuje lipoperoxidaci erythrocytů a zastavuje řetězovou reakci způsobující zlomy ve vláknech DNA. (Singh, Anand, & Kumar, 2014) (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020)

Kromě *s*-triazinových derivátů vykazují vysokou antioxidační aktivitu i další dusíkaté heterocykly (deriváty pyridinu a chinoxalinu) a látky obsahující chalkonový či fenolový motiv (*C*-cinnamoyl-glykosidy, viz Obr. 18). (Bekircan, Küxük, Kahveci, & Kolayili, 2005) (Zaro, Bortolotti, Riafrecha, Concellón, Morbidoni, & Colinas, 2016) (Reddy, a další, 2021) (Singh, a další, 2021)

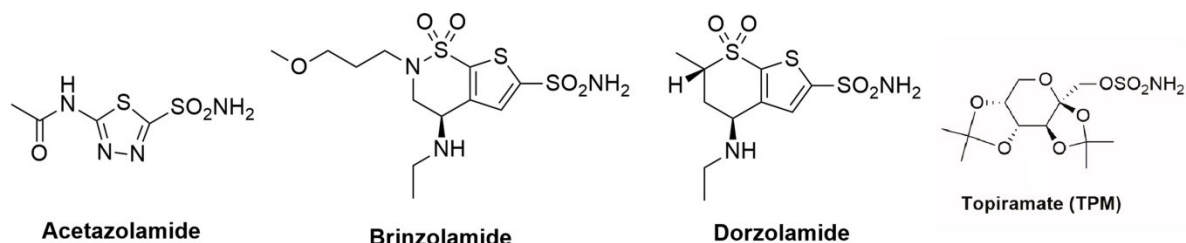
INHIBICE KARBOANHYDRÁZA MECHANISMUS ÚČINKU



Obr. 18: Glykosidické deriváty chalkonu, resp. fenolu. Převzato z (Zaro, Bortolotti, Riafrecha, Concellón, Morbidoni, & Colinas, 2016).

4 Chemická struktura inhibitorů mikrobiálních karboanhydráz

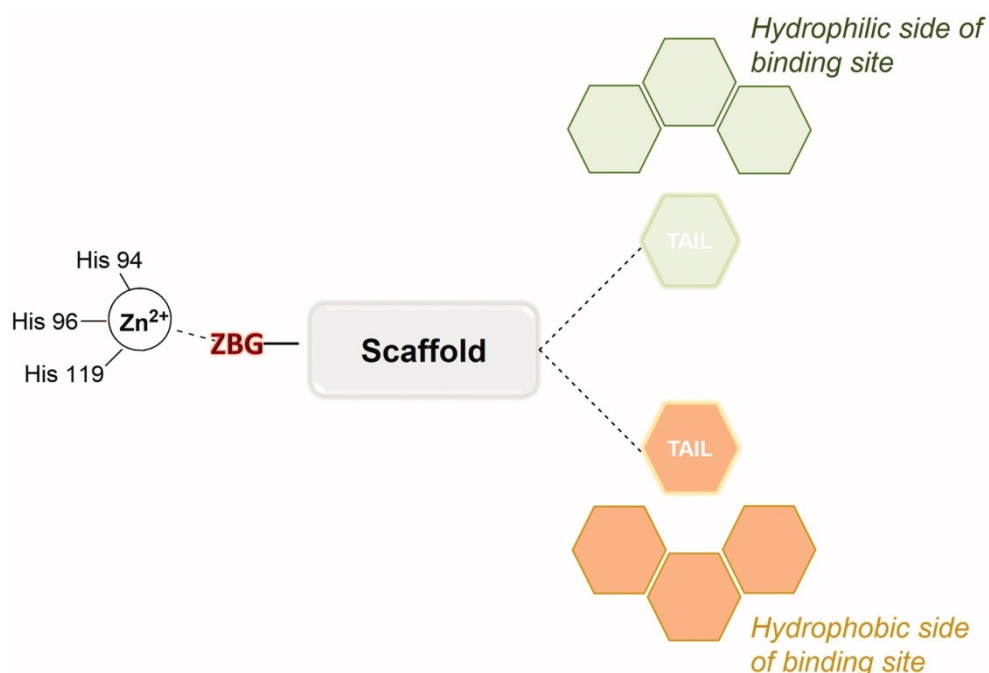
Dobré inhibiční vlastnosti vůči CA vykazuje celá škála sloučenin obsahujících nejčastěji aminové a amidové funkční skupiny navázané na aromatický či heterocyklický motive. Nejvíce osvědčenou skupinou látek pro inhibici CA však stále zůstávají, již od svého objevu, sulfonamidy a jejich deriváty, sulfamidy a sulfamáty. Několik příkladů klinicky používaných CAI z řad sulfonamidů a sulfamátů je uvedeno na Obr. 19. (Supuran, 2012) (Kumar, Rulhania, Jaswal, & Monga, 2020) (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020)



Obr. 19: Klinicky používané sulfonamidy a sulfamáty. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).

Ty lze navázat na různé nosné části, ideálně podporující účinek těchto funkčních skupin či zlepšující farmakokinetické vlastnosti nové molekuly. Dohromady vytváří tzv. farmakofor, charakterizovaný jako specifická geometrická struktura s přesnými sterickými a elektronovými vlastnostmi. Ty jsou dány přítomností konkrétních funkčních skupin na určitém skeletu, které společně farmakofor vymezují. (Wermuth, Ganellin, Lindberg, & Mitscher, 1998) (Langer & Hoffmann, 2006) (Yang, 2010) (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020)

Farmakofor inhibující karboanhydrázovou aktivitu tvoří tři základní části – hlavní funkční skupina, vázající se většinou na kation kovu (nejčastěji zinečnatý kation), skelet a „ocasní“ část. Ta se skládá z hydrofobní a hydrofilní části, které interagují s aminokyselinovými zbytky v kavitě enzymu. Obecný charakter farmakoforu je znázorněn v Obr. 20, v tomto případě se jedná o inhibitor působící přímo na kation kovu, zde zinečnatý kation α -CA. (Bozdag, a další, 2014) (Supuran, 2015) (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020) (Supuran, 2020)

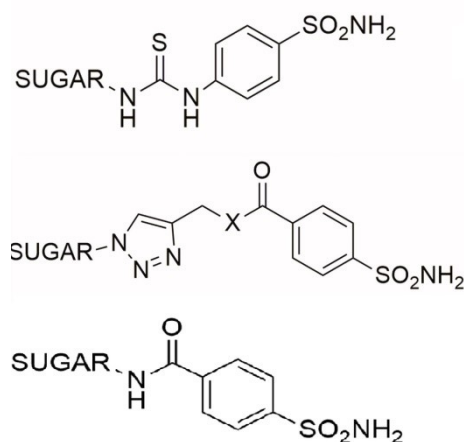


Obr. 20: Obecná struktura inhibitorů karboanhydráz. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).

(ZBG = Zinc-binding Group, tj. funkční skupina vstupující do interakce se zinečnatým kationtem, potažmo ostatními kationty kovu přítomný v aktivním místě CA)

V první až druhé generaci inhibitorů karboanhydrázy tvoří skelet obvykle benzenové jádro. V dalších generacích je benzen zaměněn za jiné aromatické/heterocyklické prvky, jež výrazněji potencují CA-inhibiční aktivitu (pyrimidin, pyrazolin, indol a jeho derivát isatin, popř. acyklické prvky typu selenourea použitelné dále jako prekurzor heterocyklu). Z heterocyklů se do popředí zájmu dostaly inhibitory založené na triazinovém skeletu, charakteristické vysokou účinností i selektivitou. (Kumar, Rulhania, Jaswal, & Monga, 2020)

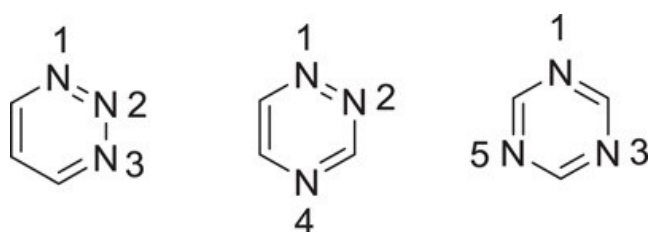
V jiných indikacích, než je antimikrobiotické použití se jako skelet osvědčil také glykosidický motiv, např. u klinicky podávaného antikonvulziva topiramátu a jeho analogů. Současně je zkoumáno využití glykosidických CAI v léčbě rakoviny, příklad několika takových struktur je uveden na Obr. 21. (Winum, Poulsen, & Supuran, 2008) (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020)



Obr. 21: Glykosidické CAI. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).

4.1 Inhibitory založené na triazinovém skeletu

Mezi jedny z nejlepších farmakoforů se silnou CA inhibiční aktivitou patří sulfonamidové deriváty navázané na triazinu. Triazin je heterocyklickou sloučeninou obsahující tři molekuly dusíku v různých polohách, čímž vytváří 1,2,3-triazin, 1,2,4-triazin a 1,3,5-triazin (viz Obr. 22). Ve vývoji léčiv si získal triazin pozornost pro své výhodné vlastnosti, především vysoký stupeň stability a rozsáhlou biologickou aktivitu. Pomocí vhodné substituce lze sloučeniny obsahující triazinový motiv zacílit na široké spektrum biologických struktur, a tím získat léčivé látky v různých indikacích. Ty zahrnují léčbu rakoviny, HIV, epilepsie, Alzheimerovy choroby, malárie a různých zánětlivých onemocnění vč. infekcí způsobených vnějšími patogeny. (Ravi, Nirupam, Srabanti, & Aparoop, 2012) (Shah, Modh, & Chikhalia, 2014) (Singla, Luxami, & Paul, 2015) (Cascioferro S., a další, 2017) (Singh, a další, 2021) (Gharat, Prabhu, & Khambete, 2022)

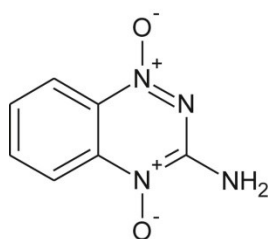


Obr. 22: Struktura triazinu. Převzato z (Gharat, Prabhu, & Khambete, 2022).

Výhodou triazinu je také jeho komerční dostupnost jako výchozí suroviny pro další substituce. Nejčastěji je ve výzkumu používán 1,3,5-triazinový skelet se symetrickým rozmístěním atomů dusíku (označován proto jako *s*-triazin) – výchozí látkou je tedy především kyanurchlorid, tj. 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazin. (Singla, Luxami, & Paul, 2015) (Cascioferro S. , a další, 2017) (Bahar, Liu, Garafalo, Kallenbach, & Ren, 2015) (Gharat, Prabhu, & Khambete, 2022)

Antimikrobiotická aktivita derivátů *s*-triazinu narůstá se zvyšující se lipofilitou a zároveň se snižující se bazicitou substituentů. Toto působení potencuje také přítomnost dalšího aromatického, popř. heterocyklického jádra kromě samotného *s*-triazinu, a zároveň rozšiřuje spektrum působení o fungální patogeny. (Mooibroek & Gamez, 2007) (Mewada, Shah, Lakum, & Chikhalia, 2018) (Liu, Long, Rakesh, & Zha, 2020)

Podstatnou biologickou aktivitu projevují i deriváty 1,2,4-triazinu, a to proti rakovině, HIV, zánětu i mikrobiálním patogenům. Některé sloučeniny založené na tomto motivu jsou dokonce i schváleny pro klinické použití (antivirotikum azaribin, antikonvulzivum lamotrigin) či jako experimentální léčba (tirapazamin v léčbě rakoviny, viz Obr. 23). Největší potenciál prokázaly 1,2,4-triaziny kondenzované s dalším aromatickým či heterocyklickým jádrem, a to jako inhibitory cyklin-dependentní kinázy 2, tyrosin-kinázy, glutaminázy 1 a dalších enzymů. (Cascioferro S. , a další, 2017) (Arshad, Bhat, Hoi, Choi, & Athar, 2017)



Obr. 23: Tirapazamin – nové léčivo proti rakovině. Převzato z (Cascioferro S. , a další, 2017).

4.1.1 1,3,5-triazin substituovaný sulfonamidem

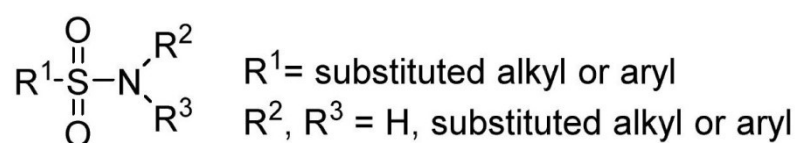
Sulfonamidové deriváty byly prvními známými CA inhibitory a stále zůstávají v čele vysoce efektivních inhibitorů, a to i v neustále se rozšiřujícím poli indikací. Několik léčivých látek se stabilně drží na trhu, např. acetazolamid, brinzolamid a dorzolamid zobrazené na Obr. 24,

dále ethoxzolamid, diclofenamid, zonisamid, celecoxib, sulpirid a další. Klinicky jsou používány v celé řadě indikací zahrnující léčbu některých virových onemocnění, malárie, rakoviny, glaukomu či deprese. (Supuran, Nicolae, & Popescu, 1996) (Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, 2008) (Carta, Scozzafava, & Supuran, 2012) (Guler, Capasso, & Supuran, 2015) (Apaydin & Török, 2019) (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020)



Obr. 24: Příklad klinicky používaných inhibitorů na bázi sulfonamidu. Převzato z (Cuffaro, Nuti, & Rossello, 2020).

Základní strukturu inhibitorů na bázi sulfonamidů představuje amid kyseliny sulfonové navázaný na aromatické či heterocyklické jádro, jak je znázorněno na Obr. 25. Tato funkční skupina je značně polární, a ovlivňuje tedy průchod plazmatickou membránou mikrobů, což je důležité při zaměření inhibice na intracelulární karboanhydrázy. V tom případě podpoří průchod plazmatickou membránou přítomnost dalších elektron-akceptorních skupin na molekule inhibitoru. (Supuran, 2011) (Guler, Capasso, & Supuran, 2015) (Liu, Long, Rakesh, & Zha, 2020)



Obr. 25: Základní struktura sulfonamidů. Převzato z (Apaydin & Török, 2019).

Jako hlavní funkční skupina je sulfonamidový motiv zodpovědný za celkový efekt inhibitoru, který vykazuje proti karboanhydrázám z většiny známých rodin. Substitute ve dvou zbývajících polohách na s-triazinu umožňují zaměření inhibice vůči konkrétní isoformě karboanhydrázy či vůči dalším enzymům, čímž lze výrazně ovlivnit selektivitu účinku. (Havránková, Csöllei, Vullo, Garaj, Pazdera, & Supuran, 2018) (Havránková, Pena-Méndez, Csöllei, & Havel, 2021)

Obecně sulfonamidy inhibují nejsilněji α -CA, s různou intenzitou vůči jednotlivým isoformám. Středně silně působí na cytoplazmatické a velmi silně na transmembránové isoformy. β -CA je inhibována srovnatelně s α -CA, dle předpokladů i stejným mechanismem. Inhibiční efekt obecně potencuje substituce alifatickým či aromatickým alkylem či alkyl-aminem. Substituce polárnějšími kyslíkatými funkčními skupinami (např. methoxy-skupinou) může do určité míry efektivitu snížit, pokud nejsou na molekule navázány další aminové substituenty, především aromatické aminy. Ty zvyšují inhibiční potenciál i ve formě aminokyseliny substituentů. (Garaj V. , a další, 2005) (Carta, a další, 2011) (Mikuš, Krajčiová, & Mikulová, 2018) (Al Rasheed, Malebari, Dahlous, Fayne, & El-Faham, 2020) (Mikulová, Kružlicová, Pecher, Petreni, Supuran, & Mikuš, 2021) (Abutaleb, Elhassanny, Nocentini, Hewitt, Elkashif, & Cooper, 2021)

Ve vodném prostředí organismů je sulfonamid přítomný jako amidový anion, který může interagovat s kationtem kovu v aktivním místě karboanhydráz. Celá funkční skupina pak vytváří vodíkové můstky s aminokyselinovými zbytky v kavitě, což ji v aktivním místě stabilizuje. Jelikož je kavita β -CA užší a kratší než kavita α -CA, musí být farmakofor dostatečně flexibilní, aby mohl svou konformaci přizpůsobit tvaru kavity. (Supuran & Capasso, 2020) (Bonardi, a další, 2021)

Na rozdíl od α -CA se β -CA nevyskytuje u obratlovců a její selektivní inhibicí by byla vyloučena většina možných nežádoucích účinků souvisejících s působením na lidskou α -CA. Ve zkouškách *in vitro* byl takto úspěšně inhibován růst druhů *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens* a další. (Nishimori, a další, 2007) (Syrjänen, Kuuslahti, Tolvanen, Vullo, Parkkila, & Supuran, 2015) (Vullo, Kumar, Scozzafava, Ferry, & Supuran, 2017) (Urbanski, a další, 2020)

Inhibice γ -CA je silná jak u sulfonamidových derivátů, tak i u derivátů s kyselinou amidosulfonovou a probíhá nejspíše podobným mechanismem jako v předchozích případech. Ke stabilizaci inhibitoru v kavitě však dochází jen u větších molekul. Kavita γ -CA je na rozdíl od předchozích velmi široká, a neumožňuje tedy vznik vazeb mezi objemově malým inhibitorem a aminokyselinovými zbytky. (Zimmerman, Innocenti, Casini, Ferry, Scozzafava, & Supuran, 2004) (Bonardi, a další, 2021)

Biologickou aktivitu γ -CAI zvyšuje aromatický či heterocyklický farmakofor a přítomnost elektron-akceptorní skupiny (amin, alkyl-amin). Ta je zde zastoupena samotným *s*-triazinovým skeletem a ami-

novými linkery u jednotlivých substituentů. Inhibicí γ -CA lze potlačit růst především gramnegativních bakterií, např. *Vibrio cholerae*, *Burkholderia pseudomallei*. U mikrobů exprimujících β i γ -CA lze pravděpodobně působit na oba tyto enzymy současně. (Zimmerman, Innocenti, Casini, Ferry, Scozzafava, & Supuran, 2004) (Vullo, a další, 2014) (Del Prete, a další, 2017) (Vullo, a další, 2017)

δ -CA inhibují sulfonamidy slaběji než ostatní zmíněné rodiny CA, zřejmě z důvodu odlišné struktury kavity. Inhibice je silnější u heterocyklického farmakoforu oproti aromatické či alifatické struktuře. Dále ji potencují silně elektron-negativní motivy, např. halogeny. Obecně jsou preferovány inhibitory s prodlouženou molekulou, čehož lze dosáhnout inkorporací delších spojovacích článků, oproti kompaktním inhibitorům s krátkými řetězci nebo zcela bez spojovacích řetězců. (Vullo, a další, 2014)

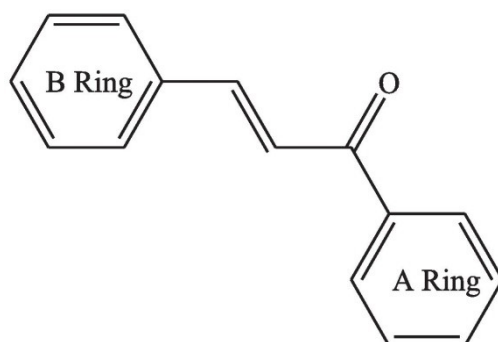
Jen slabě působí sulfonamidy na η -CA, zároveň je zde kladen velký důraz na flexibilitu sloučeniny. Výraznější inhibice dosahovaly látky s menšími substituenty a delšími linkery mezi aromatickými nebo heterocyklickými jádry. (Vullo, a další, 2015) Ještě slabší inhibice byla zaznamenána u ι -CA, bez zjevných souvislostí mezi strukturou inhibitoru a jeho účinkem. Aby bylo možné cíleně vyvinout ι -CAI, je nutné nejprve krystalograficky určit přesnou strukturu enzymu a zjistit, jaké změny nastávají při interakci s inhibitorem. (De Luca, Petreni, Nocentini, Scalon, Supuran, & Capasso, 2021)

Kromě karboanhydráz inhibují sulfonamidové deriváty *s*-triazinu zároveň acetylcholinesterázu, butyrylcholinesterázu a tyrozinázu, přičemž síla inhibice je srovnatelná s inhibicí α -CA (hCA-I a hCA-II). (Cascioferro S. , a další, 2017) (Apaydin & Török, 2019) (Lolak, a další, 2020) (Lolak, Boga, Tuneg, Karakoc, Akocak, & Supuran, 2020)

4.1.2 1,3,5-triazin substituovaný chalkonem

Chalkony jsou ubikvitární obsahové látky rostlin s vlastními farmakologickými účinky, a to jako protirakovinné látky, antioxidanty, antiflogistika, antiparazitika, antibiotika a antiprotozoika. Probíhá mnoho studií zkoumajících jejich efektivitu při léčbě rakoviny, diabetu, HIV, tuberkulózy, malárie, infekcí vyvolaných gram-negativními i gram-pozitivními bakteriemi a dalších onemocnění. (Singh, Anand, & Kumar, 2014) (Zhuang, Zhang, Sheng, Zhang, Xing, & Miao, 2017)

Chemicky jsou chalkony α,β -nenasyčené ketony, jejichž karbonylová skupina je v konjugaci s dvojnou vazbou a benzenovým jádrem, strukturálně zobrazeno na Obr. 26. Toto uskupení je zřejmě zodpovědné za biologickou aktivitu chalkonů. Přirozeně se vyskytují jako cis- i trans-izomery a snadno cyklizují na flavonoidy. (Singh, Anand, & Kumar, 2014)



Obr. 26: Základní struktura chalkonu. Převzato z (Uchil, Murali, & Nayak, 2021).

Substituce sulfonamidových derivátů *s*-triazinu chalkonem ovlivňuje účinek především vůči α -CA, kdy zvyšuje selektivitu vůči hCA VII. Objemnost substituentu vede ke snížení selektivity vůči hCA I a hCA II, na druhé straně však potencuje inhibici mikrobiální CA. Výraznější inhibice je patrná u gramnegativních bakterií, zahrnující druhy *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli* a rezistentní kmeny MRSA a VRE. Na grampozitivní bakterie působí tyto deriváty v různé síle, lišící se mezi jednotlivými druhy bez zjevné souvislosti. (Solankée, Kapadia, Ciric, Sokovic, Doytchinova, & Geronikaki, 2010) (Verma, Verma, Xue, Thakur, Girish, & Rakesh, 2020) (Uchil, Murali, & Nayak, 2021) (Havránková, a další, 2021)

Antimikrobiotický účinek dále zvyšuje přítomnost methoxy-skupiny v poloze 3 na kruhu B, popř. více methoxy-skupin v polohách 2, 3 a 4. Dochází také k rozšíření inhibiční aktivity směrem k antiprotozoikům, konkrétně proti patogenům *Plasmodium falciparum* a *Leishmania braziliensis*. Methoxy-skupina může být nahrazena jinou elektron-donorní funkční skupinou. (Solankée, Kapadia, Ciric, Sokovic, Doytchinova, & Geronikaki, 2010) (Singh, Anand, & Kumar, 2014) (Xu, Wu, Shen, Ji, & Rakesh, 2019) (Verma, Verma, Xue, Thakur, Girish, & Rakesh, 2020)

4.1.3 1,3,5-triazin substituovaný alkylaminem

Substituent typu alkylaminu a jeho derivátů potencuje antimikrobiotický efekt, zejména proti rezistentním kmenům (MRSA, VRE) i proti multi-rezistentnímu kmenu *Pseudomonas aeruginosa*. Zvyšuje lipofilitu celé molekuly, což je důležité pro průnik biofilmem tvořeným některými kmeny bakterií. Ovlivňuje také průchod plazmatickými membránami. (Liu, Long, Rakesh, & Zha, 2020) Zároveň se podílí na interakci s aminokyselinovými zbytky, které tvoří stěnu kavity. (Supuran, 2012)

5 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo připravit zcela nové, dříve neprozkoumané deriváty *s*-triazinu s potenciálním protimikrobním, případně antioxidačním účinkem, jež by bylo možné získat jednoduchou tříkrokovou syntézou, ideálně časově a ekonomicky nenáročnou, založenou na komerčně běžně dostupných chemikáliích. Všechny takto připravené meziprodukty a konečné produkty plně charakterizovat pomocí dostupných metod - $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IČ spektroskopie a další.

Tyto látky by měly rovněž prokazovat dostatečnou biologickou aktivitu, která by z nich učinila potenciální předmět zájmu pro klinické zkoušky. Proto bylo jedním z dalších cílů této práce vyhodnocení jejich biologické aktivity, respektive předání finálních produktů spolupracujícímu pracovišti (Ing. Marcela Nejezchlebová, Ústav molekulární farmacie, FAF MU), kde bude stanovena jejich anti-VRE aktivita. Dalším cílem bylo stanovení antioxidační aktivity u všech syntetizovaných trisubstituovaných derivátů.

6 Výsledky a diskuze

Struktura cílových sloučenin s potenciálním účinkem vůči bakteriální CA přítomné ve VRE byla navržena na základě literární rešerše. S-triazin byl zvolen jako univerzální farmakofor. V cílové struktuře v organismu může vstupovat do různých interakcí zahrnujících kromě kovalentní vazby také koordinační vazbu, vodíkové můstky, iontovou vazbu či interakci volných elektronových párů. Struktura účinné látky je navíc stabilizována delokalizovanými elektrony aromatického kruhu a volnými elektronovými páry atomů dusíku, které se zároveň podílí na donor-akceptorových interakcích. Ty je důležité zvážit při syntéze z důvodu ovlivnění reaktivity molekuly, a pak také při snaze o zaměření účinku na konkrétní cílové místo. (Mooibroek, & Gamez, 2007) (Sharma & El-Faham & de la Torre, & Albericio, 2018) (Gharat & Prabhu, & Khambete, 2022)

Hlavním substituentem s-triazinového skeletu je aminobenzensulfonamid obsahující sulfonamidovou funkční skupinu zodpovědnou za inhibiční účinek. Jako další strukturální motiv byl zvolen aminochalkon, případně jeho derivát obsahující methoxyskupinu v poloze *para*. Deriváty chalkonů zahrnující methoxy skupiny vykazují sami o sobě zajímavou antimikrobiální aktivitu, která by mohla být propojením s s-triazinovým farmakoforem dále potencována. Třetím substituentem je jednoduchý aminoalkohol, který v předchozích studiích podporoval anti-VRE účinek testovaných 1,3,5-triazinylaminobenzensulfonamidových derivátů. (Marques, a další, 2020) (Havránková, a další, 2021)

Základem syntézy cílových sloučenin je nukleofilní substituce 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazinu ve třech samostatných krocích, znázorněných ve Schéma 2. První substituční reakce probíhá exotermně, je tedy třeba reakční směs chladit na 0 °C. Substituce druhého atomu chloru již probíhá za pokojové teploty, zatímco pro substituci do třetí polohy je nutné reakční směs zahřívát pod refluxem, na teplotu vyšší než 60 °C. (Singh, Anand, & Kumar, 2014)

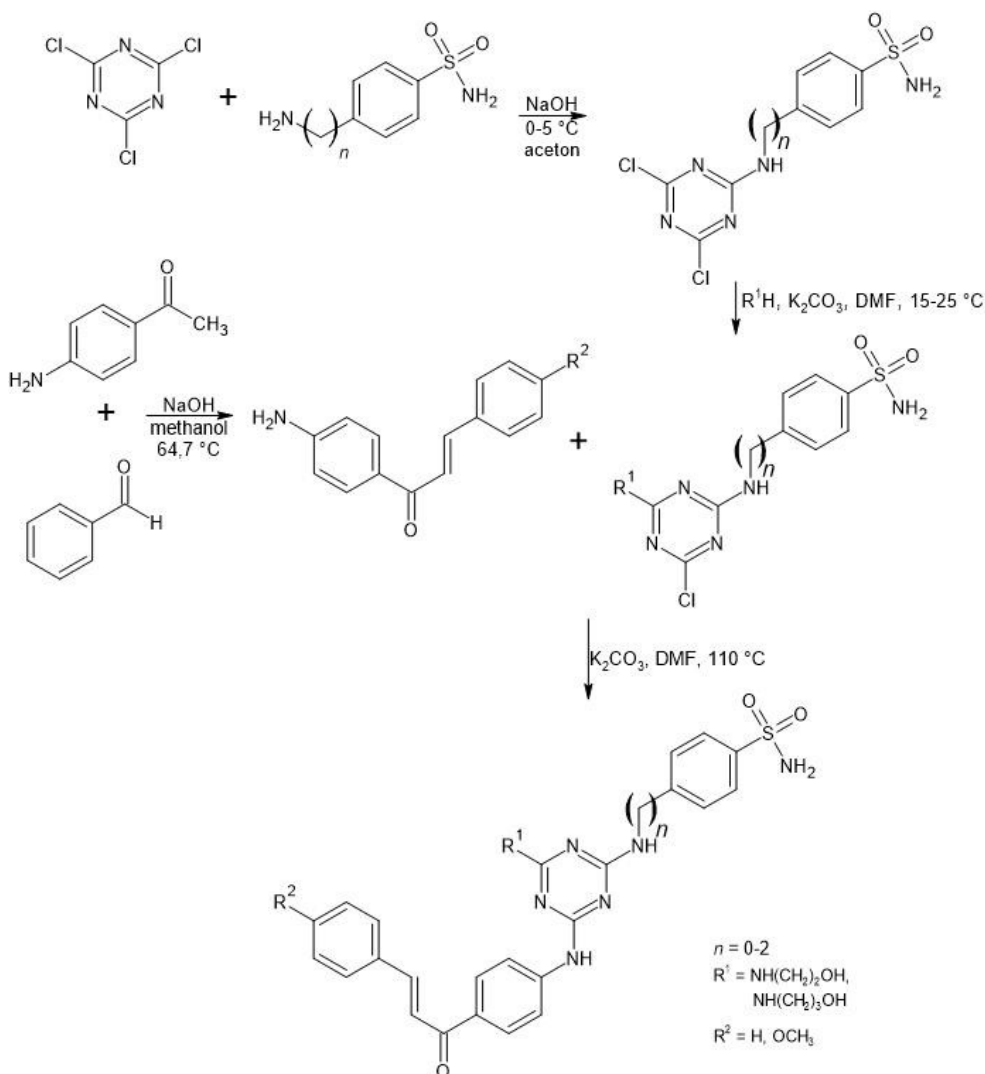


Schéma 2: Obecné schéma syntézy produktů 3A-K.

Manipulace s teplotou reakční směsi umožňuje ovládat průběh reakce tak, aby substituce probíhala v jednotlivých krocích a nedocházelo k substituci ve více polohách současně, či k oxidaci na 1,3,5-triazin-2,4,6-trion. (Blotny, 2006) (Al-Zaydi, Khalil, El-Faham, & Khattab, 2017) (Sharma, Sheyi, de la Torre, El-Faham, & Albericio, 2021)

Průběh reakce ovlivňuje také struktura samotného nukleofilu, jeho zásaditý či kyselý charakter, přítomnost dalších substituentů a zvolené rozpouštědlo. Mezi dobře reagující nukleofily patří standardně aminy, alkoholy, thioly aj. Reakce probíhá úspěšně za přítomnosti akceptoru vznikajícího chlorovodíku, např. uhličitanu sodného, hydroge-

uhličitanu sodného, hydroxidu sodného, popř. terciárního aminu. (Blotny, 2006) (Sharma, Sheyi, de la Torre, El-Faham, & Albericio, 2021)

Pořadí substituce nukleofilů je důležité pro celkovou reaktivitu a úspěšné dosažení žádaných produktů. Obecně by jako první by měl do reakce vstupovat substituent na bázi alkoholu, následuje thiol a jako poslední by měl vstupovat amin, vůči němuž je triazinové jádro chemicky selektivní, reaguje s ním tudíž nejochoťněji. (El-Faham, a další, 2020) (Sharma, Sheyi, de la Torre, El-Faham, & Albericio, s-Triazine: A Privileged Structure for Drug Discovery and Bioconjugation, 2021)

S každou další substitucí klesá výtěžnost reakcí, zřejmě z důvodu postupného snižování reaktivity s-triazinového jádra. To může být způsobeno narůstajícím počtem substituentů navázaných přes aminogrupy, které se obecně chovají jako elektron-donory, a tudíž potlačují ochotu sloučeniny reagovat v nukleofilní substituční reakci. (Saluja, Tiwari, Vullo, & Supuran, 2014)

Pro syntézu trisubstituovaných derivátů triazinu lze rovněž použít tzv. „one-pot“ syntézy katalyzovanou crown-ethery či palladiem umožňující průběh celé reakce v jednom kroku. Dochází tak ke zkrácení reakčního času a zjednodušení metodického postupu, významně však stoupají vstupní náklady. Zcela jiný přístup představuje počáteční trojnásobná substituce jedním nukleofilem za vzniku symetrického mezi-produktu, jenž dále reaguje na finální produkty. Zvýšení nákladů není tak výrazné, komplikuje se však reakční postup a narůstá možnost chybné reakce vedoucí k zisku nežádoucích produktů. (Blotny, 2006)

6.1 Syntéza monosubstituovaného triazinu

Z literární rešerše vyplývá, že nejvyšší výtěžek, a tedy i nejvhodnější podmínky pro substituci prvního atomu chloru výchozího 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazinu, vykazovala reakce v acetonu při 0 °C s vodným roztokem hydroxidu sodného jako bází. Reaktanty mohou vstupovat do reakce v ekvimolárním množství včetně báze, která může být případně dodána v dvojnásobném látkovém množství (v závislosti na charakteru nukleofilu). (Krajčáková, Pecher, Garaj, & Mikuš, 2017) (Senapathi, Bommakanti, Vangara, & Kondapi, 2021) (El-Faham, a další, 2020) (Al-Zaydi, Khalil, El-Faham, & Khattab, 2017) (Garaj V., a další, 2004)

Nahrazení hydroxidu sodného uhličitanem draselným poskytuje nižší výtěžek, a to i při chlazení reakční směsi pod teplotu 5 °C.

(Newton, a další, 2021) Zdvojnásobení látkového množství nukleofilu oproti *s*-triazinu vede k substituci ve více polohách, což může být žádoucí v případě snahy o syntézu symetrického derivátu, při vícekrokové syntéze asymetrického derivátu se toho však využívá méně, a to při sekundární substituci do zbývajících dvou poloh *s*-triazinu. (Garaj V. , a další, 2005)

6.1.1 Výsledky syntézy monosubstituovaného triazinu

Látky 1A-C byly syntetizovány za podmínek uvedených ve Schéma 3. Jejich struktura je zobrazena na Obr. 27.

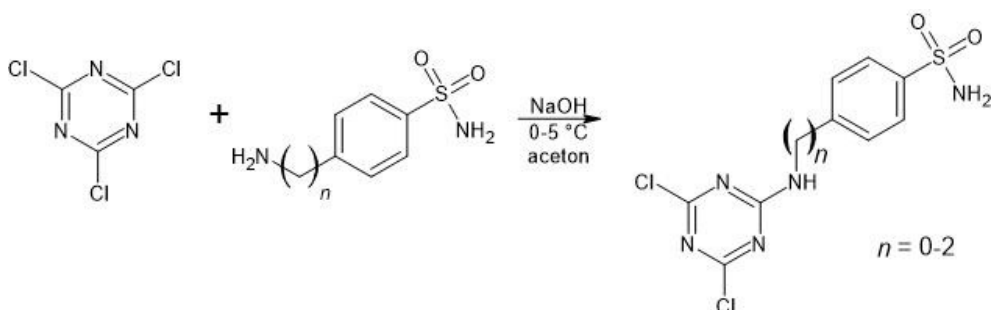
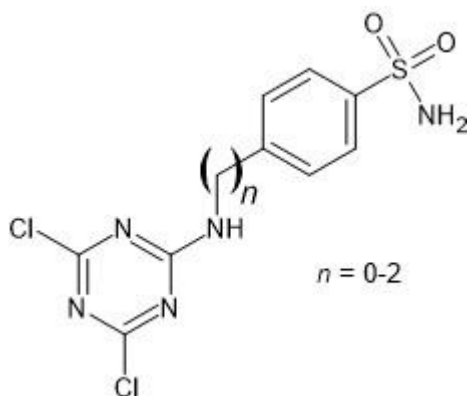


Schéma 3: Obecné schéma syntézy meziproduktů 1A-C.



Obr. 27: Struktura produktů 1A-C.

Substituce aminobenzensulfonamidu bez alkylového linkeru vykazovala nejnižší výtěžnost, a to nejspíše ze dvou důvodů:

1. sterické pnutí způsobené blízkostí *s*-triazinového jádra a benzenového jádra sulfonamidového derivátu;

2. konjugovaná vazba amino-skupiny s benzenovým jádrem, a po-
tažmo sulfonamidovou funkční skupinou, výrazně ovlivňující par-
ciální náboj aminu.

Amino-skupina vykazuje pozitivní mezomerní efekt, který spolu se
záporným mezomerním efektem a záporným indukčním efektem sulfo-
namidové skupiny způsobuje posun elektronů směrem k sulfonamidu.
Tím se snižuje elektronová hustota aminu a stává se slabším nukleofi-
lem, který je méně ochotný vstupovat do nukleofilní substituční reakce.

Tab. 1: Přehled monosubstituovaných produktů 1A-C

Název	n	M _r [g/mol]	Reakční čas [hod]	Výtěžnost reakce [%]
1A	0	320,16	4-5	17,89
1B	1	334,18	4-5	44,86
1C	2	348,20	4-5	83,33

6.2 Syntéza disubstituovaného triazinu

Vyhledávání vhodných reakčních podmínek pro substituci druhého
atomu chloru na *s*-triazinovém skeletu v literatuře poskytovalo užší
spektrum možností, dané přítomností konkrétního primárního substi-
tuentu a jeho derivátů. Reaktanty je vhodné dodat v ekvimolárním
množství, aby nedošlo k vícenásobné substituci ve více polohách najed-
nou, podobně jako i u ostatních substitučních reakcí; báze může být
dodána ve větším látkovém množství. (Carta, a další, 2011)

Nejčastěji voleným rozpouštědlem je dimethylformamid (DMF), u
báze je to *N,N*-diisopropylethylaminem (DIPEA) nebo uhličitan drasel-
ný. Reakce probíhá za laboratorní teploty nebo je jen mírně zahřívána,
přičemž celkový reakční čas se pohybuje ideálně mezi 24-72 hod.
(Havránková, Csöllei, & Pazdera, 2019). Výsledný produkt je zfiltrován
za současného promytí čištěnou vodou, s použitím vakua, a následně
rekrytalizován z acetonu, v němž je rozpuštěn a následně vysrážen
isopropylalkoholem. (Carta, a další, 2011) (Havránková, Csöllei, Vullo,
Garaj, Pazdera, & Supuran, 2018)

6.2.1 Výsledky syntézy disubstituovaného triazinu

Látky 2A-F byly připraveny za podmínek uvedených ve Schéma 4. Jejich struktura je znázorněna na Obr. 28.

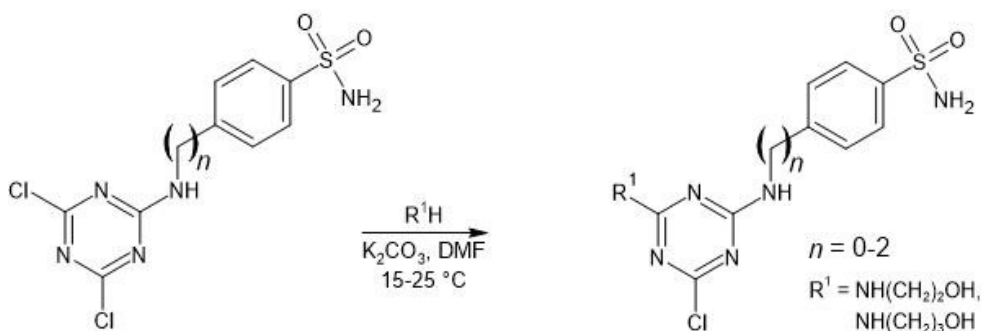
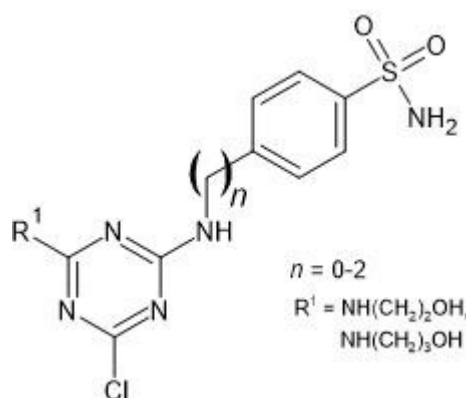


Schéma 4: Obecné schéma syntézy produktů 2A-F.



Obr. 28: Struktura produktů 2A-F.

Vyšší výtěžky vykazuje substituce aminoethanolem oproti amino-propanolu, přičemž výtěžnost reakcí klesá v řadě derivátů aminobenzensulfonamid – 4-aminomethylbensulfonamid – 4-aminoethylbensulfonamid.

Tab. 2: Přehled disubstituovaných produktů 2A-F

Název	n	R ¹	M _r [g/mol]	Reakční čas [hod]	Výtěžnost reakce [%]
2A	0	NH(CH ₂) ₂ OH	344,78	72	85,85
2B	1	NH(CH ₂) ₂ OH	358,80	72	65,77
2C	2	NH(CH ₂) ₂ OH	372,83	72	76,72
2D	0	NH(CH ₂) ₃ OH	358,81	72	79,71
2E	1	NH(CH ₂) ₃ OH	372,83	72	91,74

2F	2	NH(CH ₂) ₃ OH	386,86	72	87,38
-----------	---	--------------------------------------	--------	----	-------

Prodlužující se alkylový řetězec mezi benzensulfonamidem a amino-skupinou navázanou na triazinové jádro potlačuje elektron-akceptorní vlastnosti sulfonamidové skupiny. To způsobuje zvýšení parciálního elektronegativního náboje triazinového jádra, který je dále zvýšen elektron-donorními vlastnostmi amino-skupiny prvního substituentu. Výsledkem je snížení reaktivity triazinového jádra v nukleofilní substituční reakci.

Tab. 3: Vliv změny reakčního času na výtěžnost reakce

Název	n	R ¹	Reakční čas [hod]	Výtěžnost reakce [%]
2A	0	NH(CH ₂) ₂ OH	72	85,85
			48	80,63
2B	1	NH(CH ₂) ₂ OH	72	65,77
			48	54,29
2C	2	NH(CH ₂) ₂ OH	72	76,72
			48	69,23
2D	0	NH(CH ₂) ₃ OH	72	79,71
			48	46,93
2E	1	NH(CH ₂) ₃ OH	72	91,74
			48	46,67
2F	2	NH(CH ₂) ₃ OH	72	87,38
			48	61,53

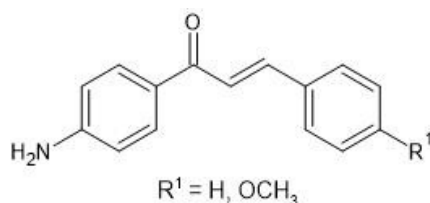
V průběhu přípravy disubstituovaných triazinových derivátů byl studován vliv prodloužení reakčního času na výtěžnost reakce, případně čistotu produktu. Důvodem pro změnu postupu byly nižší výtěžky původních reakcí, způsobené zřejmě nedostatkem času pro vyčerpání poskytnutého množství reaktantů (přestože dle TLC vypadala konverze výchozích látek úplná). Každá další substituce na triazinovém skeletu je stericky náročnější, navíc klesá ochota triazinového jádra vstupovat do substituční reakce. Prodloužení reakčního času však mělo v některých případech za následek poměrně výrazné zvýšení výtěžnosti reakce (až 40 %), zatímco vznik nežádoucích produktů nebyl pozorován (analýza produktů pomocí ¹H a ¹³C-NMR).

6.3 Příprava chalkonových substituentů

Syntéza chalkonů obecně probíhá Claisen-Schmidtovou neboli aldolovou kondenzací za přítomnosti báze (KOH, NaOH) nebo kyseliny (PTSA, AlCl₃, BF₃, bezvodý HCl). (Gupta, Pradhan, Bhatia, & Monga, 2021) Do reakce vstupuje aldehyd navázaný na aromatickém jádře a keton, v tomto případě taktéž navázaný na aromatickém jádře, což obecně zvyšuje reaktivitu obou látek. Obecný průběh reakce je znázorněn ve Schéma 5. V prvním kroku se váže nukleofilní benzaldehyd na elektrofilní karbonylovou skupinu za vzniku aldolu, tj. β-hydroxyaldehydu. Ten dále reaguje v aldolové kondenzaci, kdy dochází k dehydrataci aldolu za odštěpení jedné molekuly vody a vzniku konjugované en-on sloučeniny, tj. β-nenasyceného ketonu. Jeho obecná struktura je znázorněna na Obr. 29. (Ouellette & Rawn, 2015) (Zhuang, Zhang, Sheng, Zhang, Xing, & Miao, 2017)



Schéma 5: Obecný průběh aldolové kondenzace.



Obr. 29: Struktura chalkonů.

6.3.1 Příprava chalkonových substituentů v zásaditém prostředí

Na základě literární rešerše se jako vhodnější jevila syntéza bazickou cestou v prostředí etanolu či metanolu. Jako báze je nejčastěji zvolen NaOH 60 %, méně NaOH 10 % či KOH. Reaktanty reagovaly v ekvimolárním množství, případně s mírným nadbytkem aldehydu. (Tristao, Campos-Buzzi, Correa, Cruz, Filho, & Cruz, 2012) (Ferreira, Kobelnik, Regasini, Dutra, Bolzani, & Ribeiro, 2017) (Ahmed, El-Hafeez, Abbas, Abdelhamid, & Abdel-Aziz, 2018) (Chintakrindi, Gohil, Kothari,

Chowdhary, & Kanyalkar, 2018) (Fathi, El-Hafeez, Abdelhamid, Abbas, Montano, & Abdel-Aziz, 2019) (Chaudhari, Bali, & Balaini, 2020)

Reakční teplota může být různá. Pohybuje se od 0 °C, kdy je směs míchána v ledové lázni, až po 15-25 °C. Reakční čas bývá 2-4 hod, přičemž jeho prodloužení nevede k výraznějšímu nárůstu výtěžnosti reakce. (Ahmed, El-Hafeez, Abbas, Abdelhamid, & Abdel-Aziz, 2018) (Fathi, El-Hafeez, Abdelhamid, Abbas, Montano, & Abdel-Aziz, 2019) (Malbari, a další, 2019) (Chaudhari, Bali, & Balaini, 2020) (Ganji, Gandhi, Musturi, & Kanyalkar, 2021)

Produkt je získán vysrážením chlazenou čištěnou vodou, popř. chlazeným etanolem či metanolem, a následnou filtrací. Nakonec je produkt rekrystalizován z etanolu. (Ahmed, El-Hafeez, Abbas, Abdelhamid, & Abdel-Aziz, 2018) (Fathi, El-Hafeez, Abdelhamid, Abbas, Montano, & Abdel-Aziz, 2019) (Chaudhari, Bali, & Balaini, 2020)

Rozhodli jsme se provést modelovou reakci aminoacetofenonu s 4-methoxybenzaldehydem a ověřit výhodnost bazické vs. kyselá katalýzy (viz následující kapitolu) za různých podmínek. Získané výtěžky (Tab. 4) modelové reakce potvrzují, že bazická katalýza je pro syntézu chalconů vhodnější.

U bazicky katalyzované reakce, přehledně ve Schéma 6, vzniká nejdříve enolátový aniont, který jako karbanion atakuje aldehyd. Vzniklý β -hydroxyl přesmykuje na stabilnější konjugovaný en-on a odštěpuje se hydroxidový aniont.

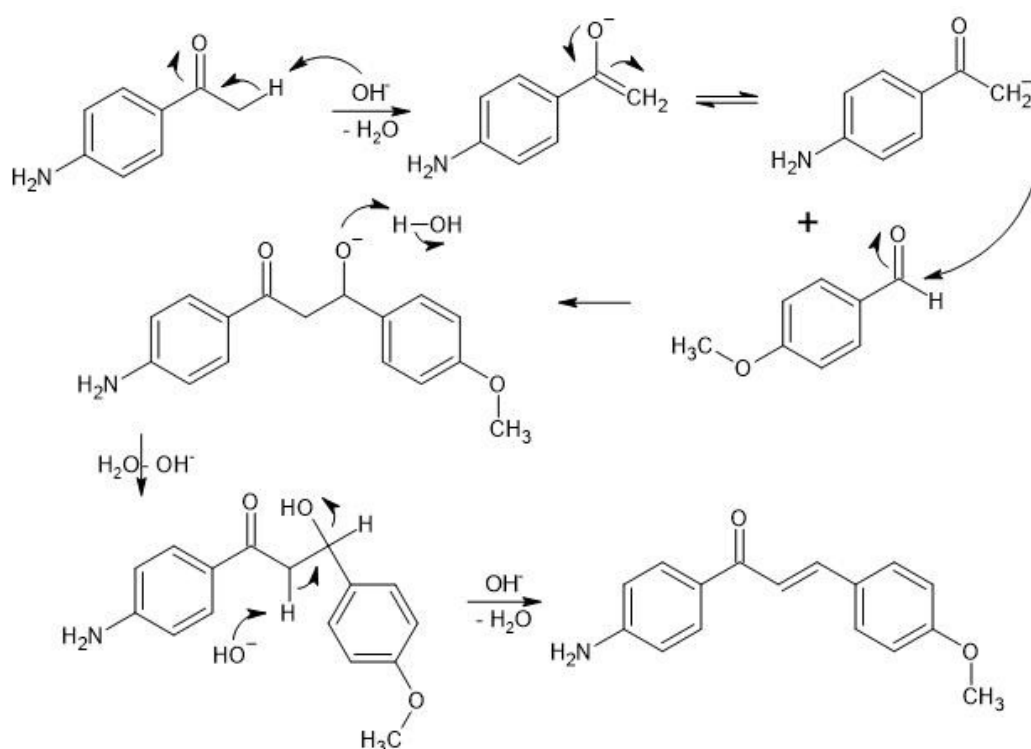


Schéma 6: Bazicky katalyzovaná aldolová kondenzace

Vznikající enolátový aniont je umocňován elektrony z přítomné elektron-donorní amino-skupiny, čímž se pravděpodobně zvyšuje jeho reaktivita. Při kyselé syntéze je oxoniový kationt vznikající z aldehydu stabilizován elektron-donorní methoxy-skupinou. Ta je navíc charakteristická svým pozitivním mezomerním efektem, čímž snižuje reaktivitu kationtu (viz níže). (Santos, a další, 2017) (Zhuang, Zhang, Sheng, Zhang, Xing, & Miao, 2017)

Zároveň toto může být důvodem rozdílu ve výtěžnosti reakcí dvou syntetizovaných chalkonů, kdy syntéza chalkonu s methoxy-skupinou poskytovala opakovaně nižší výtěžky – reaktivitu aldehydu snižovala přítomná methoxy-skupina. Jako elektron-akceptorní skupina snižovala elektronovou hustotu aldehydu, čímž oslabovala jeho nukleofilní charakter. Tím byla nejspíše snížena ochota aldehydu vstupovat do reakce s elektrofilním ketonem.

Ke ztrátě docházelo i při separaci a následné purifikaci produktu, zřejmě kvůli interakci s rozpouštědlem a tvorbě vodíkových můstků. Chalkon se proto vysrážel ve formě vysoce viskózní hmoty namísto pevné krystalické látky, s níž se velmi obtížně pracovalo při filtraci, su-

šení i rozpouštění při rekrystalizaci. Rekrystalizací z ethanolu však byl získán čistý, krystalický produkt.

Tab. 4: Přehled reakčních podmínek

Katalyzátor	Poměr látkového množství	Rozpouštědlo	Výtěžnost reakce [%]
H_2SO_4	ekv.	metanol	47,37
		etanol	25,66
	1,15 ekv.	metanol	63,11
		etanol	23,69
NaOH	ekv.	metanol	57,25
		etanol	49,35
	1,15 ekv.	metanol	71,06
		etanol	49,35

Byl zkoumán i vliv volby rozpouštědla na průběh modelové reakce. Reakce byla provedena v metanolu a etanolu. Vyšších výtěžků bylo dosaženo za použití metanolu, zřejmě díky jeho vyšší polaritě ve srovnání s etanolem.

Rovněž byl zkoumán vliv poměru výchozích látek v reakční směsi, kdy reaktanty reagovaly v poměru 1:1 nebo 1:1,15 s přebytkem benzaldehydu (poměry nejčastěji uváděné v literatuře). Dle výsledků uvedených v Tab. 4 je zjevné, že slabý přebytek benzaldehydu má pozitivní vliv na výtěžnost reakce.

6.3.2 Příprava chalkonových substituentů v kyselém prostředí

Pro ověření vhodných podmínek syntézy chalkonů byla provedena také kyselé katalyzovaná reakce, probíhající dle Schéma 7. Katalýza kyselinou vede nejdříve ke vzniku enolu navázáním vodíkového protonu, současně vytváří aldehyd v kyselém prostředí oxoniový kation. Ten je atakován enolem za vzniku nestabilní sloučeniny, poté probíhá přesmyk na stabilnější en-on sloučeninu.

Nejčastěji jsou z kyselin jako katalyzátor vybírány HCl či H_2SO_4 , méně kyselina octová. Zcela novým přístupem je použití Lewisových kyselin, např. AlCl_3 , RuCl_3 , TiCl_4 a další, s výtěžnostmi pohybující se mezi 50-70 %. (Zhuang, Zhang, Sheng, Zhang, Xing, & Miao, 2017) (Havránková, a další, 2021)

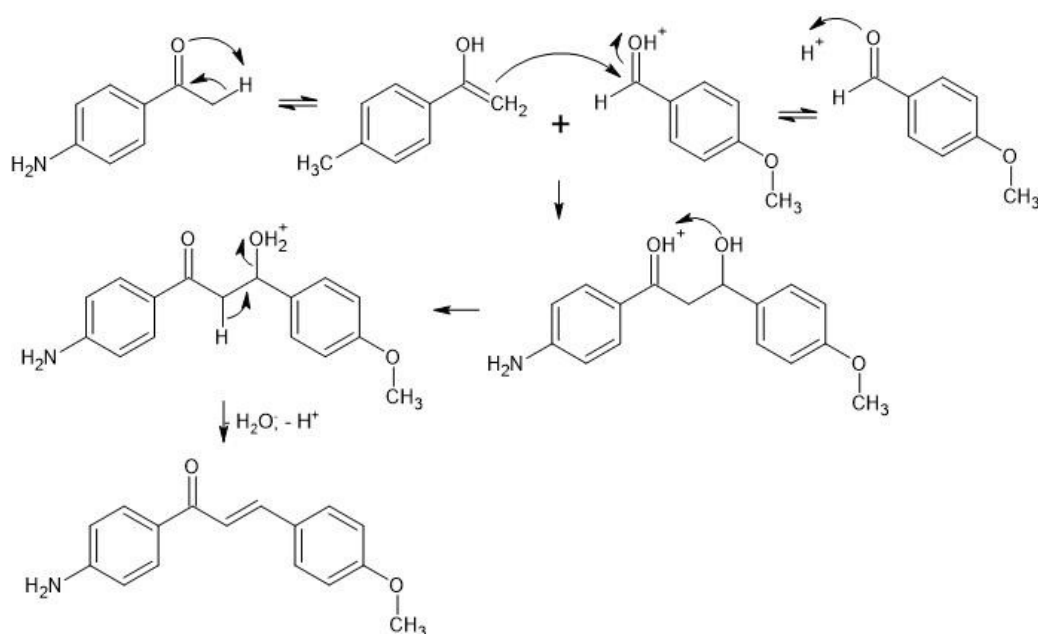


Schéma 7: Kyselé katalyzovaná aldolová kondenzace.

Metodický postup byl zachován stejný jako u bazicky katalyzované modelové reakce aminoacetofenonu s 4-methoxybenzaldehydem, změnilo se pouze pH v reakční směsi, zde okyselením kyselinou sírovou. Ta byla na konci reakce neutralizována 1M NaHCO₃ do neutrálního pH, produkt byl následně z reakční směsi získán stejným způsobem, jako u bazické syntézy.

Ze srovnání bazicky a kyselé katalyzované reakce (viz Tab. 4) plyne, že bazicky katalyzovaná reakce je z hlediska výtěžnosti značně výhodnější (vysvětlení v kapitole 6.3.1).

6.4 Syntéza trisubstituovaného triazinu

Terciární substituce triazinu je významně ovlivněna substituenty již přítomnými na jádře a jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Ty mohou výrazně zvyšovat či naopak snižovat ochotu triazinového derivátu vstupovat do chemických reakcí, v tomto případě nukleofilní substituce posledního atomu chloru. (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Saluja, Tiwari, Vullo, & Supuran, 2014)

Reaktivitu zvyšují elektron-akceptorní skupiny, které jsou součástí substituentů navázaných na triazinovém jádře z předcházejících reakcí. Zvýšením své elektronové hustoty ovlivňují parciální náboj na triazin-

vém jádře a zvyšují jeho nukleofilní charakter. Na druhou stranu elektron-donorní skupiny, typicky amino-skupiny přítomné i zde, reaktivitu triazinového jádra výrazně snižují, a lze si tak vysvětlit prodlužující se reakční čas i klesající výtěžnost každé další substituce. (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Kolesinka & Kaminski, 2009)

Elektron-akceptorní skupina substituentu do jisté míry vyvažuje aktivitu elektron-donorní amino-skupiny navázané přímo na triazinovém jádře, záleží však na délce alkylového spoje mezi nimi a případné přítomnosti dalších elektron-aktivních skupin. Z tohoto důvodu je v poslední době přistupováno k použití výrazněji působících elektron-akceptorních skupin, zejména z řad dusíkatých derivátů a halogen-derivátů. (Kolesinka & Kaminski, 2009) (Sharma, Sheyi, de la Torre, El-Faham, & Albericio, s-Triazine: A Privileged Structure for Drug Discovery and Bioconjugation, 2021) (Al Rasheed, Malebari, Dahlous, Fayne, & El-Faham, 2020)

6.4.1 Výsledky syntézy trisubstituovaného triazinu

Látky 3A-K, jejichž obecná struktura je znázorněna na Obr. 30, byly syntetizovány za podmínek uvedených ve Schéma 8.

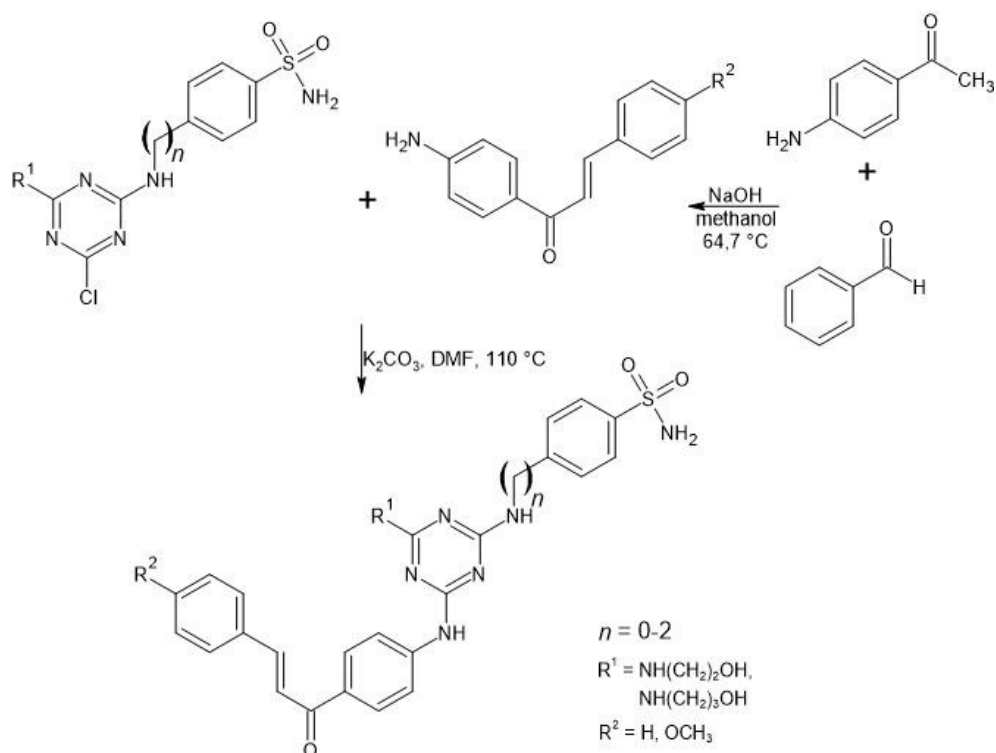
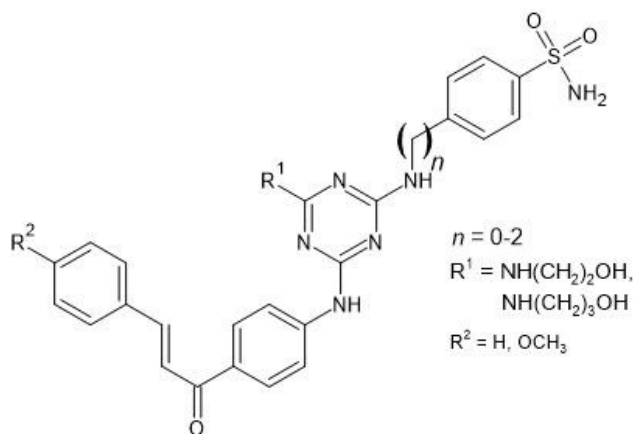


Schéma 8: Obecné schéma syntézy produktů 3A-K.



Obr. 30: Struktura produktů 3A-K.

Nejvyšší výtěžky byly zaznamenány u reakcí s aminobenzensulfonamidovým derivátem a chalkonem bez methoxy-skupiny. Vyšší výtěžky byly pozorovány také u látek obsahujících aminoethanol jako druhý substituent oproti aminopropanolu. Dochází zde ke kombinaci elektron-akceptorního potenciálu sulfonamidové a alkoholové funkční skupiny odrážející se na celkově vyšší reaktivitě triazi-

nu. (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020)

Tab. 5: Přehled trisubstituovaných produktů 3A-K

Název	n	R ¹	R ²	M _r [g/mol]	Reakční čas [hod]	Výtěžnost reakce [%]
3A	0	NH(CH ₂) ₂ OH	H	531,59	76	45,40
3B	1	NH(CH ₂) ₂ OH	H	545,62	76	47,47
3C	2	NH(CH ₂) ₂ OH	H	559,65	76	41,34
3D	0	NH(CH ₂) ₃ OH	H	545,62	76	43,51
3E	1	NH(CH ₂) ₃ OH	H	559,65	76	36,00
3F	2	NH(CH ₂) ₃ OH	H	573,67	76	37,83
3G	0	NH(CH ₂) ₂ OH	OCH ₃	561,62	64	22,10
3H	1	NH(CH ₂) ₂ OH	OCH ₃	575,64	64	6,25
3Ch	2	NH(CH ₂) ₂ OH	OCH ₃	589,67	64	20,23
3I	0	NH(CH ₂) ₃ OH	OCH ₃	575,64	36	17,50
3J	1	NH(CH ₂) ₃ OH	OCH ₃	589,67	36	5,06
3K	2	NH(CH ₂) ₃ OH	OCH ₃	603,70	36	11,56

6.5 Měření antioxidační aktivity pomocí ABTS

Antioxidační aktivita produktů 3A-K byla stanovena metodou využívající kation radikál ABTS⁺, která se obecně řadí mezi jednu z nejpoužívanějších metod. Ve výzkumu byla metoda ABTS již využita pro stanovení antioxidační aktivity podobných sloučenin, jako jsou ty studované v této práci, založených na s-triazinovém skeletu, obsahujících rovněž chalkonové a benzensulfonamidové motivy, popř. jiné.. (Miguel-Chávez, 2017) (Gonzalez, Pota, Su Turan, da Costa, Akkaraju, & Green, 2017) (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Gharat, Prabhu, & Khambete, 2022) Podrobná metodika je uvedena v kapitole 7.6. Každé měření bylo provedeno třikrát a získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Výsledky, tedy % antioxidační aktivity, testovaných látek jsou uvedeny v Tab. 6.

U všech produktů dosahovala stanovená antioxidační aktivita srovnatelných hodnot. To je zřejmě způsobeno výraznou strukturální podobností testovaných látek. O něco vyšší aktivitu vykazují deriváty s methoxy-skupinou navázanou na chalkonovém motivu. Zřejmě je to způsobeno vyšší reaktivitou kyslíkaté funkční skupiny (oproti samo-

statnému benzenovému jádru), a tedy větší ochotou vstupovat do interakce s radikálem. Při zhášení navíc u těchto sloučenin dochází ke stabilizaci konjugovaným systémem. (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Lolak, Boga, Tuneg, Karakoc, Akocak, & Supuran, 2020)

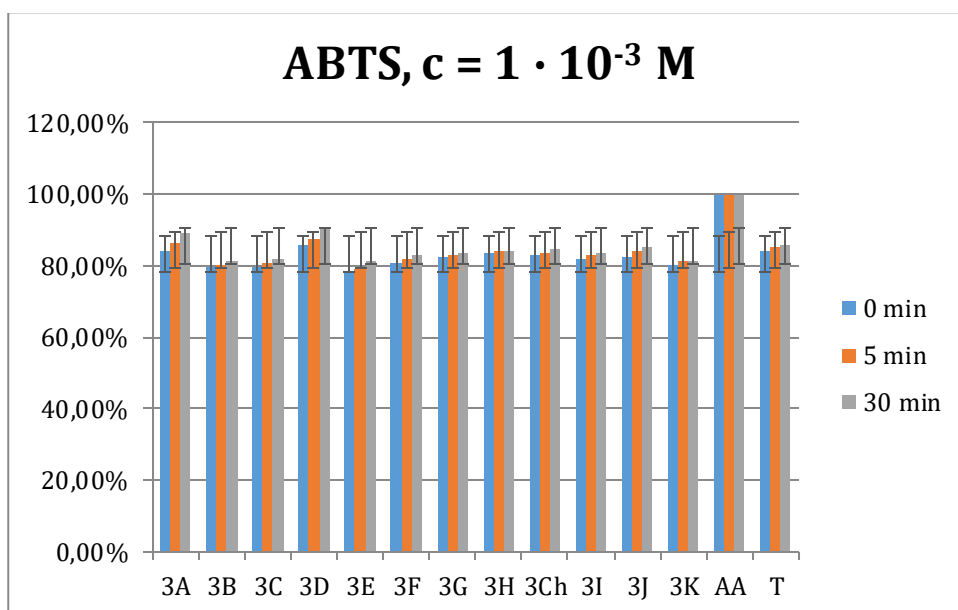
Nepatrně vyšší aktivita byla také pozorována u derivátů s kratším hydroxyalkylaminovým substituentem a s kratším alkylovým linkerem mezi benzensulfonamidovou funkční skupinou a *s*-triazinovým skeletem, resp. zcela bez alkylového linkeru. Delší alkylový linker může v tomto případě snižovat stabilizační schopnosti dané struktury vstupující do interakce s radikálem, což může snižovat celkový antioxidační potenciál.

Tab. 6: Antioxidační aktivita produktů 3A-K.

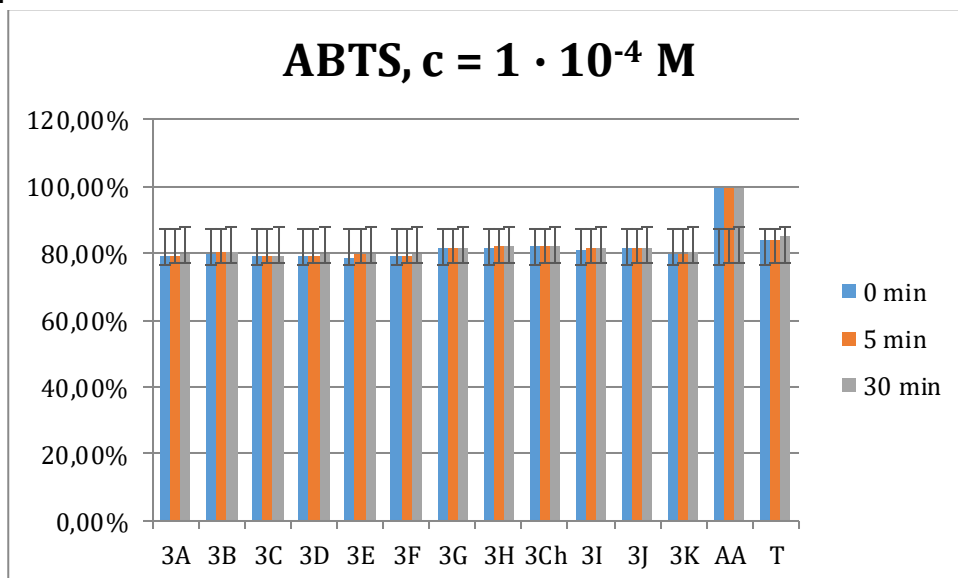
Látka	$1 \cdot 10^{-3}$ [%]			$1 \cdot 10^{-4}$ [%]		
	0 min	5 min	30 min	0 min	5 min	30 min
3A	84,0±0,52	86,3±0,05	88,8±0,01	79,2±0,03	79,3±0,09	79,7±0,06
3B	79,4±0,23	80,2±0,10	81,6±0,01	80,0±0,02	80,1±0,01	80,4±0,05
3C	79,7±0,23	80,6±0,04	81,9±0,05	78,9±0,05	79,3±0,54	79,4±0,07
3D	85,6±0,37	87,4±0,04	90,1±0,00	79,2±0,02	79,4±0,01	79,8±0,06
3E	78,3±0,12	79,2±0,05	81,2±0,02	78,8±0,04	79,5±0,04	79,8±0,05
3F	80,7±0,25	81,6±0,02	82,9±0,02	79,1±0,10	79,1±0,08	79,6±0,07
3G	82,6±0,02	83,1±0,01	83,6±0,01	81,4±0,04	81,5±0,03	81,6±0,02
3H	83,6±0,38	83,8±0,09	84,2±0,02	81,9±0,10	82,0±0,09	82,0±0,10
3CH	83,1±0,05	83,8±0,01	84,8±0,00	82,3±0,07	82,1±0,06	82,3±0,04
3I	82,1±0,10	82,8±0,02	83,4±0,01	81,2±0,06	81,3±0,02	81,4±0,01
3J	82,3±0,20	84,0±0,03	84,9±0,03	81,4±0,29	81,4±0,27	81,5±0,22
3K	80,2±0,13	81,0±0,02	81,5±0,02	80,0±0,01	80,1±0,26	80,3±0,03
AA	99,7±0,03	99,8±0,01	99,8±0,05	99,6±0,14	99,0±0,33	99,8±0,07
T	84,2±0,01	84,9±0,04	85,5±0,14	83,9±0,01	84,2±0,05	85,0±0,01

AA = kyselina askorbová; T = trolox

U vzorků o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3}$ byla stanovena vyšší antioxidační aktivita než v případě koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$, což odpovídá předpokladům. V průběhu měření došlo k mírnému nárůstu aktivity v prvních pěti minutách, a to až o 2 %. Během další půl hodiny nebyl pozorován výraznější nárůst, nebyla proto již stanovována antioxidační aktivita po 1 hod.



Stanovované roztoky o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4}$ vykazovaly ještě nižší změnu antioxidační aktivity v průběhu času, mezi 0. a 30. min došlo k nárůstu max. o 0,5 %. Proto rovněž nebyla měřena aktivita po 1 hod.



Ve srovnání s použitými standardy troloxem (83,9 % v čase 0 min, $c = 10^{-4}$ M) a kyselinou askorbovou (99,6 % v čase 0 min, $c = 10^{-4}$ M) jsou testované látky slabšími antioxidačními činidly (78,8-82,3 % v čase 0 min, $c = 10^{-4}$ M), přesto je však jejich antioxidační potenciál zjevný. Ze získaných výsledků zároveň můžeme vyvodit, že antioxidační efekt sta-

novených látek je téměř okamžitý (aktivita v čase 0 min). Testované látky jsou tak předlohami vhodnými pro další strukturní modifikace za účelem zvýšení antioxidační aktivity a budou předmětem dalšího výzkumu.

6.6 Měření antibiotické aktivity

Stanovení antimikrobiotické aktivity syntetizovaných produktů 3A-K vč. chalkonových meziproduktů bylo provedeno na Ústavu molekulární biologie Farmaceutické fakulty Masarykovi univerzity v Brně, týmem Ing. Marcely Nejezchelbové (Barbora Hájková, Daniela Čípová).

Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena proti mikrobům *Enterococcus faecium* (ECFM) a *Enterococcus faecalis* (ECFS) citlivých i rezistentních vůči vankomycinu, viz Tab. 7 a Tab. 8. Rezistentní kmeny byly označeny zkratkou „VRE“. Všechny mikrobiální kmeny byly získány z Mikrobiologického ústavu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Jako standard byl zvolen vankomycin.

Tab. 7: Antimikrobiotická aktivita produktů 3A-K a chalkonových meziproduktů proti ECFM.

Látka	ECFM n-4 W	ECFM VIII 20	ECFM VIII 69	ECFM VIII 77	ECFM VIII 92 VRE
3A	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3B	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3C	>128 µg/ml	>128 µg/ml	>128 µg/ml	>128 µg/ml	64 µg/ml
3D	>128 µg/ml	>128 µg/ml	>128 µg/ml	>128 µg/ml	128 µg/ml
3E	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3F	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3G	NT	NT	NT	NT	NT
3H	NT	NT	NT	NT	NT
3CH	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3I	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
3J	NT	NT	NT	NT	NT
3K	NT	NT	NT	NT	NT
Ch1	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
Ch2	NT	NT	NT	NT	>128 µg/ml
V	>128 µg/ml	1 µg/ml	8 µg/ml	1 µg/ml	>1024 µg/ml

ECFM = *Enterococcus faecium*; V = vankomycin; NT = netestováno

Slabá antimikrobiotická aktivita proti VRE kmenu *Enterococcus faecium* byla pozorována u produktů 3C a 3D. Inhibiční koncentrace těchto derivátů byla ve srovnání se standardem vankomycinem řádově nižší. Žádná aktivita nebyla nalezena u chalkonových meziproduktů Ch1 a Ch2. Lze se tedy domnívat, že pro biologický účinek je zásadní kombinace chalkonového motivu s dalšími substituenty přítomnými na triazinovém jádře.

Tab. 8: Antimikrobiotická aktivita produktů 3A-K a chalkonových meziproduktů proti ECFS.

Látka	ECFS VIII 31	ECFS VIII 32	ECFS VIII 63	ECFS VIII 64	ECFS 201 VRE	ECFS 202 VRE	ECFS 203 VRE
3A	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3B	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3C	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml
3D	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml	>128 μg/ml
3E	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3F	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3G	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3H	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3CH	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3I	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3J	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
3K	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
Ch1	NT	>128 μg/ml	NT	NT	NT	NT	NT
Ch2	NT	>128	NT	NT	NT	NT	NT

VÝSLEDKY A DISKUZE

		µg/ml					
V	2 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	128 µg/ml	32 µg/ml	256 µg/ml	1024 µg/ml

ECFS = *Enterococcus faecalis*; V = vankomycin; NT = netestováno

U žádného produktu ani chalkonového meziprojektu nebyla pozorována antimikrobiotická aktivita proti kmenům *Enterococcus faecalis*. Vzhledem k omezené nabídce syntetizovaných derivátů nelze z výsledků měření odvodit žádný vztah struktury a účinku. Nález určité antimikrobiotické aktivity proti jednomu kmeni VRE je však slibný, bylo by proto vhodné pokračovat ve výzkumu tímto směrem a syntetizovat další nové deriváty. To by umožnilo ověřit vliv jednotlivých strukturálních motivů na antimikrobiotickou aktivitu.

7 Experimentální část

7.1 Obecné informace

Všechny použité chemikálie, komerčně dostupné, byly použity bez další purifikace: kyselina chlorovodíková (HCl) 35 %, p.a. – Lach-Ner; hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃), p.a. – Lach-Ner; hydroxid sodný (NaOH) – Lach-Ner; kyselina para-toluensulfonová (PTSA) – Sigma Aldrich; kyselina sírová (H₂SO₄) – Lach-Ner; bezvodý uhličitan draselný (K₂CO₃) – Lach-Ner; ethanol 96 % – Lihovar Kojetín; methanol, p.a. – Lach-Ner; hexan, p.a. – Lach-Ner; aceton – Sigma Aldrich; N,N-dimethylformamid (DMF) – Sigma Aldrich; dichlormethan (DCM) – Sigma Aldrich; ethylacetát; 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin – Sigma Aldrich; 4-aminobenzensulfonamid – Sigma Aldrich; 4-aminomethylbenzensulfonamid hydrochlorid – Sigma Aldrich; 4-aminoethylbenzensulfonamid – Sigma Aldrich; 4-aminoacetofenon – Sigma Aldrich; benzaldehyd – Sigma Aldrich; 4-methoxybenzaldehyd – Sigma Aldrich; aminoethanol – Sigma Aldrich; aminopropanol – Sigma Aldrich; roztok ninhydrinu (detekční roztok připravený smícháním ninhydrinu, n-butanolu, kyseliny octové a čištěné vody); čistý jód I₂ – Sigma Aldrich; bezvodý DMSO-d₆, 99,9 atom % D – Sigma Aldrich.

Ke sledování průběhu jednotlivých reakcí byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC). Vzorky byly nanášeny na hliníkové fólie Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo) a detekovány pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm (UV-lampa Camag, Švýcarsko). Ke zviditelnění primárních amino-skupin byl použit roztok ninhydrinu, který tvořilo 0,2 g ninhydrinu, 100 ml n-butanolu, 0,5 ml CH₃COOH a 4,5 ml čištěné vody; detekce probíhala za zvýšené teploty 180 °C. Dále byly použity páry pevného jódu I₂. Vyvíjecí soustava se lišila v jednotlivých fázích substituce *s*-triazinu – pro monosubstituované deriváty jí byl metanol, pro disubstituované a trisubstituované deriváty směs hexanu a ethylacetátu v poměru 1:3. Pro detekci chalkonů byl vybrán jako mobilní fáze DCM.

U konečných produktů byla stanovena teplota tání pomocí bloku Kofler hot-plate apparatus HMK (Franz Küstner Nach KG, Drážďany, Německo), přičemž naměřené hodnoty nebyly dále korigovány. Produkty byly dále analyzovány nukleární magnetickou rezonancí (NMR), a to na přístroji JNM-ECZ400R FT-NMR spectrometr 9.39 T (399,78 MHz

pro ^1H a 100,53 MHz pro ^{13}C ; Jeol Resonance, Tokyo, Japonsko) vybaveným 5 mm High Sensitivity PulseField Gradient Autotune™ sondou. Chemické posuny (δ) ppm byly referovány k poloze vnitřního standardu tetramethylsilanu. Chemické posuny použitého deuterovaného rozpouštědla DMSO- d_6 jsou 2,5 ppm pro ^1H a 39,5 ppm pro ^{13}C . Měření probíhalo za teploty 30 °C a získaná spektra byla analyzována pomocí specializovaného softwaru Delta 5.2.1 (Jeol Resonance, Tokyo, Japonsko).

Infračervená spektroskopie (IR) byla u produktů provedena za použití přístroje Nicolet Impact 410 FT-IR pomocí iD7 ATR optického modulu s monolytickým diamantovým ATR krystalem. Spektra byla měřena v rozsahu 4 000-400 cm^{-1} a analyzována v programu Omnic software v.8.3 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Antioxidační aktivita byla stanovena měřením UV-VIS spektroskopie na spektrofotometru Agilent/HP 8453 Spectrophotometer UV-Visible G1103A, který disponuje diodovým polem (tzv. PDA - Photodiode Array), díky čemuž lze snímat absorpenci viditelného a ultrafialového světelného spektra současně. Absorpce byla měřena při vlnových délkách 480, 650, 734, 740 a 754 nm, přičemž absorpční maximum bylo snímáno při vlnové délce 754 nm. Světlo bylo absorbováno radikálem ABTS⁺, který byl zhasen produkty 3A-K oproti standardům kyselině askorbové a troloxu (Sigma Aldrich). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Instrument 1 Online.

7.2 Metodický postup syntézy monosubstituovaného s-triazinu

Substitucí atomu chloru na 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazinu v bazickém prostředí hydroxidu sodného byly připraveny sloučeniny 1A-C. V trojhrdlé baňce s kulatým dnem bylo ochlazeno 25 ml acetonu na ledové lázni na teplotu < 5 °C. Po snížení teploty rozpouštědla pod 5 °C bylo po částech přisypáno 0,925 g (5 mmol) 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazinu. V kádince vedle bylo rozpuštěno 5 mmol aminobenzensulfonamidového derivátu v 25 ml acetonu (aminobenzensulfonamid 0,86 g; 4-aminomethylbenzensulfonamid 0,931 g; 4-aminoethylbenzensulfonamid 1,0 g). Směs byla kvantitativně přenesena do přikapávací nálevky s vyrovnáváním tlaku, a po ustálení teploty reakční směsi kolem 0 °C byl roztok postupně přikapán do směsi. (Garaj

V., a další, 2004) (Carta, a další, 2011) (Saluja, Tiwari, Vullo, & Supuran, 2014) (Cascioferro S., a další, 2017)

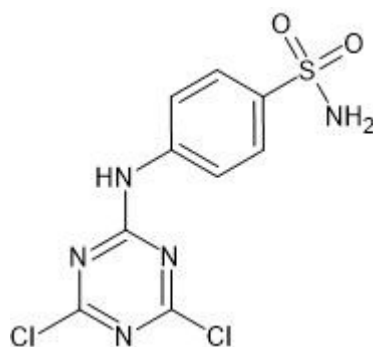
Mezitím byl připraven roztok hydroxidu sodného rozpuštěním 0,20 g (5 mmol) hydroxidu sodného v 3 g čisté vody. Roztok báze byl přikapán do reakční směsi, která byla následně ještě hodinu míchána za teploty 0 °C, přičemž průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. (Carta, a další, 2011) (Havránková, Csöllei, Vullo, Garaj, Pazdera, & Supuran, 2018)

Po dokončení reakce byla reakční směs vysrážena na 150 g drce-ného ledu a zfiltrována na skleněné fritě za opakovaného promytí desti-lovanou vodou. Produkt byl 24 hod sušen na Petriho misce v horkovzdušné sušárně při teplotě 70-80 °C, poté byl rekrystalizován z acetonu následujícím způsobem: Produkt byl rozpuštěn ve 400 ml acetonu za použití ultrazvuku, vysrážen na 400 g drceného ledu, zfiltr-o-ván na skleněné fritě a sušen na Petriho misce v exsikátoru do kon-stantní hmotnosti.

7.2.1 Charakteristika syntetizovaných produktů 1A-C

Všechny popsané vlastnosti syntetizovaných produktů byly ve shodě s dříve publikovanými výsledky a s citacemi uvedenými v této práci.

4-[(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzen-1-sulfonamid (**1A**)

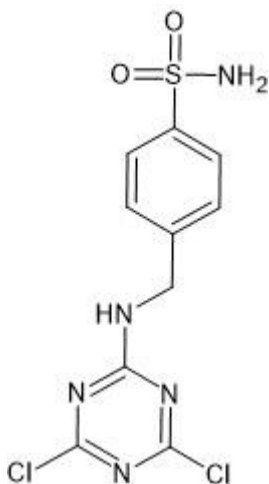


$C_9H_7Cl_2N_5O_2S$, $M_r = 320,15$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 192-194 °C, 17,89 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 10,80 (3H, br s, NH, NH₂), 7,71 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 7,62 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 169,4 (C_{triaz}-Cl), 154,7 (C_{triaz}-NH), 140,6 (C_{arom}-NH), 139,7 (C_{arom}-Sulf), 127,5 (CH_{arom}), 120,8 (CH_{arom}); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3294, 3210 (NH), 1621 (C=C_{arom}), 1494, 1388, 1157 (SO₂NH₂)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

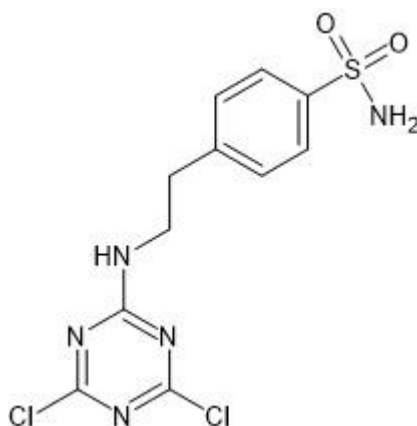
4-[[[4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]methyl]benzen-1-sulfonamid (**1B**)



$C_{10}H_9Cl_2N_5O_2S$, $M_r = 334,18$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 208-210 °C, 44,86 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 10,2 (3H, br s, NH, NH₂), 7,76 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 7,64 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 4,41 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, CH₂); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 169,5 (C_{triaz-Cl}), 166,0 (C_{triaz-NH}), 143,3 (C_{arom-CH₂}), 141,9 (C_{arom-Sulf}), 128,1 (CH_{arom}), 126,3 (CH_{arom}), 44,1 (CH₂); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3347, 3249 (NH), 1631 (C=C_{arom}), 1403, 1324, 1153 (SO₂NH₂)

4-{2-[[[4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]ethyl]benzen-1-sulfonamid (**1C**)



$C_{11}H_{11}Cl_2N_5O_2S$, $M_r = 348,21$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 299-301 °C, 83,33 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 10,49 (3H, br s, NH, NH₂), 7,80 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 7,74 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 3,48 (2H, t, $J = 7,8$ Hz, NHCH₂CH₂), 3,01 (2H, t, $J = 7,8$ Hz, NHCH₂CH₂); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 169,8 (C_{triaz}-Cl), 166,4 (C_{triaz}-NH), 143,4 (C_{arom}-CH₂CH₂), 142,8 (C_{arom}-S_{sulf}), 130,1 (CH_{arom}), 126,2 (CH_{arom}), 42,3 (NHCH₂CH₂), 33,8 (NHCH₂CH₂); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3316, 3026 (NH), 1603 (C=C_{arom}), 1239, 1146 (SO₂NH₂)

7.3 Metodický postup syntézy disubstituovaného s-triazinu

Substitucí druhého atomu chloru monosubstituovaných produktů byly připraveny látky 2A-F. Reakce probíhala v ekvimolárním množství reaktantů za laboratorní teploty. V širokohrdlé baňce s plochým dnem bylo rozpuštěno 5 mmol monosubstituovaného s-triazinu (1A 1,601 g; 1B 1,671 g; 1C 1,741 g) v 50 ml dimethylformamidu (DMF).

Po úplném rozpuštění bylo k reakční směsi po částech přidáno 0,691 g (5 mmol) uhličitanu draselného s několikaminutovým rozestupem mezi jednotlivými dávkami. Po přidání poslední části byla směs míchána 10 min za laboratorní teploty a následně bylo přikapáno 5 mmol aminoalkoholu (aminoethanol 302,0 μ l; aminopropanol 386,0 μ l). Poté byla reakční směs míchána 72 hod za laboratorní teploty. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. (Carta, a další, 2011) (Havránková, Csöllei, Vullo, Garaj, Pazdera, & Supuran, 2018)

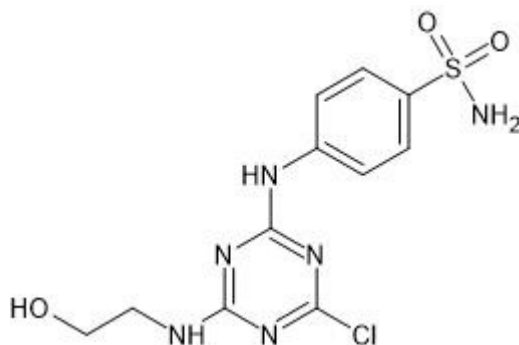
Po dokončení reakce byla reakční směs nejprve zfiltrována na skleněné fritě pro odstranění báze, teprve poté byla vysrážena na 150 g drceného ledu a ponechána za laboratorní teploty do úplného rozpuštění ledu. Filtrací na skleněné fritě byl získán první podíl produktu, který byl sušen na Petriho misce v exsikátoru. Matečný louh byl odpařen na rotační vakuové odparce (RVO) téměř do sucha.

Zahuštěná směs byla vysrážena isopropylalkoholem a týden chlazená při 2-8 °C pro maximální vysrážení druhého podílu produktu, jenž byl získán filtrací na skleněné fritě a následně sušen na Petriho misce v exsikátoru. Nový matečný louh byl znovu odpařen na RVO na 1/3 původního objemu, poté byl vysrážen na 100 g drceného ledu a 24 hod chlazen za teploty 2-8 °C. Třetí podíl produktu byl opět zfiltrován na skleněné fritě a sušen na Petriho misce v exsikátoru.

7.3.1 Charakteristika syntetizovaných produktů 2A-F

Všechny popsané vlastnosti syntetizovaných produktů byly ve shodě s dříve publikovanými výsledky a s citacemi uvedenými v této práci.

4-({4-chloro-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzensulfonamid (**2A**)

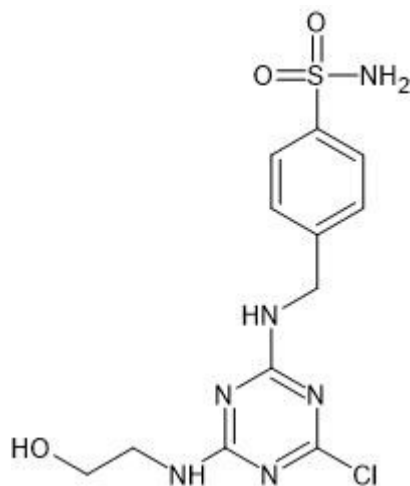


$C_{11}H_{13}ClN_6O_3S$, $M_r = 344,78$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 231-233 °C, 85,85 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,99 (5H, br s, NH, OH, NH₂), 7,74 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 7,39 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 4,47 (1H, br s, OH), 3,49-3,38 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,29-3,23 (2H, m, CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 169,2 (C_{triaz-Cl}), 168,4 (C_{triaz-Nalk}), 167,0 (C_{triaz-Nsulf}), 144,6 (C_{arom-NH}), 142,1 (C_{arom-Sulf}), 128,2 (CH_{arom}), 127,1 (CH_{arom}), 60,1 (CH₂CH₂OH), 44,2 (CH₂CH₂OH); IR: ν_{max}

(cm^{-1}) 3352 (NH, OH), 2938 (CH_2 -alif), 1629 ($C=C_{arom}$), 1392, 1158 (SO_2NH_2)

4-[[{4-chloro-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)methyl]benzensulfonamid (**2B**)

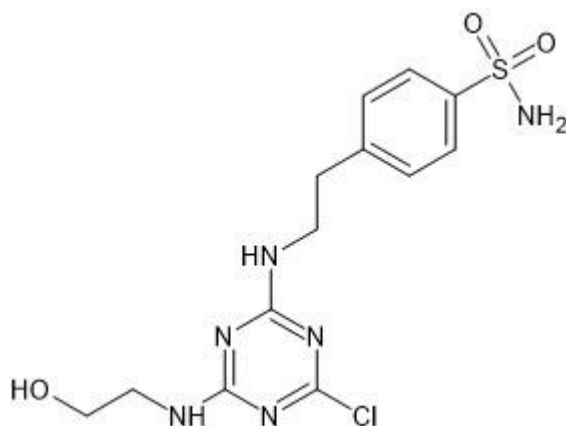


$C_{12}H_{15}ClN_6O_3S$, $M_r = 358,80$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 225-227 °C, 65,77 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 7,74 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,42 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 4,61 (5H, s, NH, OH, NH_2), 4,47 (2H, s, CH_2), 3,61-3,58 (2H, m, CH_2CH_2OH), 3,28-3,26 (2H, m, CH_2CH_2OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 168,5 ($C_{triaz-Cl}$), 165,5 ($C_{triaz-N_{sulf}}$), 162,5 ($C_{triaz-N_{alk}}$), 143,9 ($C_{arom-CH_2}$), 143,3 ($C_{arom-S_{sulf}}$), 128,1 (CH_{arom}), 126,2 (CH_{arom}), 59,7 (CH_2CH_2OH), 43,4 (CH_2), 36,9 (CH_2CH_2OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3397 (NH, OH), 3247, 2946 (CH_2 -alif), 1633 ($C=C_{arom}$), 1483, 1398, 1156 (SO_2NH_2)

4-[2-{{4-chloro-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzensulfonamid (**2C**)

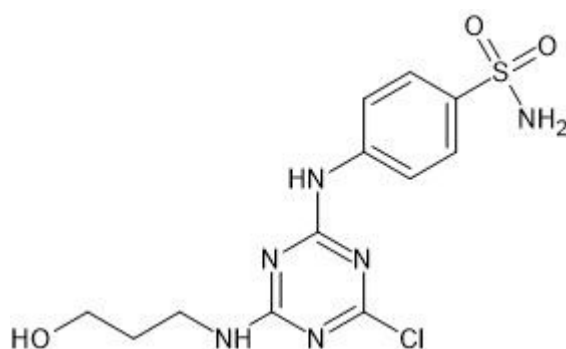
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{13}H_{17}ClN_6O_3S$, $M_r = 372,83$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 126-128 °C, 69,23 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,34 (5H, br s, NH, OH, NH₂), 7,74 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,41 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 3,48-3,36 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,21-3,18 (2H, m, NHCH₂CH₂), 3,09-3,07 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,03-3,00 (2H, m, NHCH₂CH₂); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 168,5 (C_{triaz}-Cl), 166,0 (C_{triaz}-N_{alk}), 163,0 (C_{triaz}-N_{sulf}), 143,8 (C_{arom}-CH₂CH₂), 143,1 (C_{arom}-S_{sulf}), 127,9 (CH_{arom}), 126,2 (CH_{arom}), 59,2 (CH₂CH₂OH), 44,2 (NHCH₂CH₂), 43,4 (CH₂CH₂OH), 36,1 (NHCH₂CH₂); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3258, 3085 (NH, OH), 2937 (CH₂-alif), 1513 (C=C_{arom}), 1471, 1327, 1156 (SO₂NH₂)

4-({4-chloro-6-[(3-hydroxypropyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzenesulfonamid (**2D**)

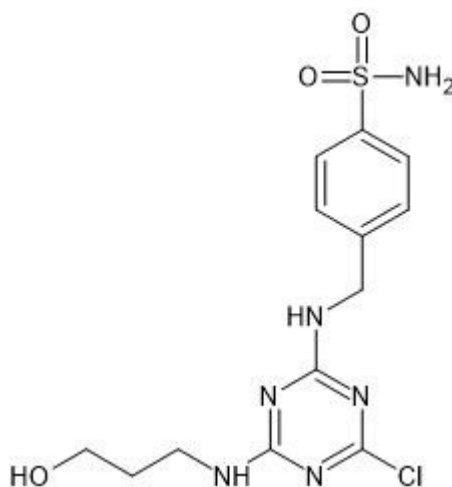


$C_{12}H_{15}ClN_6O_3S$, $M_r = 358,80$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 220-222 °C, 79,71 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 10,3 (5H, br s, NH, OH, NH₂), 7,69 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,18 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 4,48-4,46 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 3,45-3,41 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,65-1,60

(2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ¹³C-NMR δ_c (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆): 168,5 (C_{triaz}-Cl), 165,8 (C_{triaz}-N_{alk}), 164,9 (C_{triaz}-N_{sulf}), 142,5 (C_{arom}-N_{sulf}), 138,4 (C_{arom}-S_{sulf}), 127,0 (CH_{arom}), 119,5 (CH_{arom}), 58,9 (CH₂CH₂CH₂OH), 41,1 (CH₂CH₂CH₂OH), 32,8 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3308, 3251, 3111 (NH, OH), 2940 (CH₂-alif), 1517 (C=C_{arom}), 1386, 1324, 1150 (SO₂NH₂)

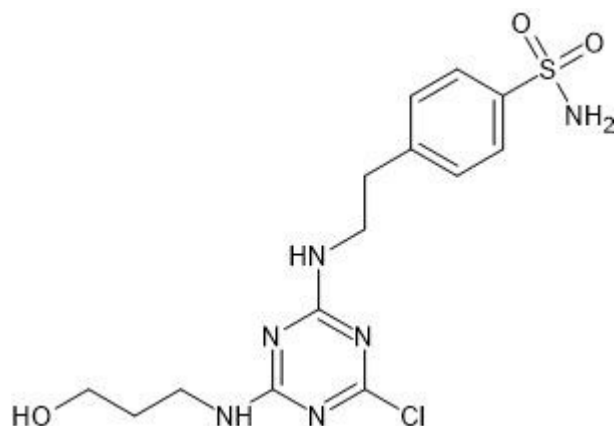
4-[[{4-chloro-6-[(3-hydroxypropyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)methyl]benzensulfonamid (**2E**)



C₁₃H₁₇ClN₆O₃S, M_r = 372,83 g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 213-215 °C, 91,74 % výtěžek

¹H-NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO-d₆): 8,38 (5H, br s, NH, OH, NH₂), 7,43 (2H, d, J = 8,1 Hz, CH_{arom}), 7,24 (2H, d, J = 8,1 Hz, CH_{arom}), 4,45 (2H, s, CH₂), 3,24-3,21 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,84-2,79 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,61-1,58 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ¹³C-NMR δ_c (ppm, 100 MHz, DMSO-d₆): 168,2 (C_{triaz}-Cl), 166,0 (C_{triaz}-N_{alk}), 162,9 (C_{triaz}-N_{sulf}), 143,8 (C_{arom}-CH₂), 143,1 (C_{arom}-S_{sulf}), 127,9 (CH_{arom}), 126,2 (CH_{arom}), 59,5 (CH₂CH₂CH₂OH), 43,7 (CH₂), 38,1 (CH₂CH₂CH₂OH), 32,0 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3242, 3088 (NH, OH), 2946 (CH₂-alif), 1538 (C=C_{arom}), 1398, 1322, 1157 (SO₂NH₂)

4-[2-{{4-chloro-6-[(3-hydroxypropyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzensulfonamid (**2F**)



$C_{14}H_{19}ClN_6O_3S$, $M_r = 386,86$ g/mol, bílá krystalická látka, t. t.: 226-228 °C, 87,38 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,53 (5H, br s, NH, OH, NH₂), 7,70 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 7,39 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, CH_{arom}), 4,39-4,37 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 3,55-3,53 (2H, m, NHCH₂CH₂), 2,84-2,82 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,45-2,41 (2H, m, NHCH₂CH₂), 1,19-1,13 (CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 166,3 (C_{triaz-Cl}), 165,1 (C_{triaz-Nalk}), 164,7 (C_{triaz-Nsulf}), 146,4 (C_{arom-CH₂CH₂}), 142,2 (C_{arom-Ssulf}), 127,6 (CH_{arom}), 125,9 (CH_{arom}), 59,6 (CH₂CH₂CH₂OH), 43,6 (NHCH₂CH₂), 38,9 (CH₂CH₂CH₂OH), 33,4 (NHCH₂CH₂), 32,8 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3250, 3097 (NH, OH), 2937 (CH₂-alif), 1547 (C=C_{arom}), 1407, 1303, 1154 (SO₂NH₂)

7.4 Metodický postup syntézy chalkonových substituentů

Kondenzační reakcí aldehydu a ketonu byly připraveny dva chalkonové meziproducty, které byly dále použity v substituci třetího atomu chloru 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazinu. Výchozí látky reagovaly v non-ekvimolárním množství za bazické katalýzy. (Santos, a další, 2017)

V širokohrdlé baňce s kulatým dnem bylo rozpuštěno 0,6762 g 4-aminoacetofenonu (5 mmol) v 25 ml metanolu, a poté bylo přidáno 5,75 mmol (1,15 ekv. látkového množství 4-aminoacetofenonu) příslušného aldehydu (benzaldehyd 0,6104 g, 4-methoxybenzaldehyd 0,7824 g). V dalším kroku byl k reakční směsi ochlazené na 0-5 °C přidán 1 ml 20 % NaOH (5 mmol). Následně byla reakční směs míchána za stálého chlazení po dobu 5 hod a dalších 5 hod byla směs míchána za laboratorní teploty. (Tristao, Campos-Buzzi, Correa, Cruz, Filho, & Cruz, 2012)

(Chintakrindi, Gohil, Kothari, Chowdhary, & Kanyalkar, 2018) (Abbas, El-Hafeez, Shoman, Montano, & Hassan, 2018)

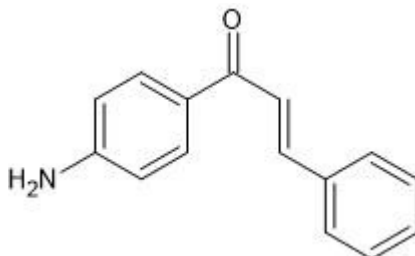
Reakční směs byla neutralizována 1M HCl do neutrálního pH na lakmusovém papírku. Produkt byl z reakční směsi získán vysrážením na 150 g drceného ledu s následnou filtrací na filtračním papíře přes Büchnerovu nálevku. (Tristao, Campos-Buzzi, Correa, Cruz, Filho, & Cruz, 2012) (Abbas, El-Hafeez, Shoman, Montano, & Hassan, 2018)

Čištění produktů bylo provedeno rekrystalizací, kdy byl produkt rozpuštěn v 50 ml etanolu za použití ultrazvuku, vysrážen na 180 g drceného ledu a zfiltrován na filtračním papíře přes Büchnerovu nálevku. Produkt byl sušen na Petriho misce za laboratorní teploty.

7.4.1 Charakteristika syntetizovaných chalkonových substituentů

Všechny popsané vlastnosti syntetizovaných produktů byly ve shodě s dříve publikovanými výsledky a s citacemi uvedenými v této práci.

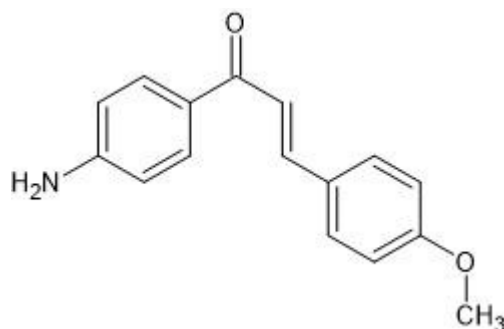
1-(4-aminofenyl)-3-fenyl-2-propen-1-on (**Ch1**)



$C_{15}H_{13}NO$, $M_r = 223,27$ g/mol, světle žlutá pevná látka, t. t.: 155-157 °C, 87,21 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,31 (2H, br s, NH_2), 7,92 (2H, d, $J = 7,1$ Hz, CH_{arom}), 7,77 (2H, d, $J = 7,1$ Hz, CH_{arom}), 7,59-7,38 (5H, m, CH_{arom}), 7,61 (1H, d, $J = 15,1$ Hz, $CHCHCO$), 7,47 (1H, d, $J = 15,1$ Hz, $CHCHCO$); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,6 (CO), 152,4 (C- NH_2), 141,3 ($CHCHCO$), 138,7 (CH_{arom}), 135,6 (CH_{arom}), 132,3 (CH_{arom}), 131,3 ($C_{arom}-CH$), 130,4 ($C_{arom}-CO$), 121,8 (CH_{arom}), 120,0 (CH_{arom}), 114,7 ($CHCHCO$); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3358 (NH_2), 1581 (CO), 1560 (C=C $_{arom}$)

1-(4-aminofenyl)-3-(4-methoxyfenyl)-2-propen-1-on (**Ch2**)



$C_{16}H_{15}NO_2$, $M_r = 253,30$ g/mol, světle oranžová pevná látka t. t.: 81-83 °C, 71,06 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,15 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, CH_{arom}), 7,81 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, CH_{arom}), 7,79 (1H, d, $J = 15,1$ Hz, $CHCHCO$), 7,32 (1H, d, $J = 15,1$ Hz, $CHCHCO$), 7,05 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, CH_{arom}), 6,52 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, CH_{arom}), 6,03 (2H, s, NH_2), 3,82 (3H, s, OCH_3); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,6 (CO), 161,6 ($C_{arom-OCH_3}$), 154,4 ($C_{arom-NH_2}$), 142,5 ($CHCHCO$), 135,3 (CH_{arom}), 131,4 (CH_{arom}), 126,2 ($CHCHCO$), 121,7 ($C_{arom-CO}$), 120,6 ($C_{arom-CH}$), 115,4 (CH_{arom}), 113,4 (CH_{arom}), 55,8 (CH_3); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3345, 3320 (NH_2), 1627 (CO), 1595 ($C=C_{arom}$), 1176 (OCH_3)

7.5 Metodický postup syntézy trisubstituovaného s-triazinu

Substitucí posledního atomu chloru na disubstituovaném s-triazinu byly vytvořeny produkty 3A-K. Disubstituovaný meziprodukt, chalkon i báze byly do reakce přidávány v ekvimolárním množství.

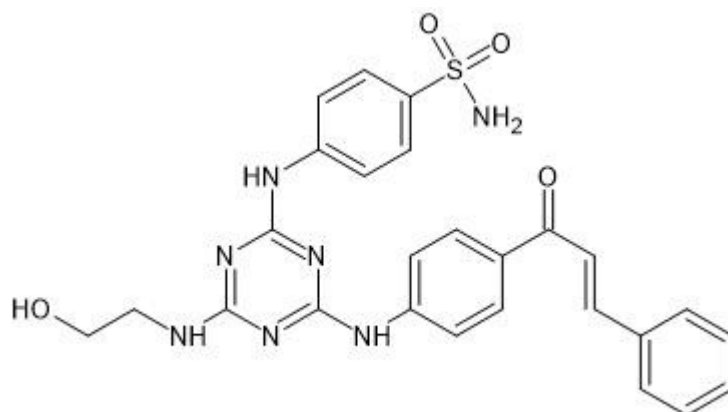
1 mmol příslušného disubstituovaného triazinu byl rozpuštěn v 50 ml DMF v širokohrdlé baňce s kulatým dnem, umístěné na vařiči s automatickou magnetickou míchačkou. Po rozpuštění bylo přidáno 0,1382 g (1 mmol) bezvodého K_2CO_3 a po 10 min byl přidán 1 mmol odpovídajícího chalkonu. Jakmile byla směs homogenně rozmíchána, byla zvýšena teplota na 110 °C a reakce dále probíhala pod refluxem při 110 °C. (Havránková, Csöllei, Vullo, Garaj, Pazdera, & Supuran, 2018) (Havránková, Čalkovská, Padrtová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Havránková, a další, 2021)

Průběh reakce byl kontrolován TLC. Po dokončení reakce byla reakční směs zfiltrována na fritě pro odstranění báze. Roztok byl odpařován do vysoké viskozity za pomoci RVO, vysrážen isopropylalkoholem a

chlazen při teplotě 2-8 °C po dobu 7 dní pro maximalizaci výtěžku. Výsledný produkt byl získán filtrací na skleněné fritě a sušen na Petriho misce v horkovzdušné sušárně při teplotě 70-80 °C.

7.5.1 Charakteristika syntetizovaných produktů 3A-K

4-({4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-fenylprop-2-enoyl]fenyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzen-1-sulfonamid (**3A**)

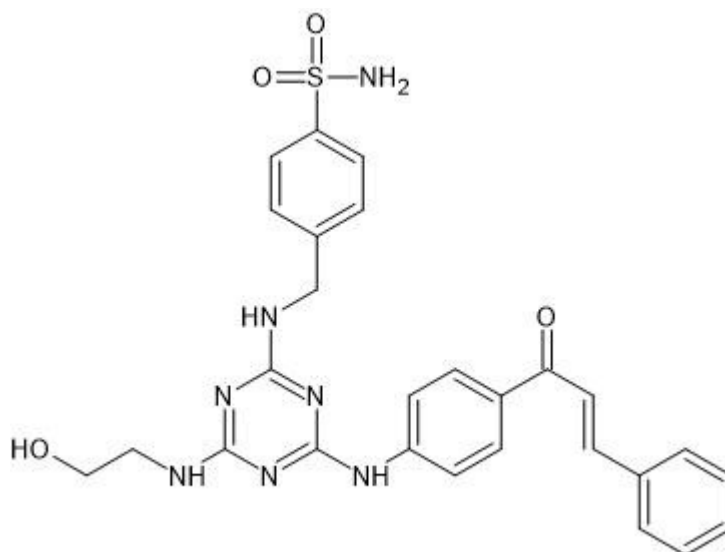


$C_{26}H_{25}N_7O_4S$, $M_r = 531,59$ g/mol, světle žlutá krystalická látka, t. t.: 252-255 °C, 45,40 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,32 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 7,96 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,80 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,76 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,63 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,54 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,49 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,37 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,29-7,26 (3H, m, CH_{arom}), 3,47-3,45 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,31-3,27 (2H, m, CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,0 (CO), 169,1 (C_{triaz-Nchalk}), 168,3 (C_{triaz-Nalk}), 167,1 (C_{triaz-Nsulf}), 145,2 (C_{arom-Nsulf}), 144,3 (C_{arom-Ssulf}), 143,6 (C_{arom-Nchalk}), 142,8 (C_{arom-CO}), 142,1 (CHCHCO), 134,4 (C_{arom-CH}), 128,9 (CH_{arom}), 128,4 (CH_{arom}), 127,3 (CH_{arom}), 126,9 (CH_{arom}), 124,4 (CH_{arom}), 124,2 (CH_{arom}), 123,6 (CH_{arom}), 117,5 (CHCHCO), 60,7 (CH₂CH₂OH), 45,1 (CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3344 (NH, OH, NH₂), 2944 (CH₂-alif), 1649 (CO), 1128 (OCH₃), 1494, 1397, 1238 (SO₂NH₂)

4-({4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-fenylprop-2-enoyl]fenyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)methyl]benzen-1-sulfonamid (**3B**)

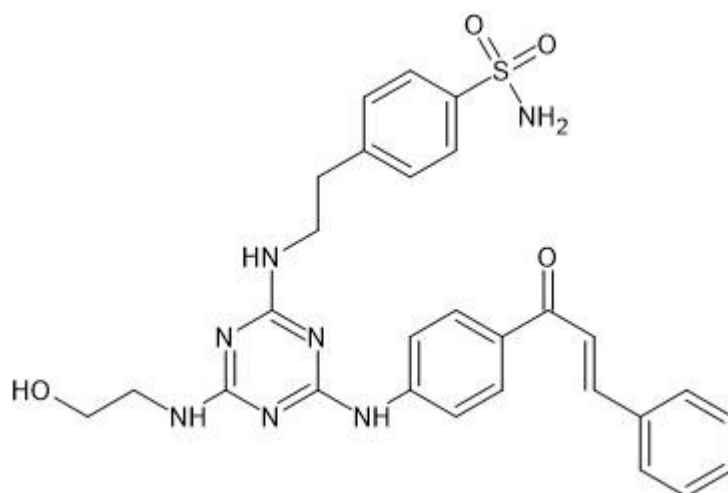
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{27}H_{27}N_7O_4S$, $M_r = 545,62$ g/mol, žlutobílá krystalická látka, t. t.: 203-205 °C, 47,47 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,87 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 7,93 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,85 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,76 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,64 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,54 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,48 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,42 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,28 (3H, m, CH_{arom}), 4,49 (2H, s, CH₂NH), 3,67-3,64 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,31-3,27 (2H, m, CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,2 (CO), 168,4 (C_{triaz-Nchalk}), 167,3 (C_{triaz-Nalk}), 166,7 (C_{triaz-Nsulf}), 145,1 (C_{arom-CH₂NH}), 144,3 (C_{arom-Ssulf}), 143,6 (C_{arom-Nchalk}), 142,5 (C_{arom-CO}), 142,0 (CHCHCO), 135,7 (C_{arom-CH}), 129,2 (CH_{arom}), 128,6 (CH_{arom}), 127,8 (CH_{arom}), 126,5 (CH_{arom}), 124,9 (CH_{arom}), 124,2 (CH_{arom}), 123,7 (CH_{arom}), 119,7 (CHCHCO), 58,6 (CH₂CH₂OH), 44,2 (CH₂-N_{sulf}), 36,4 (CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3342 (NH, OH, NH₂), 1670 (CO), 1133 (OCH₃), 1499, 1398, 1341 (SO₂NH₂)

4-[2-({4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzen-1-sulfonamid (**3C**)

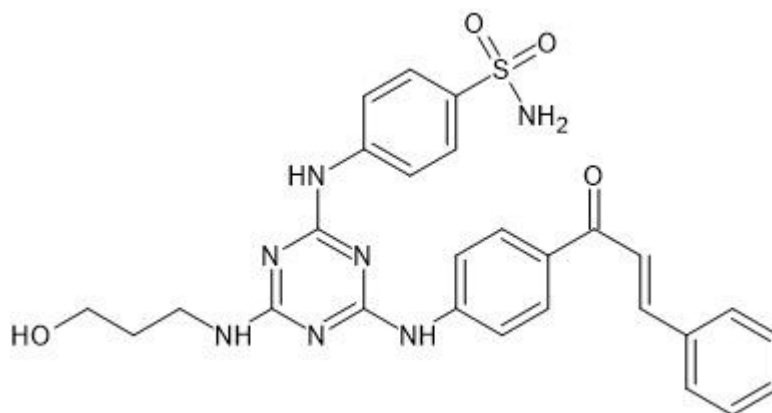


$C_{28}H_{29}N_7O_4S$, $M_r = 559,65$ g/mol, světle hnědá krystalická látka, t. t.: 197-199 °C, 41,34 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 7,96 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,84 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,75 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, $CHCHCO$), 7,58 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,51 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, $CHCHCO$), 7,49 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,36 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,29-7,27 (3H, m, CH_{arom}), 3,68-3,63 (2H, m, CH_2CH_2OH), 3,45-3,42 (2H, m, CH_2CH_2NH), 3,26-3,21 (2H, m, CH_2CH_2OH), 3,17-3,14 (2H, m, CH_2CH_2NH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,2 (CO), 168,3 ($C_{triaz-N_{chalk}}$), 166,1 ($C_{triaz-N_{alk}}$), 165,9 ($C_{triaz-N_{sulf}}$), 145,0 ($C_{arom-CH_2CH_2NH}$), 144,1 ($C_{arom-S_{sulf}}$), 143,7 ($C_{arom-N_{chalk}}$), 142,8 ($C_{arom-CO}$), 141,6 ($CHCHCO$), 134,2 ($C_{arom-CH}$), 129,0 (CH_{arom}), 128,3 (CH_{arom}), 127,6 (CH_{arom}), 126,7 (CH_{arom}), 124,9 (CH_{arom}), 124,2 (CH_{arom}), 123,8 (CH_{arom}), 117,4 ($CHCHCO$), 58,6 (CH_2CH_2OH), 44,3 (CH_2CH_2NH), 43,1 (CH_2CH_2OH), 36,3 (CH_2CH_2NH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3343 (NH, OH, NH_2), 2930 (CH_2 -alif), 1677 (CO), 1132 (OCH_3), 1402, 1348, 1264 (SO_2NH_2)

4-({4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-[(*E*)-3-fenylprop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)benzen-1-sulfonamid (**3D**)

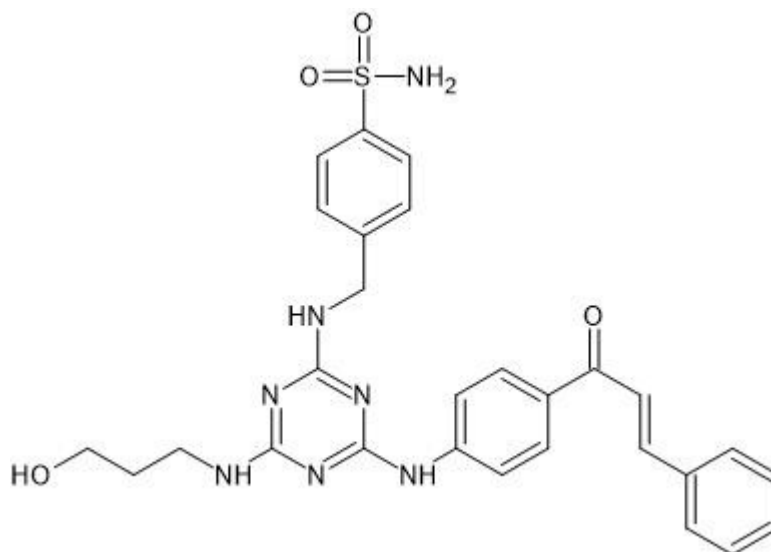
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{27}H_{27}N_7O_4S$, $M_r = 545,62$ g/mol, žlutá krystalická látka, t. t.: 225-227 °C, 43,51 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,06 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 7,91 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,82 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,74 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,60 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,54 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,39 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,36 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,29-7,25 (3H, m, CH_{arom}), 4,36-4,33 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 3,58-3,56 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,74-1,70 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,4 (CO), 168,1 (C_{triaz-Nchalk}), 166,2 (C_{triaz-Nalk}), 165,2 (C_{triaz-Nsulf}), 145,3 (C_{arom-Nsulf}), 144,1 (C_{arom-Ssulf}), 142,0 (C_{arom-Nchalk}), 141,9 (C_{arom-CO}), 141,1 (CHCHCO), 136,2 (C_{arom-CH}), 129,7 (CH_{arom}), 129,2 (CH_{arom}), 128,1 (CH_{arom}), 127,3 (CH_{arom}), 125,1 (CH_{arom}), 122,9 (CH_{arom}), 122,7 (CH_{arom}), 118,6 (CHCHCO), 56,8 (CH₂CH₂CH₂OH), 37,9 (CH₂CH₂CH₂OH), 29,2 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3330 (NH, OH, NH₂), 2944 (CH₂-alif), 1649 (CO), 1128 (OCH₃), 1495, 1397, 1226 (SO₂NH₂)

4-[[4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-[(2E)-3-fenylprop-2-enoyl]fenyl]amino)-1,3,5-triazin-2-yl]methyl]benzen-1-sulfonamid (**3E**)

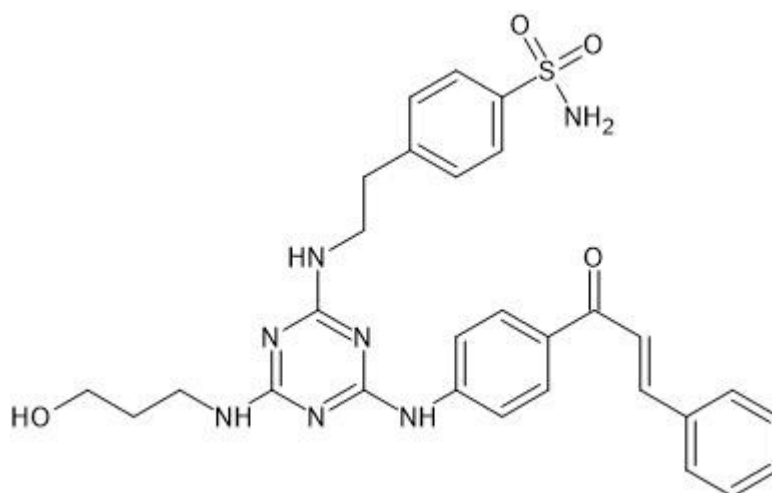


$C_{28}H_{29}N_7O_4S$, $M_r = 559,65$ g/mol, žlutobílá krystalická látka, t. t.: 214-216 °C, 36,00 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,01 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 7,97 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,82 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,76 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,61 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,54 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,48 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,40 (2H, d, $J = 8,1$ Hz), 7,33-7,31 (3H, m, CH_{arom}), 4,57-4,55 (2H, m, CH₂NH), 3,62-3,61 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,96-2,95 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,79-1,75 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,7 (CO), 168,1 (C_{triaz-Nchalk}), 166,0 (C_{triaz-Nalk}), 165,8 (C_{triaz-Nsulf}), 145,6 (C_{arom-CH₂NH}), 144,2 (C_{arom-Ssulf}), 142,0 (C_{arom-Nchalk}), 141,8 (C_{arom-CO}), 141,5 (CHCHCO), 136,7 (C_{arom-CH}), 129,8 (CH_{arom}), 129,1 (CH_{arom}), 128,0 (CH_{arom}), 127,1 (CH_{arom}), 124,4 (CH_{arom}), 123,9 (CH_{arom}), 122,1 (CH_{arom}), 119,8 (CHCHCO), 57,9 (CH₂CH₂CH₂OH), 44,3 (CH₂NH), 37,6 (CH₂CH₂CH₂OH), 28,9 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3329, 3290 (NH, OH, NH₂), 2933 (CH₂-alif), 1656 (CO), 1133 (OCH₃), 1505, 1340, 1271 (SO₂NH₂)

4-[2-({4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzen-1-sulfonamid (**3F**)

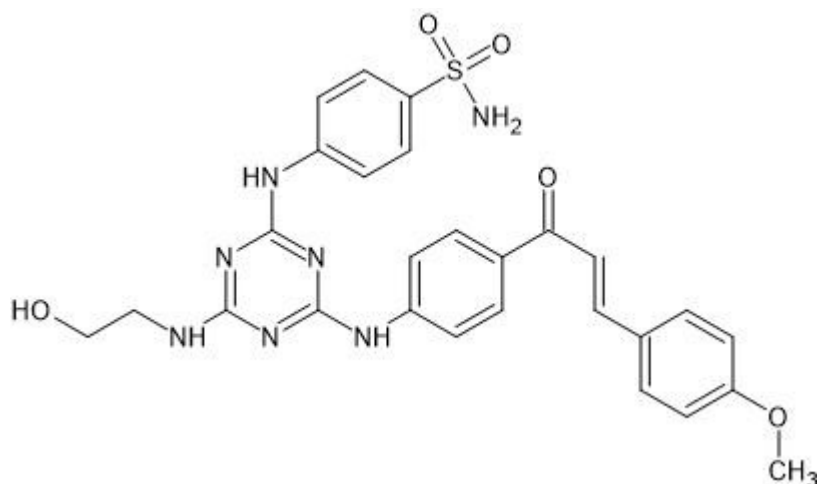
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{29}H_{31}N_7O_4S$, $M_r = 573,67$ g/mol, světle hnědá krystalická látka, t. t.: 222-225 °C, 37,83 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,24 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 7,96 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,83 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,74 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,58 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,51 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,50 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,39 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,08-7,03 (3H, m, CH_{arom}), 4,59-4,55 (2H, m, CH₂CH₂NH), 3,69-3,67 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 3,14-3,10 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,91-2,87 (2H, m, CH₂CH₂NH), 1,89-1,88 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,3 (CO), 168,4 (C_{triaz-Nchalk}), 165,7 (C_{triaz-Nalk}), 165,2 (C_{triaz-Nsulf}), 145,3 (C_{arom-CH₂CH₂NH}), 144,2 (C_{arom-Ssulf}), 142,3 (C_{arom-Nchalk}), 142,0 (C_{arom-CO}), 141,8 (CHCHCO), 136,5 (C_{arom-CH}), 129,7 (CH_{arom}), 128,6 (CH_{arom}), 127,8 (CH_{arom}), 126,7 (CH_{arom}), 124,5 (CH_{arom}), 123,2 (CH_{arom}), 122,0 (CH_{arom}), 116,3 (CHCHCO), 57,9 (CH₂CH₂CH₂OH), 44,6 (CH₂CH₂NH), 38,1 (CH₂CH₂CH₂OH), 33,0 (CH₂CH₂NH), 22,6 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3306 (NH, OH, NH₂), 2930 (CH₂-alif), 1670 (CO), 1133 (OCH₃), 1429, 1345, 1277 (SO₂NH₂)

4-({4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzen-1-sulfonamid (**3G**)

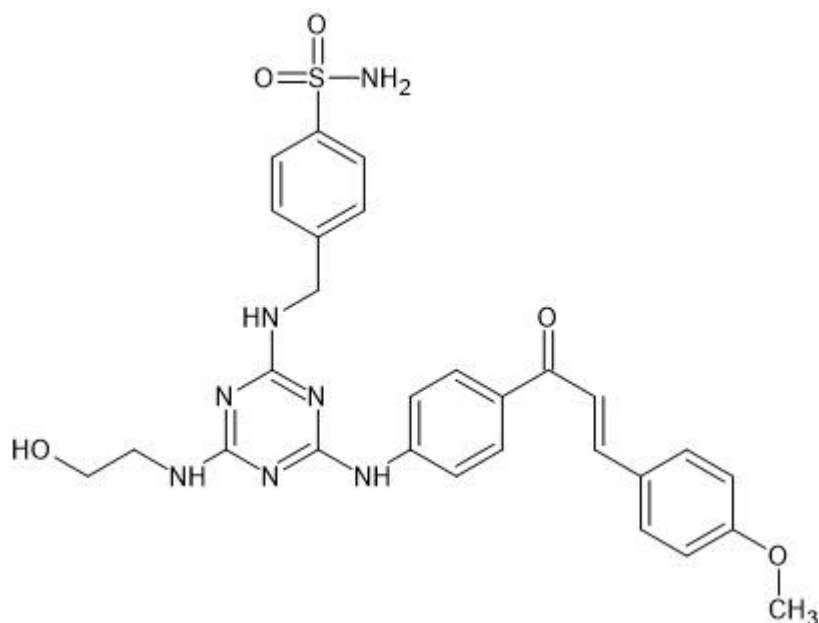


$C_{27}H_{27}N_7O_5S$, $M_r = 561,62$ g/mol, béžová krystalická látka, t. t.: 289-292 °C, 22,10 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,15 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 8,04 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,99 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,79 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,65 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,50 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,38 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,21 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,06 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 3,84 (3H, s, OCH₃), 3,44-3,39 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,30-3,28 (2H, m, CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,7 (CO), 169,4 (C_{triaz-Nchalk}), 168,7 (C_{triaz-Nalk}), 168,5 (C_{triaz-Nsulf}), 162,7 (C_{arom-OCH3}), 152,6 (C_{arom-Nchalk}), 144,8 (C_{arom-Nsulf}), 144,1 (C_{arom-Ssulf}), 143,6 (C_{arom-CO}), 142,5 (CHCHCO), 141,6 (C_{arom-CH}), 134,8 (CH_{arom}), 132,6 (CH_{arom}), 126,1 (CH_{arom}), 125,3 (CH_{arom}), 124,0 (CH_{arom}), 120,6 (CH_{arom}), 115,4 (CHCHCO), 60,4 (CH₂CH₂OH), 55,6 (OCH₃), 43,5 (CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3299 (NH, OH, NH₂), 2940 (CH₂-alif), 1129 (OCH₃), 1494, 1397, 1324 (SO₂NH₂)

4-[(4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-[(4-[(2E)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino)methyl]benzen-1-sulfonamid (**3H**)

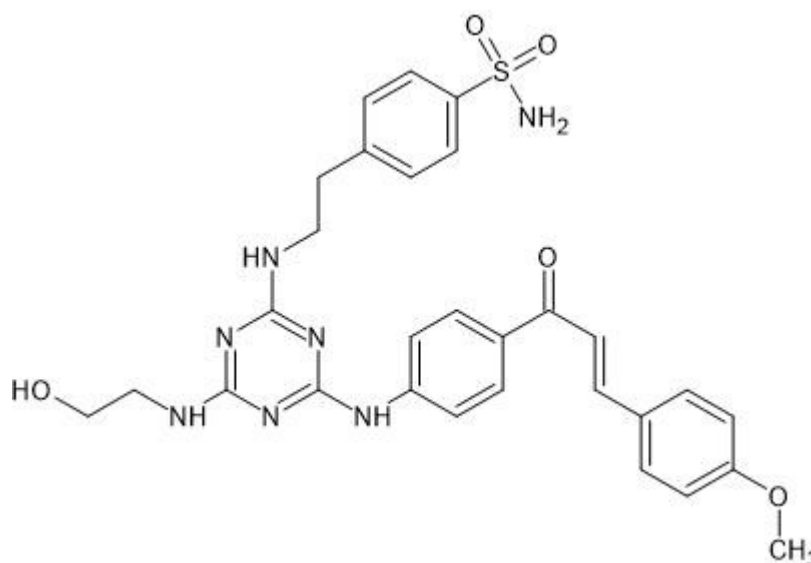
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{28}H_{29}N_7O_5S$, $M_r = 575,64$ g/mol, světle žlutohnědá krystalická látka, t. t.: 202-203 °C, 6,25 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,21 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 8,07 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,86 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,81 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,64 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,50 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,42 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,21 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,07 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 4,47 (2H, s, CH₂NH), 3,65-3,63 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,37-3,36 (2H, m, CH₂CH₂OH), 3,81 (3H, s, OCH₃); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,7 (CO), 169,3 (C_{triaz-Nchalk}), 169,0 (C_{triaz-Nalk}), 168,9 (C_{triaz-Nsulf}), 162,6 (C_{arom-OCH₃}), 153,4 (C_{arom-Nchalk}), 144,8 (C_{arom-CH₂NH}), 143,8 (C_{arom-Ssulf}), 143,5 (C_{arom-CO}), 142,5 (CHCHCO), 141,4 (C_{arom-CH}), 135,0 (CH_{arom}), 133,7 (CH_{arom}), 126,1 (CH_{arom}), 125,2 (CH_{arom}), 124,0 (CH_{arom}), 120,7 (CH_{arom}), 116,0 (CHCHCO), 58,3 (CH₂CH₂OH), 55,6 (OCH₃), 44,2 (CH₂NH), 36,6 (CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3323 (NH, OH, NH₂), 2932 (CH₂-alif), 1670 (CO), 1126 (OCH₃), 1398, 1342, 1258 (SO₂NH₂)

4-[2-({4-[(2-hydroxyethyl)amino]-6-({4-[(*E*)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzen-1-sulfonamid (**3Ch**)

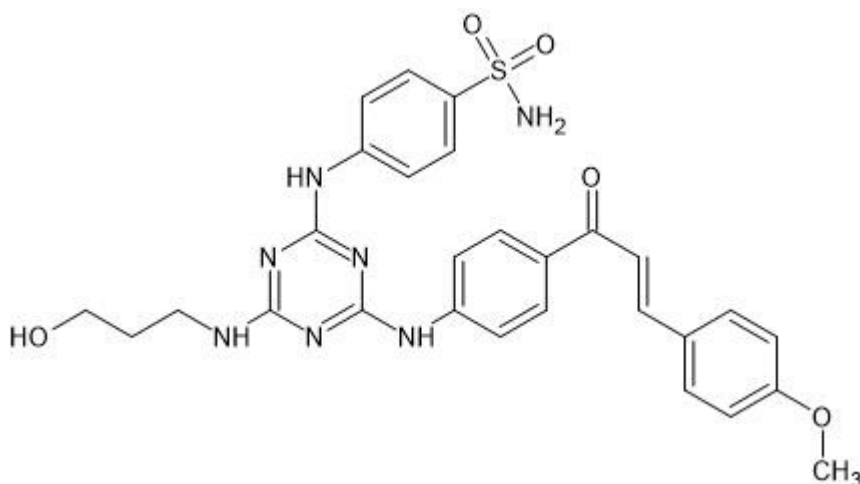


$C_{29}H_{31}N_7O_5S$, $M_r = 589,67$ g/mol, světle béžová krystalická látka, t. t.: 170-172 °C, 20,23 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,19 (6H, br s, NH, OH, NH_2), 8,01 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,89 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,86 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, $CHCHCO$), 7,64 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,52 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,49 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, $CHCHCO$), 7,18 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,06 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 3,92 (3H, s, OCH_3), 3,53-3,51 (2H, m, CH_2CH_2OH), 3,42-3,40 (2H, m, CH_2CH_2NH), 3,22-3,19 (2H, m, $CH_2CH_2CH_2OH$), 3,18-3,14 (2H, m, CH_2CH_2NH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,5 (CO), 169,2 ($C_{triaz-N_{chalk}}$), 168,6 ($C_{triaz-N_{alk}}$), 168,1 ($C_{triaz-N_{sulf}}$), 162,6 ($C_{arom-OCH_3}$), 153,1 ($C_{arom-N_{chalk}}$), 144,7 ($C_{arom-CH_2CH_2NH}$), 143,5 ($C_{arom-S_{sulf}}$), 142,4 ($C_{arom-CO}$), 142,2 ($CHCHCO$), 141,9 ($C_{arom-CH}$), 135,1 (CH_{arom}), 133,8 (CH_{arom}), 125,8 (CH_{arom}), 124,9 (CH_{arom}), 124,3 (CH_{arom}), 121,1 (CH_{arom}), 115,4 ($CHCHCO$), 60,7 (CH_2CH_2OH), 55,7 (OCH_3), 45,2 (CH_2CH_2NH), 44,5 (CH_2CH_2OH), 36,8 (CH_2CH_2NH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3353 (NH, OH, NH_2), 2932 (CH_2 -alif), 1670 (CO), 1125 (OCH_3), 1505, 1401, 1348 (SO_2NH_2)

4-({4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzen-1-sulfonamid
(3I)

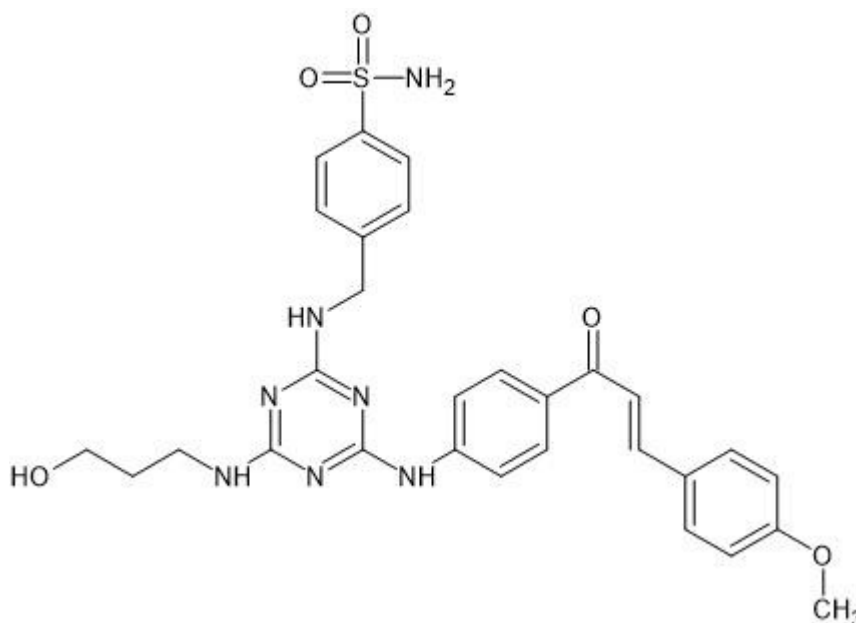
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



$C_{28}H_{29}N_7O_5S$, $M_r = 575,64$ g/mol, hnědá krystalická látka, t. t.: 240-242 °C, 17,50 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,41 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 8,17 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,98 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,89 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,71 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,56 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,47 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,23 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 6,95 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 4,02 (3H, s, OCH₃), 3,41-3,38 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,87-2,85 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,72-1,68 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,4 (CO), 169,3 (C_{triaz-Nchalk}), 169,2 (C_{triaz-Nalk}), 168,7 (C_{triaz-Nsulf}), 161,9 (C_{arom-OCH₃}), 154,1 (C_{arom-Nchalk}), 142,8 (C_{arom-Nsulf}), 142,5 (C_{arom-Ssulf}), 141,8 (C_{arom-CO}), 141,7 (CHCHCO), 141,5 (C_{arom-CH}), 136,2 (CH_{arom}), 134,2 (CH_{arom}), 127,4 (CH_{arom}), 126,7 (CH_{arom}), 124,3 (CH_{arom}), 121,0 (CH_{arom}), 116,1 (CHCHCO), 61,2 (CH₂CH₂CH₂OH), 55,8 (OCH₃), 40,1 (CH₂CH₂CH₂OH), 33,7 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3341 (NH, OH, NH₂), 2940 (CH₂-alif), 1674 (CO), 1126 (OCH₃), 1505, 1402, 1348 (SO₂NH₂)

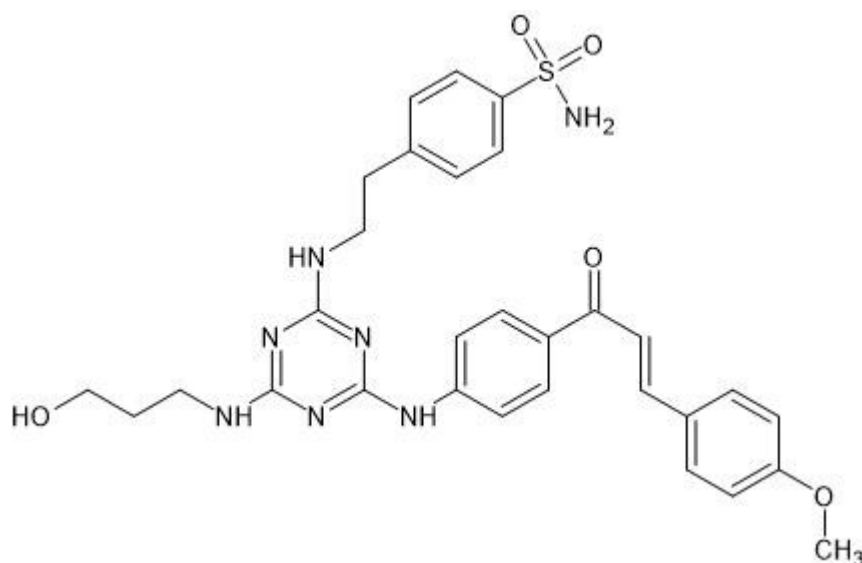
4-[[{4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-[(*E*)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino)methyl]benzen-1-sulfonamid (**3J**)



$C_{29}H_{31}N_7O_5S$, $M_r = 589,67$ g/mol, světle hnědá krystalická látka, t. t.: 256-258 °C, 5,06 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,39 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 8,03 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,94 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,89 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,73 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,52 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,46 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,24 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,06 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 4,43 (2H, s, CH₂NH), 4,11 (3H, s, OCH₃), 3,45-3,41 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,91-2,88 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,63-1,62 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 189,0 (CO), 169,1 (C_{triaz-Nchalk}), 168,8 (C_{triaz-Nalk}), 168,7 (C_{triaz-Nsulf}), 162,0 (C_{arom-OCH3}), 154,1 (C_{arom-Nchalk}), 142,9 (C_{arom-CH2NH}), 142,5 (C_{arom-Ssulf}), 141,9 (C_{arom-CO}), 141,8 (CHCHCO), 140,3 (C_{arom-CH}), 136,2 (CH_{arom}), 134,1 (CH_{arom}), 127,8 (CH_{arom}), 125,1 (CH_{arom}), 124,4 (CH_{arom}), 120,6 (CH_{arom}), 116,3 (CHCHCO), 61,2 (CH₂CH₂CH₂OH), 56,1 (OCH₃), 44,3 (CH₂NH), 37,6 (CH₂CH₂CH₂OH), 33,1 (CH₂CH₂CH₂OH); IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3292 (NH, OH, NH₂), 2958 (CH₂-alif), 1613 (CO), 1125 (OCH₃), 1515, 1402, 1335 (SO₂NH₂)

4-[2-({4-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-({4-[(2E)-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-enoyl]fenyl}amino)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)ethyl]benzen-1-sulfonamid (**3K**)



$C_{30}H_{33}N_7O_5S$, $M_r = 603,70$ g/mol, žlutobílá krystalická látka, t. t.: 215-217 °C, 11,56 % výtěžek

1H -NMR δ_H (ppm, 400 MHz, DMSO- d_6): 8,32 (6H, br s, NH, OH, NH₂), 8,07 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,99 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,86 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,68 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,59 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 7,49 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, CHCHCO), 7,18 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, CH_{arom}), 6,78 (2H, d, $J = 8,1$ Hz), 4,09 (3H, s, OCH₃), 3,63-3,61 (2H, m, CH₂CH₂NH), 3,39-3,36 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 2,87-2,85 (2H, m, CH₂CH₂NH), 4,21-4,19 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH), 1,39-1,36 (2H, m, CH₂CH₂CH₂OH); ^{13}C -NMR δ_C (ppm, 100 MHz, DMSO- d_6): 188,5 (CO), 169,4 (C_{triaz}-N_{chalk}), 169,1 (C_{triaz}-N_{alk}), 168,5 (C_{triaz}-N_{sulf}), 161,7 (C_{arom}-OCH₃), 154,3 (C_{arom}-N_{chalk}), 143,8 (C_{arom}-CH₂CH₂NH), 143,1 (C_{arom}-S_{sulf}), 142,8 (C_{arom}-CO), 141,2 (CHCHCO), 141,0 (C_{arom}-CH), 137,0 (CH_{arom}), 135,7 (CH_{arom}), 127,4 (CH_{arom}), 125,3 (CH_{arom}), 124,3 (CH_{arom}), 120,7 (CH_{arom}), 116,1 (CHCHCO), 62,0 (CH₂CH₂CH₂OH), 55,7 (OCH₃), 43,9 (CH₂CH₂NH), 38,1 (CH₂CH₂CH₂OH), 34,2 (CH₂CH₂CH₂OH), 33,6 (CH₂CH₂NH); IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3329, 3293 (NH, OH, NH₂), 2926 (CH₂-alif), 1670 (CO), 1125 (OCH₃), 1403, 1350, 1184 (SO₂NH₂)

7.6 Metodický postup měření antioxidační aktivity

Absorpční spektroskopii UV-VIS byla stanovena antioxidační aktivita produktů 3A-K a standardů kyseliny askorbové a troloxu. Do 50 ml titrační baňky bylo naváženo 0,192 g diamonné soli ABTS (kyselina 2,2'-

azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová) a rozpuštěno v 50 ml čištěné vody pro získání základního roztoku o koncentraci 7 mM. Radikál ABTS^{•+} byl připraven přefiltrováním přes filtrační papír č. 5, na jehož povrch byl nanesen oxid mangančitý. Vzhledem ke krátké době použitelnosti byl roztok radikálu takto připraven každý den čerstvý.

Jednotlivé produkty 3A-K byly rozpuštěny v DMSO v Eppendorf zkumavkách pro získání zásobních roztoků ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ M). Ty byly ředěny deionizovanou vodou v čase potřeby za vzniku dvou sad stanovovaných roztoků ($c = 1 \cdot 10^{-3}$, $c = 1 \cdot 10^{-4}$). Podobně byly připraveny zásobní a stanovované roztoky standardů, tj. kyseliny askorbové a troloxu. (Gonzalez, Pota, Su Turan, da Costa, Akkaraju, & Green, 2017) (Havránková, Čalkovská, Padrťová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020)

Před měřením jednotlivých vzorků byl nejdříve změřen blank obsahující DMSO a deionizovanou vodu. Následně byla zjištěna absorbance roztoku ABTS^{•+}, která byla dále použita pro stanovení antioxidační aktivity. Při měření vzorků byl do křemenné kyvety nadávkován roztok radikálu ABTS^{•+}, deionizovaná voda a stanovovaný roztok v příslušné koncentraci. Absorbance byla odečtena v čase 0, 5 a 30 min, přičemž každé měření bylo provedeno třikrát.

Antioxidační aktivita byla zjištěna výpočtem podle vzorce:

$$I [\%] = \left(\frac{A_0 - A_x}{A_0} \right) \cdot 100,$$

kde A_0 odpovídá absorbanci čistého ABTS^{•+} a A_x odpovídá absorbanci stanovovaného roztoku. Výsledná antioxidační aktivita je nepřímě úměrná míře zhášení radikálu – čím více je radikál danou sloučeninou zhášen, tím nižší je naměřená absorbance. Výsledky byly porovnány se standardy kyselinou askorbovou a troloxem. (Lolak, Boga, Tuneg, Karakoc, Akocak, & Supuran, 2020) (Havránková, Čalkovská, Padrťová, Csöllei, Opatřilová, & Pazdera, 2020) (Lolak, Tuneg, Dogan, Boga, & Akocak, 2020)

7.7 Metodický postup měření antibiotické aktivity

Antimikrobiální potenciál produktů 3A-K a chalkonových meziproductů byl stanoven na Ústavu molekulární biologie Farmaceutické fakulty Masarykovi univerzity v Brně, týmem Ing. Marcely Nejezchelbové (Barbora Hájková, Daniela Čípová). Přesný metodický postup byl převzat z technologických postupů tohoto týmu.

Aktivita byla stanovena jako MIC mikrodiluční metodou (dle EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) na stránkách Státního zdravotního ústavu).

Stanovení bylo provedeno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách s rovným dnem. Pomocí multikanálových pipet bylo do destiček přidáno médium a antimikrobní látky. Pro kultivaci každého kmene byla použita separátní destička, s několika různými antimikrobními látkami v různých koncentracích, získaných ředěním přímo v jamkách. Výsledný objem v jamce činil přibližně 100 μ l. Jako kontrola růstu sloužil bujon s mikroorganismem bez antimikrobní látky. Kontaminace živného média byla kontrolována proti bujonu bez mikroorganismu a bez antimikrobní látky. Pro korekci spektrofotometrického stanovení MIC byl rovněž vytvořen tzv. blank, tj. bujon s antimikrobní látkou bez organismu. Používá se u špatně rozpustných látek, které vytváří v médiu zákal, jehož hodnotu absorbance je potřeba odečíst od hodnoty absorbance vzorku, dané nárůstem mikroorganismu.

Do jamek bylo naočkováno inokulum o hustotě 0,5 McFarlanda s výslednou koncentrací v jamkách 10^4 - 10^5 CFU/ml. Takto připravená destička byla ponechána inkubovat 24 hod při teplotě 37 °C. Následně byla vizuálně či spektrofotometricky stanovena hodnota MIC, a to jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky bez viditelného růstu mikroorganismu (ve formě zákalu či sedimentu).

8 Závěr

Výzkum a vývoj nových účinných látek s protimikrobním účinkem jsou zcela klíčové pro budoucnost lidstva, které stále více ohrožuje narůstající rezistence patogenů na klinicky používaná antiinfektiva, zejména pak rezistence bakterií na antibiotika. V současné době jsou největším problémem gram-pozitivní multi-rezistentní kmeny MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*), PRSP (penicilin-rezistentní *Streptococcus pneumoniae*) a VRE (vankomycin-rezistentní *Enterococci*). (Ventola, 2015) (Lindmeier, 2018) (Liu, Long, Rakesh, & Zha, 2020) (Uchil, Murali, & Nayak, 2021) (Maleki, a další, 2021)

Léčiva kombinující sulfonamidové, chalkonové a hydroxyalkylaminové prvky na triazinovém skeletu vykazují slibné výsledky jako potenciální antibiotika, potažmo antiinfektiva působící i na další patogeny kvasinkového či protozoárního typu a působící proti oxidativnímu stresu. Suroviny sloužící jako výchozí látky jsou dostupné a ekonomicky únosné, navíc jejich použití v syntéze nevyžaduje žádná speciální nákladná zařízení.

Takto bylo úspěšně syntetizováno dvanáct nových, dříve nepopsaných látek v relativně dobrých výtěžcích a v dostatečné čistotě pro stanovení biologické aktivity. Látky byly předány Ing. Marcele Nejezchlebové pro stanovení antimikrobiotické aktivity proti kmenům *E. faecium* a *E. faecalis*, citlivým i rezistentním vůči vankomycinu, který byl použit jako standard. Aktivita byla prokázána u dvou produktů, a to v koncentraci řádově nižší než u vankomycinu. Tato skupina derivátů tedy jeví potenciál pro další výzkum zaměřený na nalezení nových antimikrobioticky účinných látek.

U všech nově syntetizovaných látek byla stanovena antioxidační aktivita, která se ve srovnání se standardem jeví jako relativně silná. Tyto látky tedy mají potenciál jako antioxidační látky v léčbě neurodegenerativních nemocí a další výzkum v této oblasti by mohl přinést bezpečná a účinná léčiva s širokým spektrem klinického uplatnění.

Použité zdroje

- Abbas, S. H., El-Hafeez, A. A., Shoman, M. E., Montano, M. M., & Hassan, H. A. (02. 11 2018). New quinoline/chalcone hybrids as anti-cancer agents: Design, synthesis,. *Bioorganic Chemistry*.
- Abbate, F., Casini, A., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (05 2004). Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with a topically acting antiglaucoma sulfonamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 2357-2361.
- Abdel-Mohsen, H. T., El Kerdawy, A. M., Omar, M. A., Petreni, A., Allam, R. M., El Diwani, H. I., a další. (15. 01 2022). Application of *the dual-tail approach* for the design and synthesis of novel Thiopyrimidine–Benzenesulfonamide hybrids as selective carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Abutaleb, N. S., Elhassanny, A. E., Nocentini, A., Hewitt, C. S., Elkashif, A., & Cooper, B. R. (11. 12 2021). Repurposing FDA-approved sulphonamide carbonic anhydrase inhibitors for treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 51-61.
- Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B., & McKenna, R. (09. 11 2012). *Structural annotation of human carbonic anhydrases*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 267-277.
- Aggarwal, M., Chua, T. K., Pinard, M. A., Szebenyi, D. M., & McKenna, R. (12. 10 2015). *Carbon Dioxide “Trapped” in a β -Carbonic Anhydrase*. *Biochemistry*, stránky 6631-6638.
- Ahmed, F. F., El-Hafeez, A. A., Abbas, S. H., Abdelhamid, D., & Abdel-Aziz, M. (10. 05 2018). New 1,2,4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 705-722.
- Al Rasheed, H. H., Malebari, A. M., Dahlous, K. A., Fayne, D., & El-Faham, A. (05. 09 2020). *Synthesis, Anti-proliferative Activity, and Molecular Docking Study of New Series of 1,3-5-Triazine Schiff Base Derivatives*. *Molecules*.

- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., & De Simone, G. (18. 05 2012). Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews*, stránky 4421-4468.
- Al-Zaydi, K. M., Khalil, H. H., El-Faham, A., & Khattab, S. N. (10. 05 2017). Synthesis, characterization and evaluation of 1,3,5-triazine aminobenzoic acid derivatives for their antimicrobial activity. *Chemistry Central Journal*, str. 39.
- Annunziato, G., Angeli, A., D'Alba, F., Bruno, A., Pieroni, M., Vullo, D., a další. (2016). Discovery of New Potential Anti-Infective Compounds Based on Carbonic Anhydrase Inhibitors by Rational Target-Focused Repurposing Approaches. *ChemMedChem*, stránky 1904-1914.
- Apaydin, S., & Török, M. (15. 08 2019). Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 2042-2050.
- Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., a další. (22. 04 2021). Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants*.
- Arshad, M., Bhat, A. R., Hoi, K. K., Choi, I., & Athar, F. (09. 01 2017). Synthesis, characterization and antibacterial screening of some novel. *Chinese Chemical Letters*, stránky 1559-1565.
- Bahar, A. A., Liu, Z., Garafalo, M., Kallenbach, N., & Ren, D. (10. 10 2015). Controlling Persister and Biofilm Cells of Gram-Negative Bacteria with a New 1,3,5-Triazine Derivative. *Pharmaceuticals*, stránky 696-710.
- Bekircan, O., Kūxūk, M., Kahveci, B., & Kolayili, S. (01. 08 2005). Convenient Synthesis of Fused Heterocyclic 1,3,5-Triazines from Some N-Acyl Imidates and Heterocyclic Amines as Anticancer and Antioxidant Agents. *Arch Pharm*, stránky 365-372.
- Blotny, G. (09. 10 2006). Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron*, stránky 9507-9522.

POUŽITÉ ZDROJE

- Bonardi, A., Nocentini, A., Osman, S. M., Ali Alasmary, F., Almutairi, T. M., Abdullah, D. S., a další. (20. 01 2021). Inhibition of α -, β - and γ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* with aromatic sulphonamides and clinically licenced drugs – a joint docking/molecular dynamics study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 469-479.
- Bozdag, M., Ferraroni, M., Nuti, E., Vullo, D., Rossello, A., Carta, F., a další. (01. 01 2014). Combining the tail and the ring approaches for obtaining potent and isoform-selective carbonic anhydrase inhibitors: Solution and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, stránky 334-340.
- Campestre, C., De Luca, V., Carradori, S., Grande, R., Carginale, V., Scaloni, A., a další. (19. 03 2021). Carbonic Anhydrases: New Perspectives on Protein Functional Role and Inhibition in *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology*.
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (25. 04 2014). An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (2015). An Overview of the Selectivity and Efficiency of the Bacterial *Carbonic Anhydrase Inhibitors*. *Current Medicinal Chemistry*, stránky 2130-2139.
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (08 2015). Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, stránky 1689-1704.
- Capasso, C., & Supuran, C. T. (2017). Inhibition of Bacterial Carbonic Anhydrases as a Novel Approach to Escape Drug Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, stránky 1237-1248.
- Carta, F., Garaj, V., Maresca, A., Wagner, J., Avvaru, B. S., Robbins, A. H., a další. (15. 05 2011). Sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties selectively and potently inhibit carbonic anhydrase transmembrane isoforms IX, XII and XIV over cytosolic isoforms I and II: Solution and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, stránky 3105-3119.

- Carta, F., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (15. 06 2012). *Sulfonamides: a patent review (2008 – 2012)*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, stránky 747-758.
- Cascioferro, S., Parrino, B., Spano, V., Carbone, A., Montalbano, A., Barraja, P., a další. (06. 10 2017). 1,3,5-Triazines: A promising scaffold for anticancer drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 523-549.
- Cascioferro, S., Parrino, B., Spano, V., Carbone, A., Montalbano, A., Barraja, P., a další. (08. 08 2017). An overview on the recent developments of 1,2,4-triazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 328-375.
- Cídlová, d. M., & Mokrý, M. Z. (2018). Obecná chemie: Iontová vazba. Získáno 27. 03 2022, z Obecná chemie: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna_chemie/web/pages/17-iontova-vazba.html
- Cídlová, d. M., Mokrý, M. Z., & Valová, M. B. (2018). Obecná chemie: Koordinační sloučeniny. Získáno 27. 03 2022, z Obecná chemie: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna_chemie/web/pages/15-koordinacni-slouceniny.html
- Covarrubias, A. S., Larsson, A. M., Högbom, M., Mowbray, S. L., & Unge, T. (05 2005). Structure and Function of Carbonic Anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, stránky 18782-18789.
- Cuffaro, D., Nuti, E., & Rossello, A. (20. 10 2020). An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1906-1922.
- Cumberland, S., Chaib, F., Bagozzi, D., & Dias, H. M. (20. 09 2017). The world is running out of antibiotics, WHO report confirms. Získáno 29. 01 2022, z World Health Organization: <https://www.who.int/news/item/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
- De Luca, V., Petreni, A., Nocentini, A., Scaloni, A., Supuran, C. T., & Capasso, C. (08. 01 2021). Effect of Sulfonamides and Their Structurally Related Derivatives on the Activity of α -Carbonic

POUŽITÉ ZDROJE

Anhydrase from Burkholderia territorii. *International Journal of Molecular Sciences*.

De Simone, G., Alterio, V., & Supuran, C. T. (30. 04 2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery*, stránky 793-810.

Del Prete, S., De Luca, V., De Simone, G., Supuran, C. T., & Capasso, C. (15. 08 2016). Cloning, expression and purification of the complete domain of the η -carbonic anhydrase from Plasmodium falciparum. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 54-59.

Del Prete, S., De Luca, V., Vullo, D., Osman, S. M., Al Othman, Z., Carginale, V., a další. (02. 11 2015). A new procedure for the cloning, expression and purification of the β -carbonic anhydrase from the pathogenic yeast Malassezia globosa, an anti-dandruff drug target. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1156-1161.

Del Prete, S., Nocentini, A., Supuran, C. T., & Capasso, C. (21. 04 2020). Bacterial ι -carbonic anhydrase: a new active class of carbonic anhydrase identified in the genome of the Gram-negative bacterium Burkholderia territorii. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.

Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., Carginale, V., Ferraroni, M., Osman, S. M., a další. (01. 03 2016). Sulfonamide inhibition studies of the β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium Vibrio cholerae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, stránky 1115-1120.

Del Prete, S., Vullo, D., Di Fonzo, P., Osman, S. M., Al Othman, Z., Donald, W. A., a další. (01. 02 2017). Sulfonamide inhibition profile of the γ -carbonic anhydrase identified in the genome of the pathogenic bacterium Burkholderia pseudomallei the etiological agent responsible of melioidosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 490-495.

doc. Mgr. Hana Cídlová, D., Mokrá, M. Z., & Valová, g. B. (2018). Obecná chemie: *Chemická vazba*. Získáno 27. 03 2022, z Obecná chemie: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna_chemie/web/pages/9-chemicka-vazba.html

- doc. Mgr. Hana Cídlová, D., Mokrý, M. Z., & Valová, M. B. (2018). Obecná chemie: Slabé vazebné interakce. Získáno 27. 03 2022, z Obecná chemie:
https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js18/obecna_chemie/web/pages/16-slabe-vazebne-interakce.html
- Domsic, J. F., Avvaru, B. S., Kim, C. U., & Agbandje-McKenna, M. (11 2008). Entrapment of *Carbon Dioxide* in the Active Site of Carbonic Anhydrase II. *Journal of Biological Chemistry*, stránky 30766-30771.
- El-Faham, A., Sharma, A., Farooq, M., Almarhoon, Z., Alhameed, R. A., Wadaan, M. A., a další. (2020). Protocol for synthesis of di- and tri-substituted s-triazine derivatives. *MethodsX*, str. 100825.
- Elimam, D. M., Eldehna, W. M., Salem, R., Bonardi, A., Nocentini, A., Al-Rashood, S. T., a další. (15. 01 2022). Natural inspired ligustrazine-based SLC-0111 analogues as novel carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Eminoglu, A., Vullo, D., Asik, A., Colak, D. N., Canakci, S., Beldüz, A. O., a další. (01. 04 2016). Sulfonamide inhibition studies of the β -carbonic anhydrase from the newly discovered bacterium *Enterobacter* sp. B13. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 1821-1826.
- Fathi, M. A., El-Hafeez, A. A., Abdelhamid, D., Abbas, S. H., Montano, M. M., & Abdel-Aziz, M. (03 2019). 1,3,4-oxadiazole/chalcone hybrids: Design, synthesis, and inhibition of leukemia cell growth and EGFR, Src, IL-6 and STAT3 activities. *Bioorganic Chemistry*, stránky 150-163.
- Feinendegen, L. E. (01. 02 2002). Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Human & Experimental Toxicology*, stránky 85-90.
- Ferraroni, M. (2019). γ -Carbonic anhydrases. *Carbonic Anhydrases*, stránky 79-105.
- Ferreira, L. M., Kobelnik, M., Regasini, L. O., Dutra, L. A., Bolzani, V. d., & Ribeiro, C. A. (2017). Synthesis and evaluation of the thermal behavior of flavonoids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, stránky 1605-1610.

POUŽITÉ ZDROJE

- Gagné, F. (2014). Chapter 6 - Oxidative Stress. *Biochemical Ecotoxicology*, 103-115.
- Ganji, L. R., Gandhi, L., Musturi, V., & Kanyalkar, M. A. (2021). Design, *synthesis*, and evaluation of different scaffold derivatives against NS2B-NS3 protease of dengue virus. *Medicinal Chemistry Research*, stránky 285-301.
- Garaj, V., Puccetti, L., Fasolis, G., Winum, J.-Y., Montero, J.-L., Scozzafava, A., a další. (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 5427-5433.
- Garaj, V., Puccetti, L., Fasolis, G., Winum, J.-Y., Montero, J.-L., Scozzafava, A., a další. (15. 06 2005). Carbonic anhydrase inhibitors: Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine *moieties as inhibitors of the* cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 3102-3108.
- Gharat, R., Prabhu, A., & Khambete, M. P. (11. 01 2022). Potential of triazines in Alzheimer's disease: A versatile privileged scaffold. *Arch Pharm*.
- Ghiasi, M., Hemati, S., & Zahedi, M. (01. 06 2017). Activation modelling of β - and γ -class of carbonic anhydrase with amines and amino acids: Proton transfer process within the active site from thermodynamic point of view. *Computational and Theoretical Chemistry*, stránky 42-57.
- Giovannuzzi, S., Hewitt, C. S., Nocentini, A., Capasso, C., Costantino, G., Flaherty, D. P., a další. (09. 02 2022). Inhibition studies of bacterial α -carbonic anhydrases with phenols. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 666-671.
- Gonzalez, P., Pota, K., Su Turan, L., da Costa, V. C., Akkaraju, G., & Green, K. N. (03. 08 2017). Synthesis, Characterization, and Activity of a Triazine Bridged Antioxidant Small Molecule. *ACS Chemical Neuroscience*, stránky 2414-2423.
- Guler, O. O., Capasso, C., & Supuran, C. T. (29. 06 2015). A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and

characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 689-694.

Gupta, O., Pradhan, T., Bhatia, R., & Monga, V. (05. 11 2021). Recent advancements in anti-leishmanial research: Synthetic strategies and structural activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*, str. 113606.

Halliwell, B. (01 2007). *Oxidative stress and cancer: have we moved forward?* *Biochemical Journal*, stránky 1-11.

Havránková, E., Csöllei, J., & Pazdera, P. (05. 10 2019). New Approach for the One-Pot Synthesis of 1,3,5-Triazine Derivatives: Application of Cu(I) Supported on a Weakly Acidic Cation-Exchanger Resin in a Comparative Study. *Molecules*.

Havránková, E., Csöllei, J., Vullo, D., Garaj, V., Pazdera, P., & Supuran, C. T. (04 2018). Novel sulfonamide incorporating piperazine, aminoalcohol and 1,3,5-triazine structural motifs with carbonic anhydrase I, II and IX inhibitory action. *Bioorganic Chemistry*, stránky 25-37.

Havránková, E., Čalkovská, N., Padrtová, T., Csöllei, J., Opatřilová, R., & Pazdera, P. (14. 04 2020). Antioxidative Activity of 1,3,5-Triazine Analogues Incorporating Aminobenzene Sulfonamide, Aminoalcohol/Phenol, Piperazine, Chalcone, or Stilbene Motifs. *Molecules*.

Havránková, E., Garaj, V., Mascaretti, Š., Angeli, A., Soldánová, Z., Kemka, M., a další. (26. 12 2021). Novel 1,3,5-Triazinyl Aminobenzenesulfonamides Incorporating Aminoalcohol, Aminochalcone and Aminostilbene Structural Motifs as Potent Anti-VRE Agents, and Carbonic Anhydrases I, II, VII, IX, and XII Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*.

Havránková, E., Pena-Méndez, E. M., Csöllei, J., & Havel, J. (02 2021). Prediction of *biological activity of compounds containing a 1,3,5-triazinyl sulfonamide scaffold* by artificial neural networks using simple molecular descriptors. *Bioorganic Chemistry*.

Hou, Z., Lin, B., Bao, Y., Yan, H.-n., Zhang, M., Chang, X.-w., a další. (26. 05 2017). Dual-tail approach to discovery of novel carbonic anhydrase IX inhibitors by simultaneously matching the

POUŽITÉ ZDROJE

- hydrophobic and hydrophilic halves of the active site. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 1-10.
- Huang, Y., Zhang, S., Chen, H., Zhao, L., Zhang, Z., Cheng, P., a další. (18. 07 2019). A Zinc Coordination Complex Mimicking Carbonic Anhydrase for CO₂ Hydrolysis and Sequestration. *Inorganic Chemistry*, stránky 9916-9921.
- Chatterjee, S. (2016). Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. *Oxidative Stress and Biomaterials*, 35-38.
- Chaudhari, B. B., Bali, A., & Balaini, A. (30. 09 2020). Design and Synthesis of Novel Anti-inflammatory/Anti-ulcer Hybrid Molecules with Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, stránky 994-1006.
- Chintakrindi, A. S., Gohil, D. J., Kothari, S. T., Chowdhary, A. S., & Kanyalkar, M. A. (22. 02 2018). Design, synthesis and evaluation of chalcones as H1N1. *Medicinal Chemistry Research*, stránky 1013-1025.
- Infračervená spektrometrie: Infračervená Spektroskopie. (2013). *Získáno 27. 03 2022, z Infračervená spektrometrie: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2013/C3804/Infracervena_Spektroskopie_VSCHT.pdf*
- Iverson, T. M., Alber, B. E., Kisker, C., Ferry, J. G., & Rees, D. C. (08. 07 2000). A Closer Look at the Active Site of γ -Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*, stránky 9222-9231.
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N., & Zarkovic, K. (03 2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, stránky 154-165.
- Jin, C., Zhang, S., Zhang, Z., & Chen, Y. (2018). Mimic Carbonic Anhydrase Using Metal–Organic Frameworks for CO₂ Capture and Conversion. *Inorganic Chemistry*, stránky 2169-2174.
- Juránek, I., Nikitovic, D., Kouretas, D., Hayes, A. W., & Tsatsakis, A. M. (11 2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative

stress by exogenous antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, stránky 240-247.

- Kaur, J., Cao, X., Abutaleb, N. S., Elkashif, A., Graboski, A. L., Krabill, A. D., a další. (28. 07 2020). Optimization of Acetazolamide-Based Scaffold as Potent Inhibitors of Vancomycin-Resistant Enterococcus. *Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 9540-9562.
- Kim, J. K., Lee, C., Lim, S. W., Adhikari, A., Andring, J. T., McKenna, R., a další. (11. 09 2020). Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nature Communications*.
- Kolesinka, B., & Kaminski, Z. J. (02. 05 2009). The umpolung of substituent effect in nucleophilic aromatic substitution. A new approach to the synthesis of N,N-disubstituted melamines (triazine triskelions) under mild reaction conditions. *Tetrahedron*, stránky 3573-3576.
- Koščová, P., & Provazní, I. (2016). RACIONÁLNÍ NÁVRH LÉČIV S VYUŽITÍM FARMAKOFOROVÉHO MODELOVÁNÍ. *Chemické listy*, stránky 575-580.
- Krajčiaková, D., Pecher, D., Garaj, V., & Mikuš, P. (13. 09 2017). Optimization and Comparison of Synthetic Procedures for a Group of Triazinyl-Substituted Benzene-Sulfonamide Conjugates with Amino Acids. *Molecules*.
- Kreml, J. (*nedatováno*). *Slovník cizích slov: Patogen*. Získáno 27. 03 2022, z Slovník cizích slov: <https://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/patogen-patogenni>
- Kumar, S., Rulhania, S., Jaswal, S., & Monga, V. (07. 10 2020). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Langer, P., & Hoffmann, D. D. (2006). *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Latham, K. (22. 01 2021). *Biology Dictionary: Gram-Positive vs. Gram-Negative*. Získáno 23. 03 2022, z Biology Dictionary: <https://biologydictionary.net/gram-positive-vs-gram-negative/>

POUŽITÉ ZDROJE

- Li, W., Chen, W.-S., Zhou, P.-P., Zhu, S.-L., & Yu, L.-J. (02 2013). Influence of initial calcium ion concentration on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by bacterial carbonic anhydrase. *Chemical Engineering Journal*, stránky 65-72.
- Lindmeier, C. (29. 01 2018). High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. Získáno 29. 01 2022, z World Health Organization: <https://www.who.int/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
- Liu, H., Long, S., Rakesh, K. P., & Zha, G.-F. (01. 01 2020). Structure-activity relationships (SAR) of triazine derivatives: Promising antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Lolak, N., Akocak, S., Türkes, C., Taslimi, P., Isik, M., Beydemir, S., a další. (07 2020). *Synthesis, characterization, inhibition effects, and molecular docking studies as acetylcholinesterase, α -glycosidase, and carbonic anhydrase inhibitors of novel benzenesulfonamides incorporating 1,3,5-triazine structural motifs. Bioorganic Chemistry*.
- Lolak, N., Boga, M., Tuneg, M., Karakoc, G., Akocak, S., & Supuran, C. T. (03. 01 2020). Sulphonamides incorporating 1,3,5-triazine structural motifs show antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibitory profile. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 424-431.
- Lolak, N., Tuneg, M., Dogan, A., Boga, M., & Akocak, S. (24. 08 2020). Synthesis and biological evaluation of 1,3,5-triazine-substituted. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Records*, stránky 22-31.
- Malbari, K. D., Chintakrindi, A. S., Ganji, L. R., Gohil, D. J., Kothari, S. T., Joshi, M. V., a další. (2019). Structure-aided drug development of potential neuraminidase inhibitors against pandemic H1N1 exploring alternate binding mechanism. *Molecular Diversity*, stránky 927-951.
- Maleki, D., Manouchehrifar, M., Khejlan, M. N., Mossavi, S. H., Jannati, E., Doghaheh, H. P., a další. (12 2021). Vancomycin-resistant Enterococcus species: Antimicrobial resistance and virulence genes profile. *Gene Reports*, str. 101338.

- Maňasková, M. D. (2012). MedicinMan: Oxidační stres. Získáno 27. 03 2022, z MedicinMan: <http://medicinman.cz/?p=leky-latky/oxidacni-stres>
- Marcus, E. A., Moshfegh, A. P., Sachs, G., & Scott, D. R. (15. 01 2005). The Periplasmic α -Carbonic Anhydrase Activity of *Helicobacter pylori* Is Essential for Acid Acclimation. *Journal of Bacteriology*.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., a další. (01 2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, stránky 40-45.
- Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N. B., Poulsen, S.-A., Scozzafava, A., a další. (10. 02 2009). Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors#. *Journal of the American Chemical Society*, stránky 3057-3062.
- Marques, B. C., Santos, M. B., Anselmo, D. B., Monteiro, D. A., Gomes, E., Saiki, M. F., a další. (2020). Methoxychalcones: Effect of Methoxyl Group on the Antifungal, Antibacterial and Antiproliferative Activities. *Medicinal Chemistry*, stránky 881-891.
- Martysiak-Żurowska, D., & Wentka, W. (01 2012). A Comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*.
- Mewada, N. S., Shah, D. R., Lakum, H. R., & Chikhaliya, K. H. (27. 03 2018). Synthesis and biological evaluation of novel s-triazine based aryl/heteroaryl entities: Design, rationale and comparative study. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, stránky 8-18.
- Mgr. Jana Kopecká, P., & Mgr. Gabriela Rotková, P. (2017). *Skripta ke cvičení: Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik*. Získáno 27. 03 2022, z Skripta ke cvičení: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/stanoveni_citlivosti_atb.html

POUŽITÉ ZDROJE

- Miguel-Chávez, R. S. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. Phenolic Compounds - Biological Activity (stránky 59-74). Zagreb: IntechOpen.
- Mikulová, M. B., Kružlicová, D., Pecher, D., Petreni, A., Supuran, C. T., & Mikuš, P. (19. 10 2021). Synthesis and Inhibition Activity Study of Triazinyl-Substituted Amino(alkyl)-benzenesulfonamide Conjugates with Polar and Hydrophobic Amino Acids as Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases I, II, IV, IX, and XII. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Mikuš, P., Krajčiová, D., & Mikulová, M. (05. 08 2018). Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine and amino acid structural motifs as inhibitors of the physiological anhydrase isoenzymes I, II and IV and tumor-associated isoenzyme IX. *Bioorganic Chemistry*, stránky 241-252.
- Milkovic, L., Gasparovic, A. C., Cindric, M., Mouthury, P.-A., & Zarkovic, N. (30. 07 2019). Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells*.
- Modak, J. K., Tikhomirova, A., Gorrell, R. J., Rahman, M. M., Kotsanas, D., & Korman, T. M. (17. 09 2019). Anti-Helicobacter pylori activity of ethoxzolamide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1660-1667.
- Molekulová absorpční spektrometrie: Teorie UV-VIS spektrometrie. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Molekulová absorpční spektrometrie:
https://web.vscht.cz/~koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf
- Mooibroek, T. J., & Gamez, P. (01. 01 2007). The s-triazine ring, a remarkable unit to generate supramolecular interactions. *Inorganica Chimica Acta*, stránky 381-404.
- Newton, A. S., Liosi, M.-E., Henry, S. P., Deiana, L., Faver, J. C., Krimmer, S. C., a další. (03. 08 2021). Indoloxotriazines as binding molecules for the JAK2 JH2 pseudokinase domain and its V617F variant. *Tetrahedron Letters*.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., a další. (01. 07 2007). Carbonic anhydrase inhibitors: The β -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for

sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 3585-3594.

- Nishimori, I., Onishi, S., Hiroaki, T., & Supuran, C. T. (2008). The α and β Classes Carbonic Anhydrases from *Helicobacter pylori* as Novel Drug Targets. *Current Pharmaceutical Design*, stránky 622-630.
- Nishimori, I., Onishi, S., Takeuchi, H., & Supuran, C. T. (2008). The α and β Classes Carbonic Anhydrases from *Helicobacter pylori* as Novel Drug Targets. *Current Pharmaceutical Design*, stránky 622-630.
- Nocentini, A., & Supuran, C. T. (22. 08 2019). Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, stránky 1175-1197.
- Nocentini, A., Angeli, A., Carta, F., Winum, J.-Y., Zalubovskis, R., & Carradori, S. (21. 02 2021). Reconsidering anion inhibitors in the general context of *drug design studies* of modulators of activity of the classical enzyme carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 561-580.
- Nocentini, A., Supuran, C. T., & Capasso, C. (06. 09 2021). An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1988-1995.
- Nukleární magnetická rezonance: Úvod do NMR.* (2013). Získáno 27. 03 2022, z Nukleární magnetická rezonance: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2013/C8950/um/NMR_1.pdf
- Orhan, F., Senturk, M., & Genisel, M. (04 2022). A new carbonic anhydrase identified in the Gram-negative bacterium (*Chromohalobacter* sp.) and the interaction of anions with the enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.
- Ortiz, G. G., Moisés, F. P., Mireles-Ramírez, M., Flores-Alvarado, L. J., González-Usigli, H., Sánchez-González, V. J., a další. (2017). Chapter One - Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, stránky 1-31.

POUŽITÉ ZDROJE

- Ouellette, R. J., & Rawn, D. (2015). Condensation Reactions of Carbonyl Compounds. *Organic Chemistry Study Guide*, 419-463.
- Pagnozzi, D., Pala, N., Biossa, G., Dallochio, R., Dessi, A., Singh, P. K., a další. (31. 01 2022). Interaction Studies between Carbonic Anhydrase and a Sulfonamide Inhibitor by Experimental and Theoretical Approaches. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, stránky 271-277.
- Palanisamy, G. S., Kirk, N. M., Ackart, D. F., Shanley, C. A., Orme, I. M., & Basaraba, R. J. (18. 10 2011). Evidence for Oxidative Stress and Defective Antioxidant Response in Guinea Pigs with Tuberculosis. *PLoS ONE*.
- Petreni, A., De Luca, V., Scaloni, A., Nocentini, A., Capasso, C., & Supuran, C. T. (04. 01 2021). Anion inhibition studies of the Zn(II)-bound α -carbonic anhydrase from the Gram-negative bacterium *Burkholderia territorii*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 372-376.
- Pokludová, L., Bureš, J., & Hera, A. (2016). Rezistence k antimikrobikům. *Zemědělec*.
- Provensi, G., Nocentini, A., Passani, M. B., Blandina, P., & Supuran, C. T. (02. 03 2021). Activation of carbonic anhydrase isoforms involved in modulation of emotional memory and cognitive disorders with histamine agonists, antagonists and derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 719-726.
- Rahman, M. M., Tikhomirova, A., Modak, J. K., Hutton, M. L., Supuran, C. T., & Roujeinikova, A. (15. 04 2020). Antibacterial activity of ethoxzolamide against *Helicobacter pylori* strains SS1 and 26695. *Gut Pathogens*.
- Ravi, B. S., Nirupam, D., Srabanti, J., & Aparoop, D. (2012). Synthesis and In Vitro Antibacterial Screening of some New 2,4,6-Trisubstituted-1,3,5-Triazine Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, stránky 316-321.
- Reddy, M. V., Rao, K. Y., Anusha, G., Kumar, G. M., Damu, A. G., Reddy, K. R., a další. (08 2021). In-vitro evaluation of antioxidant and

anticholinesterase activities of novel pyridine, quinoxaline and s-triazine derivatives. *Environmental Research*.

- Rozsypal, H. (10. 12 2001). *Terapie infekčních nemocí: Antimikrobiální léčba*. Získáno 27. 03 2022, z *Terapie infekčních nemocí*: <https://infekce.lf1.cuni.cz/atb1.htm>
- Sagheer, S., Jabbar, A., Pervez, M. K., Rani, K., Ambreen, & Riaz, S. (15. 02 2022). Sulfonamide based antimicrobial reactive dyes: A study of their synthesis, fastness and antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure*.
- Saluja, A. K., Tiwari, M., Vullo, D., & Supuran, C. T. (01 2014). Substituted benzene sulfonamides incorporating 1,3,5-triazinyl moieties potently inhibit human carbonic anhydrases II, IX and XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 1310-1314.
- Santos, M. B., Pinhanelli, V. C., Garcia, M. A., Silva, G., Baek, S. J., Franca, S. C., a další. (29. 09 2017). Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2'- and 4'-aminochalcones against tumor canine cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 884-889.
- Senapathi, J., Bommakanti, A., Vangara, S., & Kondapi, A. K. (11 2021). Design, synthesis, and evaluation of HIV-1 entry inhibitors based on broadly neutralizing antibody 447-52D and gp120 V3loop interactions. *Bioorganic Chemistry*.
- Shah, D. R., Modh, R. P., & Chikhaliya, K. H. (17. 03 2014). Privileged s-triazines: structure and pharmacological applications. *Future Medicinal Chemistry*.
- Shankar, K., & Mehendale, H. M. (2014). Oxidative Stress. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, stránky 735-737.
- Sharma, A., El-Faham, A., de la Torre, B. G., & Albericio, F. (01. 11 2018). Exploring the Orthogonal Chemoselectivity of 2,4,6-Trichloro-1,3,5-Triazine (TCT) as a Trifunctional Linker With Different Nucleophiles: Rules of the Game. *Frontiers in Chemistry*.
- Sharma, A., Sheyi, R., de la Torre, B. G., El-Faham, A., & Albericio, F. (06. 02 2021). s-Triazine: A Privileged Structure for Drug Discovery and Bioconjugation. *Molecules*.

POUŽITÉ ZDROJE

- Sharma, A., Sheyi, R., de la Torre, B. G., El-Faham, A., & Albericio, F. (06. 02 2021). s-Triazine: A Privileged Structure for Drug Discovery and Bioconjugation. *Molecules*.
- Shen, T., Li, W., Pan, W., Lin, S., Zhu, M., & Yu, L.-J. (07 2017). Role of bacterial carbonic anhydrase during CO₂ capture in the CO₂-H₂O-carbonate system. *Biochemical Engineering Journal*, stránky 66-74.
- Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress*, 1-8.
- Sies, H. (04 2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, stránky 180-183.
- Sies, H. (2019). Chapter 13 - Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*, stránky 153-163.
- Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative Stress. *Encyclopedia of Stress* (Second Edition), 45-48.
- Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (06. 10 2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 758-777.
- Singh, S., Mandal, M. K., Masih, A., Saha, A., Ghosh, S. K., Bhat, H. R., a další. (24. 03 2021). 1,3,5-Triazine: A versatile pharmacophore with diverse biological activities. *ArchPharm*.
- Singla, P., Luxami, V., & Paul, K. (21. 07 2015). Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 39-57.
- Solankee, A., Kapadia, K., Ciric, A., Sokovic, M., Doytchinova, I., & Geronikaki, A. (02 2010). Synthesis of some new S-triazine based chalcones and their derivatives as potent antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 510-518.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (15. 03 2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, stránky 1741-1751.

- Supuran, C. T. (02 2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, stránky 168-181.
- Supuran, C. T. (05. 07 2011). Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Frontiers in Pharmacology*, str. 34.
- Supuran, C. T. (02. 04 2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 759-772.
- Supuran, C. T. (06. 03 2013). Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, stránky 677-679.
- Supuran, C. T. (30. 11 2015). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 345-360.
- Supuran, C. T. (12. 07 2016). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal*.
- Supuran, C. T. (02. 02 2018). Carbon- versus sulphur-based zinc binding groups for carbonic anhydrase inhibitors? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 485-495.
- Supuran, C. T. (19. 09 2018). Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, stránky 709-712.
- Supuran, C. T. (21. 03 2018). Carbonic Anhydrases and Metabolism. *Metabolites*.
- Supuran, C. T. (08 2020). Coumarin carbonic anhydrase inhibitors from natural sources. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1462-1470.
- Supuran, C. T. (25. 03 2020). Exploring the multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, stránky 671-686.

POUŽITÉ ZDROJE

- Supuran, C. T. (30. 07 2021). Multitargeting approaches involving carbonic anhydrase inhibitors: hybrid drugs against a variety of disorders. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1702-1714.
- Supuran, C. T., & Capasso, C. (11. 11 2017). An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases. *Metabolites*.
- Supuran, C. T., & Capasso, C. (03. 09 2020). Antibacterial carbonic anhydrase inhibitors: an update on the recent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, stránky 963-982.
- Supuran, C. T., Nicolae, A., & Popescu, A. (1996). Carbonic anhydrase inhibitors. Part 35. Synthesis of *Schiff bases derived from sulfanilamide and aromatic aldehydes*: the first inhibitors with equally high affinity towards cytosolic and membrane-bound isozymes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 431-438.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Casini, A. (13. 12 2002). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, stránky 146-189.
- Syrjänen, L., Kuuslahti, M., Tolvanen, M., Vullo, D., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (15. 05 2015). The β -carbonic *anhydrase* from the malaria mosquito *Anopheles gambiae* is highly inhibited by sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, stránky 2303-2309.
- Tanpure, R. P., Ren, B., Peat, T. S., Bornaghi, L. F., Vullo, D., Supuran, C. T., a další. (12. 01 2015). Carbonic Anhydrase Inhibitors with Dual-Tail Moieties To Match the Hydrophobic and Hydrophilic Halves of the Carbonic Anhydrase Active Site. *Journal of Medicinal Chemistry*, stránky 1494-1501.
- Tristao, T. C., Campos-Buzzi, F., Correa, R., Cruz, R. C., Filho, V. C., & Cruz, A. B. (19. 10 2012). Antimicrobial and Cytotoxicity Potential of Acetamido,. *Arzneimittelforschung*, stránky 590-594.
- Trojánek, M. (2006). Enterokoky izolované z urogenitálního. Pardubice: Gymnázium Pardubice.

- Ueda, K., Nishida, H., & Beppu, T. (03 2012). Dispensabilities of Carbonic Anhydrase in Proteobacteria. *International Journal of Evolutionary Biology*.
- Uchil, A., Murali, T. S., & Nayak, R. (01 2021). Escaping ESKAPE: A chalcone perspective. *Results in Chemistry*, str. 100229.
- Urbanski, L. J., Angeli, A., Hytönen, V. P., Di Fiore, A., De Simone, G., Parkkila, S., a další. (28. 12 2020). Inhibition of the β -carbonic anhydrase from the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis* with sulphonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 330-335.
- Urbanski, L. J., Bua, S., Angeli, A., Kuuslahti, M., Hytönen, V. P., Supuran, C. T., a další. (24. 09 2020). Sulphonamide inhibition profile of *Staphylococcus aureus* β -carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1834-1839.
- Urbanski, L. J., Vullo, D., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (31. 05 2021). An anion and small molecule inhibition study of the β -carbonic anhydrase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1088-1092.
- Velký lékařský slovník: Antioxidanty. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Velký lékařský slovník:
<https://lekarske.slovníky.cz/pojem/antioxidanty>
- Velký lékařský slovník: Enzym. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Velký lékařský slovník:
<https://lekarske.slovníky.cz/pojem/enzym>
- Velký lékařský slovník: Inhibice. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Velký lékařský slovník:
<https://lekarske.slovníky.cz/pojem/inhibice>
- Velký lékařský slovník: Izoenzym. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Velký lékařský slovník:
<https://lekarske.slovníky.cz/pojem/izoenzym>
- Velký lékařský slovník: *Potenciace*. (nedatováno). Získáno 27. 03 2022, z Velký lékařský slovník:
<https://lekarske.slovníky.cz/pojem/potenciace>

POUŽITÉ ZDROJE

- Ventola, C. L. (04 2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Získáno 29. 01 2022*, z US National Library of Medicine:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
- Verma, M., Bhaduri, G. A., Kumar, V. S., & Deshpande, P. A. (2021). Biomimetic Catalysis of CO₂ Hydration: A Materials Perspective. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, stránky 4777-4793.
- Verma, S. K., Verma, R., Xue, F., Thakur, P. K., Girish, Y. R., & Rakesh, K. P. (12 2020). Antibacterial activities of sulfonyl or sulfonamide containing heterocyclic derivatives and its structure-activity relationships (SAR) studies: A critical review. *Bioorganic Chemistry*, str. 104400.
- Vermelho, A. B., Cardoso, V. d., Ricci Junior, E., dos Santos, E. P., & Supuran, C. T. (01. 12 2017). Nanoemulsions of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors strongly inhibit the growth of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 139-146.
- Vullo, D., Del Prete, S., Di Fonzo, P., Carginale, V., Donald, W. A., Supuran, C. T., a další. (07. 03 2017). Comparison of the Sulfonamide Inhibition Profiles of the β - and γ -Carbonic Anhydrases from the Pathogenic Bacterium *Burkholderia pseudomallei*. *Molecules*.
- Vullo, D., Del Prete, S., Fisher, G. M., Andrews, K. T., Poulsen, S.-A., Capasso, C., a další. (01. 02 2015). Sulfonamide inhibition studies of the η -class carbonic anhydrase from the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, stránky 526-531.
- Vullo, D., Del Prete, S., Osman, S. M., De Luca, V., Scozzafava, A., Al Othman, Z., a další. (01. 01 2014). Sulfonamide inhibition studies of the δ -carbonic anhydrase from the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 275-279.
- Vullo, D., Kumar, R. S., Scozzafava, A., Ferry, J. G., & Supuran, C. T. (03. 11 2017). Sulphonamide inhibition studies of the β -carbonic anhydrase from the bacterial pathogen *Clostridium perfringens*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 31-36.

- Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, stránky 1129-1143.
- Winum, J.-Y., Poulsen, S.-A., & Supuran, C. T. (03. 12 2008). Therapeutic applications of glycosidic carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, stránky 419-435.
- Xu, M., Wu, P., Shen, F., Ji, J., & Rakesh, K. P. (10 2019). Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development. *Bioorganic Chemistry*.
- Yang, S.-Y. (06 2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, stránky 444-450.
- Zahradníček, O. (2013). Lékařská mikrobiologie: Mikroby a makroorganismus. Získáno 27. 03 2022, z Lékařská mikrobiologie: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/BLLM0422p/um/39714513/T08_Patogenita_a_virulence_prubeh_a_formy_infekce.pdf
- Zaro, M. J., Bortolotti, A., Riafrecha, L. E., Concellón, A., Morbidoni, H. R., & Colinas, P. A. (05. 05 2016). Anti-tubercular and antioxidant activities of C-glycosyl carbonic anhydrase inhibitors: towards the development of novel chemotherapeutic agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, stránky 1726-1730.
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (10. 05 2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, stránky 7762-7810.
- Zimmerman, S., Innocenti, A., Casini, A., Ferry, J. G., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (20. 12 2004). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the prokariotic beta and gamma-class enzymes from Archaea with sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, stránky 6001-6006.

Rejstřík

A

aktivace karboanhydrázy, 24
alkylaminy, 53
antibiotická rezistence, 37, 38
antioxidační aktivita, 69
 ABTS, 69
antioxidanty, 42

B

Bakteriální karboanhydrázy, 25

F

farmakofor, 45

H

Hydratace CO₂, 22

Ch

chalkony, 51
 chemická struktura, 52
 inhibice CA, 52
chemická struktura, 45

I

inhibice karboanhydrázy, 32, 36
IR, 76

K

Karboanhydrázy, 22
Katalytická aktivita, 22
kation kovu, 28
kavita, 26, 29

L

Lidské karboanhydrázy, 25

M

mechanismus účinku, 32

N

NMR, 75
nukleofilní substituce, 55
 one-pot syntéza, 57
 pořadí nukleofilů, 57
 průběh reakce, 56
 výťažnost reakcí, 57

O

oxidační stres, 41

P

protozoa, 39
příprava chalkonových substituentů, 62, 84
 bazicky katalyzovaná reakce, 63
 Claisen-Schmidtova reakce, 62
 charakteristika produktů, 85
 kysele katalyzovaná reakce, 65
 výťažnost bazické syntézy, 63

S

sekundární struktura, 29
selektivita, 40
skelet, 46
struktura enzymu, 28
sulfonamid, 48
sulfonamidy
 inhibice CA, 50
syntéza disubstituovaného triazinu, 59, 79
 výťažnost reakce, 60
syntéza disubstituovaného trizinu
 charakteristika produktů, 80
syntéza monosubstituovaného triazinu, 57, 76
 charakteristika produktů, 77
 výťažnost, 58
syntéza trisubstituovaného triazinu, 66, 86
 výťažnost reakce, 68

T

teplota tání, 75
TLC, 75
transfer protonu H⁺, 29
transmembránové karboanhydrázy, 26

triazin, 47

1,3,5-triazin, 48

 α -CA, 25, 29**U**

UV-VIS spektroskopie, 76

 β -CA, 25, 30**V**

vankomycin-rezistentní enterokoky, 38

 γ -CA, 26, 31**A****B****Γ**