

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



**SYNTÉZA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA DERIVÁTŮ KYSELINY
13-CIS-12-KARBOXYRETINOVÉ**

Bakalářská práce

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Autor: | Veronika Šidová |
| Studijní program: | Chemie |
| Studijní obor: | Bioorganická chemie |
| Typ studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. |
| Konzultant práce: | doc. RNDr. Miroslav Sural, PhD. |
| Termín odevzdání práce: | 3. 5. 2013 |

Já, Veronika Šidová, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. Mgr. Martina Modrianského, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dne 15. 1. 2013

.....

Ráda bych tímto poděkovala doc. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph.D. za obětavou pomoc a cenné připomínky při řešení a zpracování dané problematiky, doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za potřebné rady a zkušenosti v oblasti organické syntézy, dále i všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP a Katedry organické chemie PřF UP. Mé poděkování také náleží mé rodině, bez jejichž podpory a trpělivosti by tato práce nevznikla.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Veronika Šidová

Název práce: Syntéza a biologická aktivita derivátů kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP

Vedoucí práce: doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Práce pojednává o syntéze zcela nových struktur retinoidů a o následném testování jejich biologické aktivity na buněčné linii HepG2. Práce zahrnuje tři samostatné celky: v první části je popisována syntéza výchozí látky, tedy anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové. Druhá část práce se zabývá reaktivitou výchozí látky a ve třetí části je posléze posuzovaná toxicita těchto retinoidů a aktivace retinoidního receptoru připravenými sloučeninami. Tři z připravených sloučenin vykazují schopnost indukovat transkripční aktivitu retinoidního receptoru při submikromolárních koncentracích.

Klíčová slova:

Retinoidy, anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové, akutní promyelocytární leukémie, retinoidní receptory, biologická aktivita retinoidů.

Počet stran: 94

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Veronika Šidová

Title: Synthesis and biological activity of derivatives of 13-cis-12-carboxyretinoic acid

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of medical chemistry and biochemistry

Supervisor: doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

The work describes synthesis of novel retinoids and the follow-up tests of their biological activity on HepG2 cell line. Thesis consists of three individual parts: the first part describes the synthesis of novel retinoids, including anhydride of 13-cis-12-carboxyretinoic acid. The second part examines the reactivity of the retinoids synthesized and the third part is evaluation of cytotoxicity of the substances synthesized and their influence on retinoic acid receptor activity. Three of the substances synthesized display the ability to induce transcriptional activity of retinoic acid receptor at submicromolar concentrations.

Keywords:

Retinoids, anhydride 13-cis-12-carboxyretinoic acid, acute promyelocytic leukemia, retinoids receptor, the biological activity of retinoids.

Number of pages: 94

Language: Čeština

1. Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Obsah | 6 |
| 2. Úvod | 9 |
| 2.1. Retinoidy | 9 |
| 3. Teoretická část | 10 |
| 3.1. Nomenklatura, struktura a chemické vlastnosti | 10 |
| 3.2. Přirozené retinoidy | 11 |
| 3.2.1. Retinol | 11 |
| 3.2.2. Retinyl estery | 12 |
| 3.2.3. Retinal | 12 |
| 3.2.4. Kyselina retinová | 13 |
| 3.3. Metabolismus retinoidů | 13 |
| 3.3.1. Absorpce a transport | 14 |
| 3.3.2. Sekrece retinolu a retinyl esteru do lymfatického systému a cirkulace portálním oběhem | 20 |
| 3.3.3. Metabolismus retinolu v játrech | 21 |
| 3.3.4. Transport retinoidů do plasmy | 22 |
| 3.3.5. Biosyntéza retinalu a kyseliny retinové | 23 |
| 3.3.6. Buněčný katabolismus retinoidů | 26 |
| 3.4. Vliv retinoidů na organismus | 26 |
| 3.4.1. Proces vidění | 26 |
| 3.4.2. Jaderné receptory | 28 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.4.3. | Proteiny vázající retinoidy | 31 |
| 3.4.4. | Role retinoidů v diferenciaci a karcinogenezi | 32 |
| 3.5. | Syntetické metody přípravy jednotlivých retinoidů | 39 |
| 3.5.1. | Prekurzory syntézy kyseliny retinové..... | 40 |
| 3.5.2. | Syntéza kyseliny all-trans-retinové..... | 42 |
| 4. | Výsledky a diskuze | 48 |
| 4.1. | Celková strategie | 48 |
| 4.2. | Syntéza výchozí látky | 48 |
| 4.2.1. | Příprava nitrilu | 48 |
| 4.2.2. | Příprava (β -ioniliden)acetaldehydu..... | 49 |
| 4.2.3. | Příprava anhydridu β -methylglutakonové kyseliny | 49 |
| 4.2.4. | Příprava anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové | 50 |
| 4.3. | Reaktivita anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové a kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové..... | 50 |
| 4.3.1. | Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové | 51 |
| 4.4. | Testování biologické aktivity | 62 |
| 4.5. | Testy biologické aktivity | 62 |
| 4.5.1. | Principy chemiluminiscenčního stanovení luciferázy | 62 |
| 4.5.2. | Transfekce s využitím Lipofectamine 2000..... | 64 |
| 4.5.3. | Dual-light system..... | 64 |
| 4.5.4. | Chemiluminscenční měření luciferázy | 65 |
| 4.5.5. | Stanovení celkových proteinů metodou BCA | 65 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5.6. | Stanovení toxicity metodou MTT..... | 66 |
| 4.5.7. | Provedené experimenty..... | 66 |
| 5. | Experimentální část | 74 |
| 5.1. | Příprava výchozí látky | 74 |
| 5.1.1. | Příprava nitrilu | 74 |
| 5.1.2. | Příprava (β -ioniliden)acetaldehydu..... | 75 |
| 5.1.3. | Příprava anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové | 75 |
| 5.2. | Reaktivita anhydridu kyseliny 13-cis-13-karboxyretinové | 76 |
| 5.2.1. | Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové..... | 76 |
| 5.2.2. | Příprava piperidinylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové | 77 |
| 5.2.3. | Příprava esterů kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové | 77 |
| 5.2.4. | Příprava kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové..... | 78 |
| 6. | Závěr..... | 79 |
| 7. | Seznam použitých zkratk | 80 |
| 8. | Seznam použité literatury | 82 |
| 9. | Přílohy | 94 |

2. Úvod

2.1. Retinoidy

Retinoidy představují velkou skupinu látek odvozených od vitamínu A, mohou být jak přirozeným metabolitem organismu, tak i syntetického původu. V organismech obratlovců plní nenahraditelnou úlohu ve vývoji nervového systému, páteře a dalších struktur v embryonálním vývoji. Dále se významně podílejí na údržbě epitelů, imunitních kompetencí a reprodukci.¹

Již více jak 50 let je známý fakt, že tyto látky působí jako účinné prostředky pro regulaci proliferace a diferenciaci buněk, z těchto poznatků vyplývají další aplikace sloučenin. proto se řada vědeckých týmů zabývá syntézou nových sloučenin odvozených od retinoidů. Tato nová potencionální léčiva by měla vykazovat vyšší specifitu a lepší terapeutický efekt. Nové účinné syntetické retinoidy se pak mohou používat při léčbě široké škály onemocnění od dermatitid počínaje až léčbou onkologických onemocnění konče.^{1,6}

I dnes je využití retinoidů velmi široké, nejčastěji jsou spojovány s těmito látkami obory dermatologie, oftalmologie a v největší míře onkologie. Deriváty retinoidů našly nové aplikace v léčbě nádorových onemocnění a také v jejich prevenci. Použití retinoidů při léčbě maligních nádorů představuje výrazný posun vpřed. Konkrétně dochází ke značné remisi u nádorových onemocnění kůže, močového měchýře, plic, prostaty či prsu. Většinou jsou tyto látky kombinovány s chemoterapií a jsou schopny navodit dlouhodobé zlepšení. Jejich vlastností se rovněž využívá při chemopreventivních terapiích, kdy vykazují preventivní účinky premaligních onemocnění a mají schopnost inhibice některých tumorů.⁶

Jak bylo zmíněno výše tyto látky působí jako induktory buněčné diferenciaci, regulují vývoj a růst normálních i maligních buněk prostřednictvím vazby na jaderné receptory. Místem jejich působení je tedy většinou jádro buněk. Po navázání molekuly na specifický jaderný receptor dochází k regulaci genové transkripce. Právě ovlivňování průběhu transkripce řídí velké množství procesů v organismu.^{1,6,10}

Z farmakologického hlediska fungují retinoidy jako modulátory buněčného růstu, diferenciaci a apoptózy.⁷

Ať hovoříme o nových molekulách ve fázi výzkumu, nebo již schválené a používané látky, základním motivem všech struktur jsou přirozené retinoidy, které se běžně vyskytují

v organismech. I když byly již z velké části objasněny mechanismy absorpce, transportu a metabolismu těchto látek, je zde stále mnoho aspektů, které nejsou zcela dobře pochopeny. Jako příklad můžeme uvést roli retinoidů ve fyziologii a patologii.

3. Teoretická část

3.1. Nomenklatura, struktura a chemické vlastnosti

Pod pojmem retinoidy zpravidla zahrnujeme deriváty odvozené od kyseliny retinové. Jedná se o strukturní analoga obsahující šestičlenný cyklus na němž je navázán alifatický řetězec se čtyřmi izoprenovými jednotkami konjungovaných dvojných vazeb a s příslušnou jednou nebo více funkčními skupinami. Právě konjungovaný polyenový řetězec je zodpovědný za žluté zbarvení retinoidů, které může přecházet přes oranžovou až do tmavě hnědé barvy. Tento popis vystihuje retinoidy, které se přirozeně vyskytují v organismech.¹

Problém s definicí ale nastává ve chvíli, kdy budeme brát v úvahu syntetické retinoidy, jako jsou (6-(5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphtalen-2-yl)-2-naftalenkarboxylová kyselina (TTNN)¹¹⁸ a 4-[(1E)-3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)fenyl]-3-oxo-1-propen-1-yl]-benzoová kyselina (Ch-55).⁸ Oběma molekulám neodpovídá výše uvedená definice, nicméně obě ale vykazují větší afinitu na retinoidních receptorech než kyselina retinová nebo retinol.⁹ Z těchto důvodů byla navržena nová formulace definující retinoidy podle níž jsou to látky, které vykazují specifickou biologickou odpověď vazbou a aktivací buď jednoho nebo více specifických receptorů. V praxi se obvykle kombinují obě formulace.¹

Syntetické molekuly, které se specificky váží k retinoidnímu X receptoru (RXR) bývají nazývány rexinoidy,¹¹ syntetické retinoidy, které však neobsahují cyklus, jsou nazývány acyklické retinoidy nebo acyklické rexinoidy.

Nenasycenost alifatického postranního řetězce je jednou z příčin reaktivity molekul retinoidů. Existuje několik forem geometrických izomerů cis a trans podle polohy dvojných vazeb a polohy řetězce. Veškeré retinoidy jsou fotosenzitivní, což znamená, že pokud jsou vystaveny světlu, dochází k jejich oxidační degradaci nebo k izomeraci. Tato vlastnost je mimo jiné nezbytnou pro jejich biologickou aktivitu a také právě ovlivňuje přechody jednotlivých geometrických izomerů. Stabilnější formou izomerů představuje poloha trans, cis izomery mohou být velice snadno převedeny na druhou formu. Nicméně některé izomery se vyskytují běžně

v konfiguraci cis a v této formě také plní své základní funkce. Příkladem je forma 11-cis retinolu, který je přítomný v oční sítnici.¹²

3.2. Přírodní retinoidy

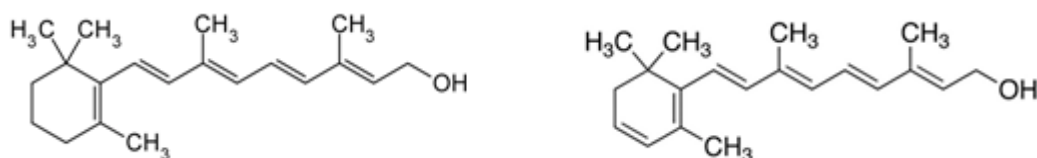
Mezi běžné přírodní retinoidy náleží retinol, retinal, kyselina retinová a retinyl estery. Sloučeniny se pak ještě vzájemně liší geometrickou izomerií. Přírodní retinoidy bývají vysoce aktivní hlavně v all-trans konfiguraci, ve které se také častěji vyskytují. Molekuly vykazují vysokou nestabilitu v přítomnosti jakýchkoli oxidantů a světla. Pokud je molekula vystavena těmto podmínkám, dochází k její oxidativní degradaci nebo izomeračním změnám. Degradace může také nastat při vystavení těchto látek vysokým teplotám. Z těchto důvodů by se měly retinoidní látky uskláňovat ve tmě a chladu.¹²

Retinoidy jsou značně lipofilní, proto transport přes hydrofilní fáze, jako je plasma nebo jiné extra- a intracelulární tekutiny, využívá vazebných proteinů. Nicméně existují i retinoidy, které se v určitém rozsahu koncentrací rozpouští v tělních tekutinách (např.: v plasmě). Tato schopnost retinoidů z nich dělá ideální morfogen vykazující schopnost efektivně difundovat jak skrz hydrofobní tak skrz hydrofilní fáze.¹

Pro vyjádření doporučeného množství přijatého vitamínu A za den se používají mezinárodní jednotky IU. Obecně platí, že 1 IU odpovídá 0,3 g all-trans-retinolu. Pro ekvivalenty retinolu platí jednotky RE, kde jsou převedeny všechny získané formy retinoidů na 1 jednotku.¹

3.2.1. Retinol

Za základ retinoidů lze považovat vitamín A, jenž je nezbytný pro život všech strunatců.^{6, 12} Ten se vyskytuje ve dvou formách a to jako vitamín A1 (retinol) a vitamín A2 (3-dehydroretinol). Rozdíl mezi formami tohoto vitamínu je pouze ve dvojně vazbě na prvním uhlíku v cyklu. Tato látka je již dlouho dobře známá a připravena byla již v roce 1947. Jak nomenklatura napovídá, retinol obsahuje hydroxylovou funkční skupinu, která předurčuje jeho reaktivitu. Molekuly snadno reagují a dochází tak k jejich metabolizaci, snadno se váží do komplexů vazebných proteinů, které je transportují.^{1, 6} U molekuly retinolu se projevuje geometrická izomerie, v organismech se ale převážně vyskytuje ve formě all-trans-retinolu. Molekula retinolu má molární hmotnost 286 g.mol⁻¹.

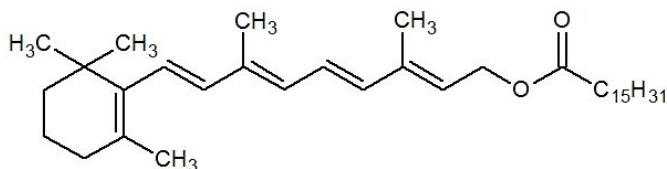


6

Obr. 1: vlevo vitamín A1 (retinol), vpravo vitamín A2 (dehydroretinol)

3.2.2. Retinyl estery

V organismech bývají retinoidy uloženy jako molekuly retinyl palmitátu a také další estery mastných kyselin jako jsou retinyl oleát nebo retinyl stearát. Představují také jeden ze způsobu získání retinoidů. Tyto estery bývají získávány bez další konverze přímo ze stravy živočišného původu, převážně masa. Získané molekuly pak dále podléhají enzymatickým reakcím, které poskytují retinol.^{1, 6, 12}

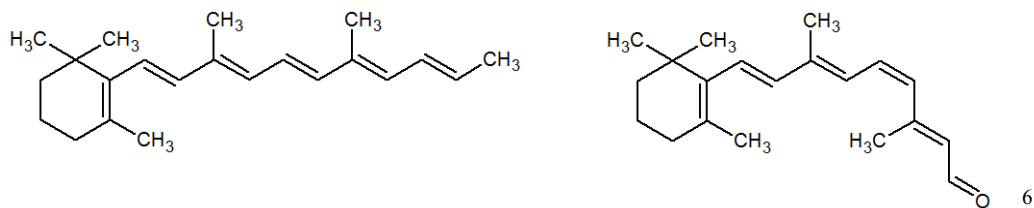


6

Obr. 2: retinyl palmitát

3.2.3. Retinal

Retinaldehyd nebo zkráceně retinal se vyskytuje v několika formách fotocitlivých geometrických izomerů. I když platí, že trans izomerie je stabilnější, tak v organismech je přítomno i malé množství izomeru cis. Přechod molekuly 11-cis-retinalu na all-trans konfiguraci iniciovaný fotony se podílí na procesu vidění a je zásadní při přenosu nervového vzruchu. Stejně jako ostatní retinoidy působí jako antioxidant. Dalším významným představitelem retinoidů s aldehydickou funkční skupinou je 9-cis-retinal. Spolu s ATRA vykazují až statisícinásobné zvýšení exprese určitých genů, než jejich prekurzory retinol a beta-karoten. Retinal způsobuje zjemnění a deskvamaci zrohovatělé kůže, čehož se využívá při léčbě *acne vulgaris*, helomů a dalších kožních onemocnění.^{1, 6, 9, 12}

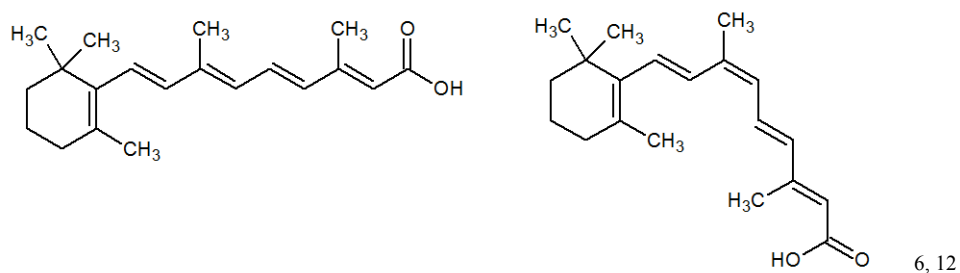


Obr. 3: vlevo all-trans-retinol, vpravo 11-cis-retinol

3.2.4. Kyselina retinová

Kyselina retinová představuje metabolit vitamínu A, který zprostředkovává funkce vitamínu. Tretinoin, jak bývá někdy kyselina retinová označována, funguje převážně jako regulátor genové exprese a je nezbytný pro normální růst a embryonální vývoj. Schopnost regulace vykazuje ATRA u několika stovek genů a umožňuje jí vazba na jaderné transkripční faktory. Navíc může funkce ATRA přesahovat i oblast genové regulace, protože existuje velké množství nekódující RNA, které jsou regulovány rovněž pomocí kyseliny retinové.¹ Dále jsou také známy mimojaderné mechanismy působení ATRA a retinoidů obecně. Z farmakologického hlediska lze ATRA považovat za antineoplastikum, tedy látku inhibující šíření nádorů, ATRA má rovněž značné uplatnění díky své povaze keratolytického činidla.^{9, 10}

Kyselina retinová je světle žlutá kapalina, která, stejně jako ostatní retinoidy, se vyskytuje hned v několika izomerních formách, které jsou fotocitlivé.



Obr. 4: vlevo all-trans-retinová kyselina, vpravo 9-cis-retinová kyselina

3.3. Metabolismus retinoidů

Jak již bylo zmíněno, retinoidy jsou potřebné pro udržení základních fyziologických procesů v těle. Ovlivňují normální růst a vývoj, vidění, imunitní systém, reprodukci, zdravou

pokožku a eliminují ochranné bariérové funkce pokožky, to způsobuje zvýšení mitotické aktivity v oblasti bazální membrány, změny v morfologii a ve funkci fibroblastů. ¹³ Více než 500 genů považujeme za regulátory metabolismu kyseliny retinové. Metabolismus je poměrně složitý a zahrnuje mnoho forem retinoidů od retinyl esterů, retinalu, retinolu, kyseliny retinové až po oxidované a konjungované metabolity. ^{1, 14} Kromě toho metabolismus zahrnuje také transportní proteiny, enzymy a další proteiny, které se mohou podílet na zprostředkování metabolismu triglyceridů a cholesterolu. ¹⁴

3.3.1. Absorpce a transport

Živočiškové nejsou schopni syntetizovat retinoidy *de novo*, proto zdrojem těchto látek je potrava. ¹⁵ Rostliny a některé druhy mikroorganismů mohou syntetizovat karotenoidy, které poté mimo jiné slouží jako prekurzory retinoidů. ¹⁶ Karotenoidy představují velkou skupinu pigmentů, které způsobují žluté, oranžové a až fialové zbarvení některých druhů zeleniny a ovoce. Dále se získané pigmenty absorbují do organismu, kde dochází k jejich uložení. Naa-kumulované karotenoidy pak v některých tkáních způsobují specifické zbarvení. ^{1, 16} Příkladem karotenoidních pigmentů jsou lutein, zeaxantin, lykopen, karoten, kanthaxantin a řada dalších.

Nicméně zvířata a rostliny mohou molekuly karotenoidů štěpit. Tím dojde k vytvoření biologicky aktivních molekul jako kyseliny abscisové u rostlin, trisporové kyseliny u hub a retinoidů u zvířat. ¹⁷

Místem této konverze jsou střeva a játra. Na základě přímého stanovení katalytické aktivity enzymu BCO1 v tenkém střevě a jaterních vzorcích bylo odhadnuto, že u dospělého člověka je maximální kapacita pro štěpení karotenoidů oběma orgány 12 mg/ den. ^{18, 19}

Druhou alternativou jak mohou zvířata získat potřebné retinoidy, je konzumace tkání a dalších živočišných produktů jiných zvířat, ve kterých už došlo ke konverzi karotenoidů na retinoidy. Touto cestou lze získat hlavně retinyl estery a v menší míře retinol, obě látky pak podléhají dalším metabolickým drahám. V západních zemích činí příjem retinolu a retinyl esteru od 25% do 75% z celkového přijatého množství vitamínu A, přičemž zbývající část bývá poskytována z provitamínu A. ^{18, 19}

Vitamín A může být jako jeden z mála pro organismus toxický. Doporučené denní dávkování vitamínu je 1 mg. V případě těhotenství se dávkování nesmí překročit, jelikož hrozí malforace plodu. Delším užíváním vysokých množství vitamínu A může u dospělých

ho člověka dojít k bolestem kloubů, vypadávání vlasů, nevolnosti a v extrémních případech až ke smrti.

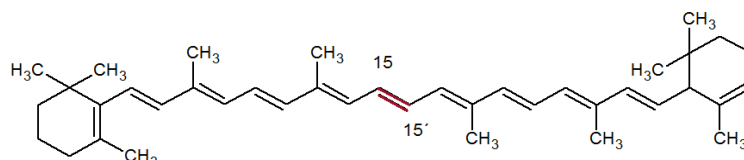
Naopak nedostatek vitamínu A představuje problém hlavně u dětí v zemích třetího světa. Podle výzkumu vědců z Indické rady lékařského výzkumu trpí akutním nedostatkem vitamínu A až 127 miliónů dětí předškolního věku v oblastech Afriky a jihovýchodní Asie.²¹ Kritický je rovněž nedostatek ve fázi embryonálního vývoje, nedostatek vede k nezvratným srdečním malformacím plodu,²⁰ nebo v pozdějších stádiích k nedostatečnému vyvinutí oka.²³ Dlouhodobý deficit u dospělých organismů, včetně člověka, může vést k celé řadě komplikací: deformacím páteře,²⁴ k těžšímu průběhu spalniček,²⁵ poruchám zraku, imunity a pod.

Intestinální absorpce se skládá z několika po sobě jdoucích kroků.

- Uvolnění karotenoidů z potravinové matrice.
- Solubilizace karotenoidů do smíšených lipidových micel v lumen.
- Buněčný záchyt karotenoidů střevními buňkami a buňkami sliznic.
- Začlenění karotenoidů do chylomikronů (CM).
- Sekrece karotenoidů a jejich metabolitů z CM do lymfy.¹

3.3.1.1. Intestinální absorpce provitamínu A

Obecně byl výchozí předpoklad, že absorpce karotenoidů do enterocytů v tenkém střevě probíhá pasivní difúzí. Účinnost absorpce karotenoidů však může klesat s jejich rostoucím přijatým množstvím. Navíc bylo prokázáno, že se může podílet také proces saturace a také účinnost absorpce závisí na typu epitelu. V roce 1930 Moore popsal, že ke štěpení beta-karotenu dochází právě v tenkém střevě.²⁶ Následně byl navržen mechanismus centrálního štěpení dvojné vazby na uhlících 15-15'.^{27, 28}

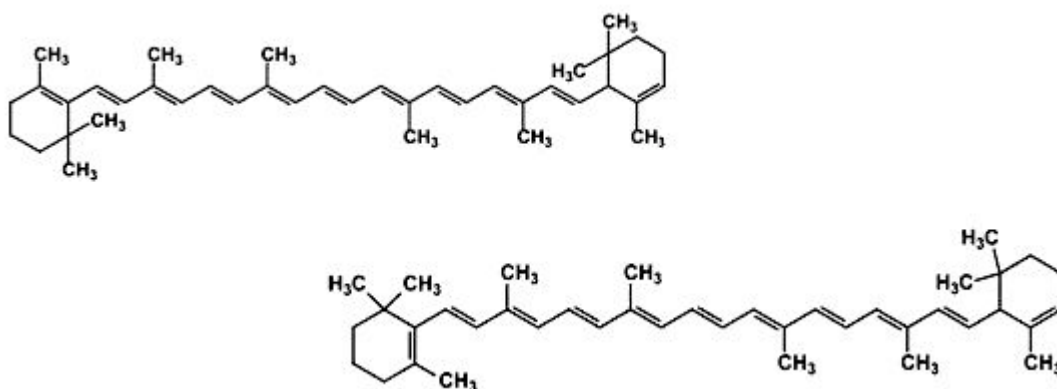


Obr. 5: Zvýrazněná dvojná vazba molekuly beta-karotenu, na které dochází ke centrálnímu štěpení

Upraveno podle²⁸

Štěpením potravou přijatých karotenoidů vzniká all-trans retinaldehyd. Ten ale může organismus získat i několika dalšími metabolickými drahami.

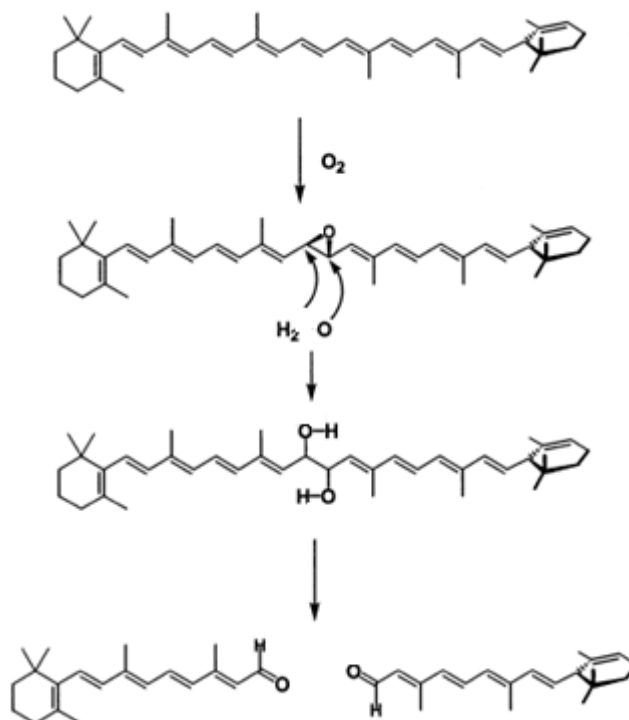
První možností vzniku retinalu je již zmiňované rozštěpení molekuly beta-karotenu.²⁸ Jedná se o majoritní zdroj retinoidů v organismu. Beta-karoten se vyskytuje v potravě rostlinného původu ve formě oranžového pigmentu. Molekuly alfa- a beta-karotenu se vzájemně liší izomerií na cyklu.



28

Obr. 6: vlevo alfa-karoten, vpravo beta-karoten

Existují dva způsoby štěpení isoprenového řetězce molekuly beta-karotenu. Centrální štěpení poskytuje z jedné molekuly provitamínu A dvě rovnocenné molekuly retinolu redukovaného následně na retinal. Jedná se o enzymaticky katalyzovaný proces pomocí již zmiňovaného enzymu 15-15' monooxygenasy (EC 1.13.11.21). I když ještě existují některé nejasnosti okolo mechanismu této reakce, obecně platí následující průběh: nejprve dochází k oxidaci dvojně vazby 15-15' na řetězci kyslíkem za vytvoření epoxidu. Tento epoxid je pak dále hydrolyzován a vytváří dvě hydroxylové skupiny ve středu struktury. Konečné štěpení nastane, když jsou tyto alkoholy redukovány na aldehydy za účasti NADH. Vzniká retinal, který je pak redukován na retinol pomocí enzymu retinoldehydrogenázy. Překvapivě je toto štěpení přísně stereoselektivní. Důvod této stereoselektivity bývá přičítán faktu, že dvojná vazba 15-15' je nejméně stericky bráněná v porovnání s ostatními vazbami. Jakákoliv odchylka není tolerována a molekula musí mít přísně all-trans uspořádání.²⁸

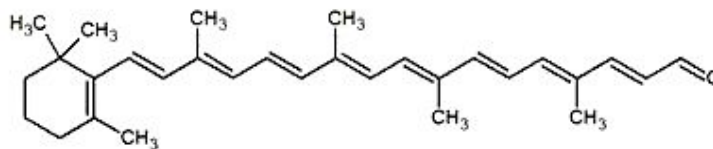


Obr 7: Centrální štěpení beta-karotenu

Upraveno podle ²⁸

V roce 1996 bylo objeveno excentrické štěpení. Tato reakce probíhá buď enzymaticky, jedná se však o rozdílné enzymy než u centrálního štěpení, nebo může docházet ke štěpení i bez pomoci enzymů. Enzymy, které se podílejí na této reakci jsou jiné, než je tomu u procesu centrálního štěpení, jedná se o 10-dioxygenázy. ²⁹ Navíc dokáží oproti 15-15' monooxygenázám excentricky rozštěpit i další karotenoidy jako je např.: lutein. Produkty těchto reakcí jsou beta-apokarotenaly a beta-apokarotenony. ³⁰

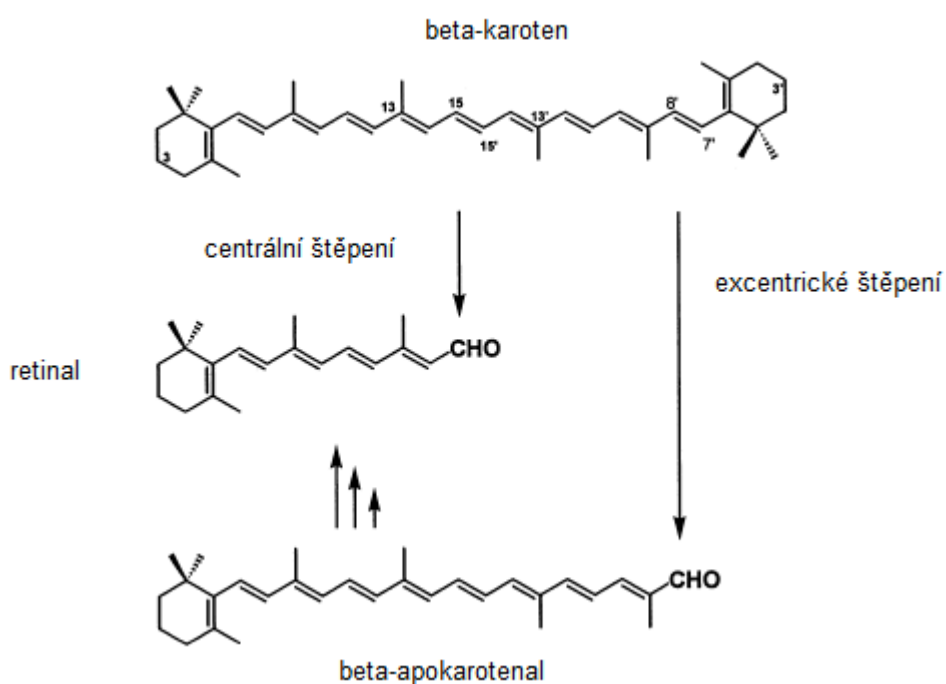
Vznikající molekuly se vzájemně mohou lišit délkou řetězce a mají schopnost aktivovat retinoidní receptory a vykazují tak rovněž biologickou aktivitu. Existence tohoto štěpení byla dlouho předmětem debaty, nicméně identifikace a charakterizace excentrického restričního enzymu z myši, který působí specificky na vazbu C9 a C10, poskytla důkaz o výskytu této dráhy u zvířat. Na základě pozorování bylo navrženo, že k excentrickému rozštěpení by mohlo docházet za oxidativních podmínek, tedy pokud je nedostatek antioxidantů. Naopak při normálních fyziologických podmínkách probíhá metabolismus štěpení centrálním způsobem.



28

Obr. 8: Beta-apokarotenal

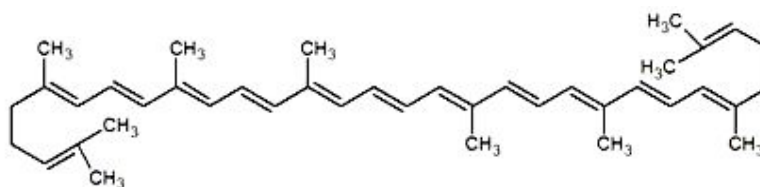
Molekula vzniklého beta-apokarotenalu pak podléhá transformaci na retinal.



Obr. 9: Schéma štěpení beta-karotenu po intestinální absorpci

Upraveno podle ²⁸

Beta-karoten lze přijímat v potravě nebo může být syntetizován z lykopenu. Lykopen je jedním z tzv. non-provitaminů A, jedná se o červený ve vodě nerozpustný pigment. ²⁷



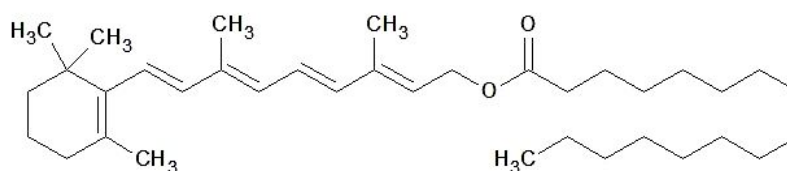
Obr. 10: Lycopene

3.3.1.2. Intestinální absorpce retinolu a retinyl-esterů

Jak již bylo uvedeno, jedním ze zdrojů retinoidů jsou retinyl-estery. Ty se vyskytují především ve stravě živočišného původu. Potravou získané retinyl estery jsou enzymaticky hydrolyzovány na retinol ještě před absorpcí do enterocytů. Reakci katalyzuje pankreatická triglyceridová lipáza a fosfolipáza B. Retinol je absorbován do erythrocytů pomocí procesu, který zajišťuje nasycený nosič. Jako tyto nosiče slouží vybrané vazebné proteiny. Rovněž se může po požití farmakologických dávek zapojit také proces nenasycené difúze.^{18, 19}

Značným farmakologickým účinkem molekuly retinolu je jeho antioxidační schopnost a dále pak působení jako antikarcinogenní agens.

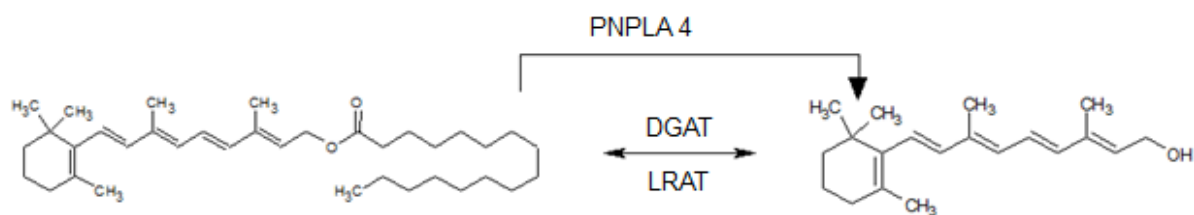
Jako příklad retinyl-esterů můžeme uvést retinylpalmitát. Tento fosfolipidový derivát se vyskytuje v několika strukturních variantách lišících se geometrickou izomerií na isoprenovém řetězci.¹



1

Obr. 11: All-trans- retinylpalmitát

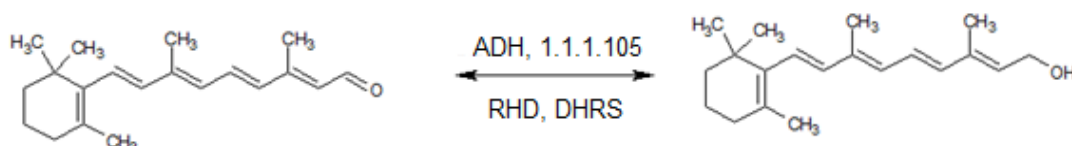
Obecně je molekula all-trans retinyl esteru metabolizována na all-trans retinol a to za účasti enzymů: DGAT a LRAT nebo PNPLA 4 (viz zkratky), kromě retinolu vzniká ještě voda a odštěpený řetězec mastné kyseliny.



Obr. 12: Hydrolýza retinylpalmitátu za vzniku retinolu

Upraveno podle ³¹

V těle savců bývá retinol produkován kromě hydrolýzy retinylesterů ještě redukcí retinalu. ¹



Obr. 13: Enzymatická redukce all-trans-retinalu za vzniku retinolu

Upraveno podle ³¹

3.3.2. Sekrece retinolu a retinyl esteru do lymfatického systému a cirkulace portálním oběhem

U erythrocytů je retinol vázán na konkrétní buněčné vazebné proteiny typu II (CRBP-II). Vyskytuje se především v tenkém střevě u absorpčních buněk a tvoří přibližně 1% proteinů ve sliznici. ³² Studie na CRBP-II myších ukázaly, že právě tento protein hraje zásadní roli v intestinální absorpci vitamínu A. ³³

Po absorpci do erythrocytů podstupuje většina retinolu reesterifikaci mastnými kyselinami. CRBP-II vázající retinol usnadňuje esterifikaci lecitem pomocí enzymu: retinolacyltransferázy (LRAT). ¹²⁶ Úlohou CRBP-II je rozpouštět hydrofobní retinol a chránit jej před degradací a hlavně protein nasměruje retinol na enzym LRAT k esterifikaci, což lze označit za jeho nejdůležitější funkci. ³⁴ Vytvořené retinyl estery bývají dále začleněny do chylomikronů (CM). ³

Velká část retinyl esterů vzniká díky inkorporaci do chylomikronů.³ Chylomikrony (CM) jsou komplexy tisíců molekul triacylglycerolů a fosfolipidů charakteristicky spojených dohromady spolu s karotenoidy, retinyl estery, retinolem, estery cholesterolů a několika specifickými apolipoproteiny. Tyto velké lipoproteinové částice (průměr 100 až 200 nm) jsou pak vylučovány z erythrocytů do stěvní lymfy.² I když je většina absorbovaného vitamínu vylučována ve formě chylomikronretinyl esterů do lymfy, velké množství se rovněž vylučuje do portálního oběhu jako retinol.^{18, 19} Portální absorpce probíhá především při patologických podmínkách, jenž ovlivňují sekreci CM.

3.3.3. Metabolismus retinolu v játrech

CM se po sekreci pohybují oběhovou soustavou, kde dochází k několika procesům jako je hydrolýza triacylglycerolů, a téměř všechny estery zůstávají během konverze stále v CM zbytcích.² Tyto CM zbytky jsou dále odstraňovány pomocí hepatocytů.³

V hepatocytech podléhají estery hydrolýze a vzniklý retinol může asociovat s retinolovým vazebným proteinem (RBP). Protein se nachází ve vysokých koncentracích v endoplasmatickém retikulu hepatocytu.³⁵ Vazba retinolu s RBP zřejmě způsobuje translokaci komplexu retinol-RBP z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu následovaný sekrecí do plasmy.³⁷ Velká část retinolu je transferována do jiného typu jaterních buněk, to jsou tzv. persinusoidální hvězdicovité buňky, kde se molekuly retinolu skladují.³

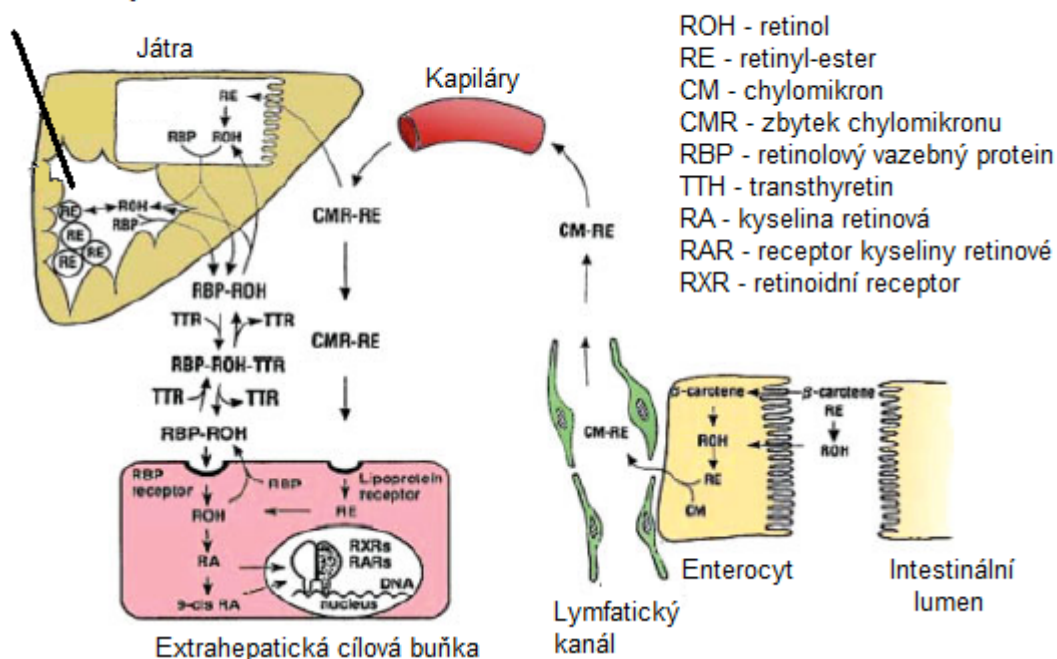
3.3.3.1. Hepatální skladování

V hvězdicovitých buňkách se retinol esterifikuje na retinyl ester a ukládá se ve formě lipidových kapek. CRBP-I (buněčný retinolový vazebný protein I, analog CRBP-II) a LRAT hrají klíčovou roli v zachycení esterů.^{34, 38} Buňky obsahují dostatečné zásoby na několik týdnů s postupným uvolňováním dle potřeby.²

3.3.3.2. Extrahepatální skladování

Ačkoli hvězdicovité buňky jsou hlavním místem skladování zásob retinyl esterů, k hromadění esterů může docházet i v intersticiálních buňkách a v buňkách některých dalších orgánů jako jsou ledviny, plíce, střevo atd.^{5, 39} Molekuly se akumulují ve formě lipidových kapiček zejména po požití velkých dávek vitamínu A. Obecně pak platí, že důležité pro esterifikaci jsou vazebné proteiny CRBP-I, CRBP-II, CRBP-III a enzymy LRAT a ARAT.¹

Persinusoidální
hvězdčovitě buňky



Obr. 14: Hlavní cesty transportu retinoidů v těle

Upraveno podle ¹

3.3.4. Transport retinoidů do plasmy

3.3.4.1. Retinolové vazebné proteiny

Přítomnost retinolových vazebných proteinů (RBP) v plasmě byla prokázána týmem Kanai a kol. v laboratoři Godmanna již v roce 1968. ⁴⁰ Plasmatická koncentrace komplexu retinol-RBP bývá udržována okolo 2 μM i přes denní výkyvy příjmu vitamínu A. Okolo 95% RBP obsažených v plasmě interaguje v poměru 1:1 s transthyretinem (TTR). ³⁶ RBP se skládá ze specializované hydrofobní kapsy, jejímž úkolem je chránit a vázat v tucích rozpustný retinol. ⁴¹ RBP řadíme do velké rodiny proteinů zahrnující řadu vazebných proteinů, které zajišťují vazbu i dalších lipofilních látek. ³⁵ Primárním místem syntézy RBP jsou z kvantitativního pohledu buňky parenchymu, ale syntézu jsou schopny provádět i další tkáně. ⁴²

Retinol se recykluje mezi plasmou, játry a extra-hepatálními tkáněmi. ⁴³ Proto se velká část retinolu převádí do plasmatu a menší část je převedena na aktivní metabolity, nebo podléhá degradaci.

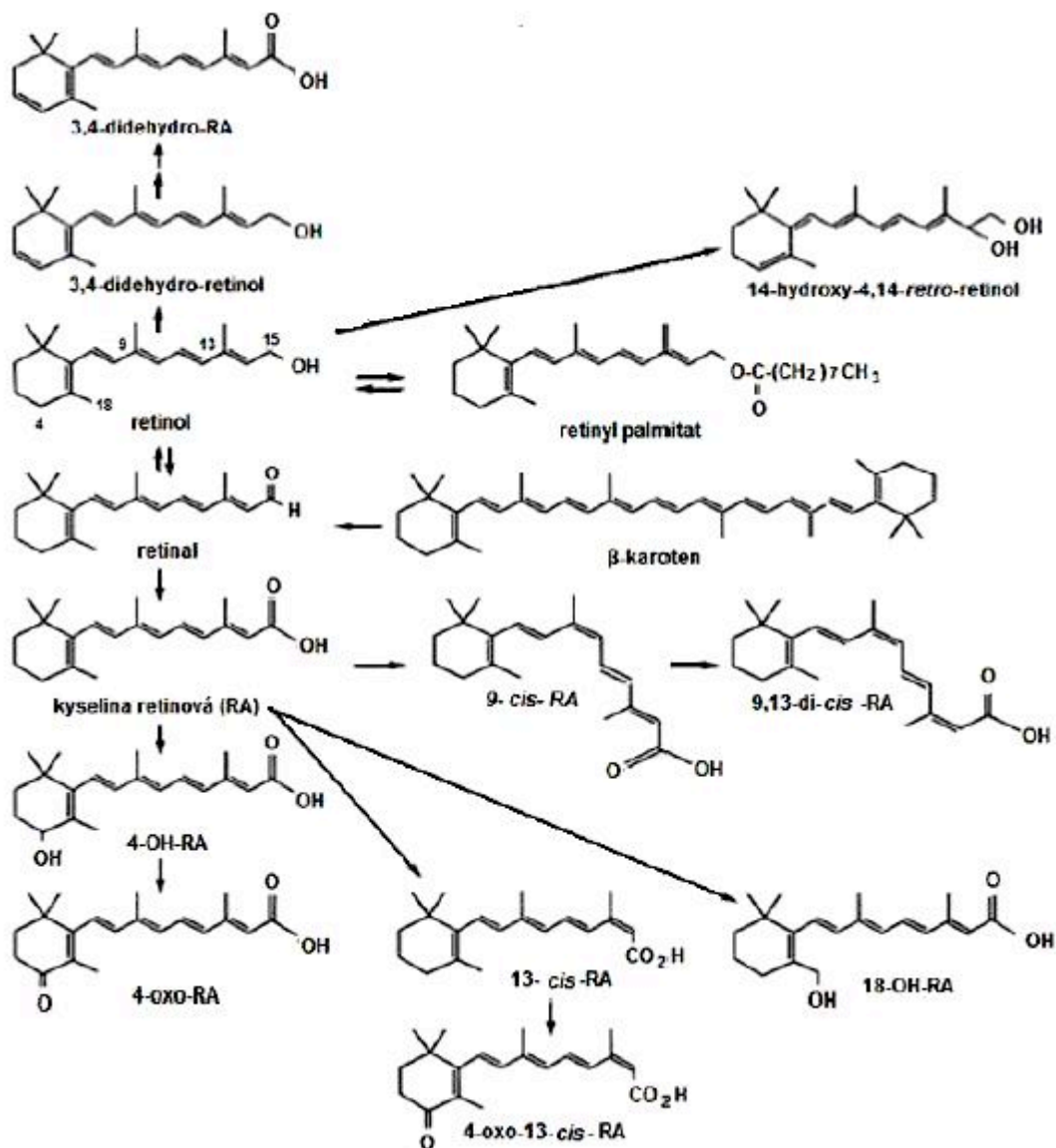
RBP hrají důležitou roli v mobilizaci retinolu v játrech a v záchytu retinolu oční sítnicí. Příjem retinolu ale nezprostředkovávají RBP u většiny ostatních tkání. Mechanismus není zcela znám, ale může zahrnovat pasivní difúzi.^{37, 44}

3.3.4.2. Transport dalších retinoidů do plasmy

Kromě retinolu jsou přítomny v plasmě také další formy retinoidů. Většinou je ale koncentrace v řádech nM. Vyskytují se například všechny formy kyseliny retinové (all-trans- i 13-cis-retinové), 13-cis-4oxo-retinové kyseliny, 4-oxo-retinové kyseliny a all-trans retinoylglukuronid.⁴⁵ S výjimkou posledního jsou všechny tyto formy přepravovány v komplexu s albuminem, na který se naváží. Lze předpokládat, že tyto metabolity mají své funkce. Úroveň transportu je ovlivněna množstvím přijatého vitamínu A.⁴⁶

3.3.5. Biosyntéza retinalu a kyseliny retinové

Pro biosyntézu obecně platí, že aktivní retinoidní metabolity jsou syntetizovány v cílových buňkách. Tyto aktivní metabolity jsou převážně získávány z all-trans- retinolu, který se vyskytuje v plasmě. Dále slouží jako zdroj lipoproteiny, které obsahují retinyl-estery lokálně uložené ve formě lipidových kapiček buď přímo v cílových buňkách nebo v buňkách, které se vyskytují v blízkosti cíle.¹



Obr 15: Metabolismus retinoidů

Upraveno podle ⁶

3.3.5.1. Biosyntéza kyseliny retinové

All-trans-retinoic acid (ATRA) patří mezi hlavní aktivní metabolity, např.: jako aktivátor transkripce. ATRA je v organismu obecně syntetizována z all-trans retinolu. Biosyntéza se skládá ze dvou kroků. První rychlost limitující krok je oxidace all-trans retinolu na all-trans retinal. Druhým krokem je pak oxidace all-trans retinalu na ATRA. Některé buňky vykazují dokonce schopnost katalýzy zpětné reakce na retinol. ^{1,6}

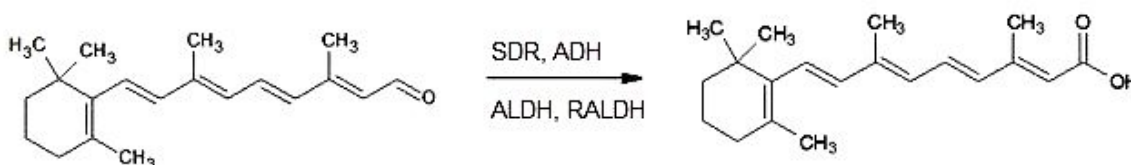
Oxidace all-trans retinolu na all-trans retinal

Reakci katalyzuje enzym ADH, tedy cytosolická alkoholdehydrogenáza se středně dlouhým řetězcem. Z experimentálně získaných dat vyplývá, že ADH1, ADH3 a ADH4 se podílejí na již zmiňované oxidaci.^{6, 31}

Druhým enzymem katalyzujícím reakci je SDR (na membránu vázaná reduktáza s krátkým řetězcem). Do této třídy na membránu vázaných enzymů patří ještě další z řady mikrosomálních enzymů, jako jsou RFH1, RDH5, RDH11, CRAD1, CRAD2, CRAD3 a SDR1.^{6,22, 23} Enzym SDR využívá trans-retinovou vazbu k navázání na CRPB-I jako substrát.^{6, 47}

Oxidace all-trans retinalu na ATRA

Tento krok katalyzují velmi podobné enzymy, jako tomu bylo u předcházející reakce. Je popsáno, že katalýzu provádějí retinaldehydrogenázy (RALDH1, někdy bývá nazývána jako ALDH1A1, ADH-1 a ALDH1).^{6, 48} Bylo také navrženo, že se tento enzym podílí na katabolismu procesů retinolu. Dalším typem retinaldehydrogenáz je enzym RADLH2, který bývá přítomen v různých typech buněk.^{6, 49} Další typy retinaldehydrogenáz, které se podílejí na těchto procesech, jsou RALDH3 a RALDH4. Poslední ze dvou zmíněných se zřejmě podílí na syntéze 9-cis retinové kyseliny, která vzniká oxidací 9-cis retinolu.^{6, 50}



Obr 16: Biosyntéza ATRA z all-trans retinalu

Upraveno podle³¹

3.3.5.2. Syntéza retinové kyseliny z karotenoidů

Jak již bylo zmíněno, syntéza probíhá štěpením molekul karotenoidů. Tento proces se uskutečňuje zejména ve střevech, játrech, plicích a to bez předchozí oxidace karotenoidů na retinol.⁵²

3.3.6. Buněčný katabolismus retinoidů

Katabolismus retinoidů má nenahraditelnou funkci v regulaci a kontrole hladiny kyseliny retinové v tkáních.⁵² Na degradaci se podílí CYP26A1, který je schopen odbourávat všechny formy retinoidů. V nejvyšších koncentracích se vyskytuje ve střevech, v dvanáctníku, v placentě a některých oblastech mozku. Proximální promotor oblasti genu CYP26A1 obsahuje funkční RARE (homodimerní komplex dvou receptorů RAR) a tudíž je jeho transkripce indukována pomocí kyseliny retinové. Takže gen CYP26A1 může kontrolovat koncentraci kyseliny retinové a regulovat oxidační metabolismus ATRA. Metabolizace probíhá za vzniku polárních molekul, konkrétně za vzniku kyseliny 4-hydroxy retinové, kyseliny 4-oxoretinové, kyseliny 18-hydroxyretinové, kyseliny 5,6-epoxy-retinové a kyseliny 5,8-epoxyretinové.^{6,55}

Další cytochrom P450, který ovlivňuje katabolismus retinoidů, se nazývá CYP26B1. Vyznačuje se jinou expresí než CYP26A1, ale katalytická aktivita je téměř stejná.^{6, 53, 54}

Daleko účinněji se na katabolismu kyseliny 9-cis-retinové podílí další z řady cytochromů CYP26C1, který není tak široce exprimován. Dokáže rozložit ATRA na polární ve vodě rozpustné metabolity, které jsou podobné těm vzniklým rozkladem CYP26A1 a CYP26B1. U dospělých organismů není ale CYP26C1 příliš rozšířený. Exprese všech výše zmíněných cytochromů se nepřekrývá, z čehož vyplývá, že každý z nich má svoji specifickou roli v katabolismu.^{6, 56}

Glukuronidy, jenž se vylučují do žluči a moči, mohou pravděpodobně vznikat rozkladem retinoidů, konkrétně retinolu a kyseliny retinové. Katabolismus probíhá pomocí dvou drah přes retinol a kyselinu retinovou.⁵⁷ Není ale přesně známo, jak velké jsou příspěvky jednotlivých způsobů katabolismu a jaké enzymy se přesně na procesu podílejí.

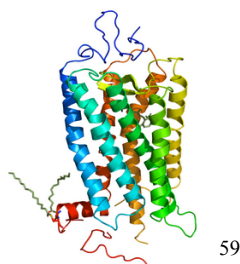
3.4. Vliv retinoidů na organismus

3.4.1. Proces vidění

Jak již bylo uvedeno, všechny retinoidy jsou citlivé na světlo. Do procesu vidění je zapojen retinal, který vykazuje schopnost izomerace v přítomnosti světla. Po absorpci světla dochází k přechodům z cis na trans geometrické izomery nebo naopak.⁵⁸

Právě tato schopnost umožňuje vidění. Pigment zodpovědný za absorpci světla se skládá z retinalu a prostetické skupiny kovalentně vázané na proteiny zvané opsiny. Opsiny jsou G proteiny vázané na trans-membránové receptory a škála jejich funkcí je velmi široká.

Jsou světlem poháněnými iontovými pumpami, mediátory fototaxe nebo fungují jako fotosenzory pigmentů. Bylo zjištěno, že opsin se vyskytuje také ve fotoreceptivních nevizuálních tkáních (např.: kůže obojživelníků). Důsledkem tohoto objevu je neformální rozdělení opsinu na „vizuální“ a „nevizuální“. V důsledku těchto poznatků bylo navrženo, že nevizuální opsin může fungovat při akutní regulaci dermální pigmentace a při generování jednotlivých izomerů iniciovaných světlem.⁵⁸

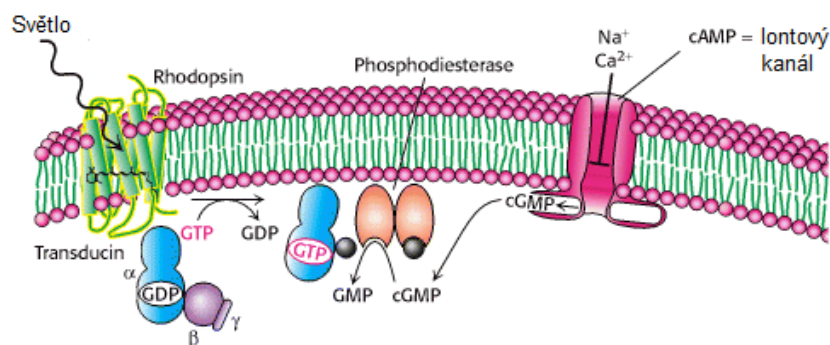


Obr. 17: Struktura opsinu

Fototransdukce je iniciována fotochemickou reakcí, kdy 11-cis retinal vázaný na opsin je izomerizován na all-trans retinal, zároveň dochází ke změně konformace opsinu. Následná obnova původní konformace proteinu vyžaduje přeměnu z all-trans retinalu zpět na 11-cis retinal.^{58, 59, 60}

Komplex trans-membránového proteinu, který se skládá z proteinové složky opsinu a retinalu nazýváme Rhodopsinem. Retinal je v cis konformaci pevně vázán na lysin řetězce opsinu. Ve chvíli dopadu a absorpce fotonu na komplex dojde k prudké změně konformace retinalu. 11-cis retinal se změní na all-trans-retinal a poté se uvolní do plasmu. Ve chvíli, kdy se změní konformace retinalu, je aktivován G protein transducin. Transducin posléze aktivuje cGMP fosfodiesterázu, která otevírá cyklus cGMP.^{58, 59, 60}

Pokud již není v tyčinkách dostatek cGMP, uzavřou se sodíkové iontové kanály a dochází k hyperpolarizaci membrány. Inhibují se tak synapse na tyčinkových buňkách a to vede následně k zastavení produkce neurotransmiterů. Nedostatek způsobuje depolarizaci membrány nervových buněk v sítnici a tím vznik akčního potenciálu v očním nervu. Poté putuje informace do mozku.^{58, 59, 60}



Obrázek 18: Fototransdukce

Upraveno podle ⁶⁰

Následuje zpětná reakce, kdy all-trans retinal mění svou konformaci zpět na 11-cis-retinal za účasti enzymu retinylizomerázy a zároveň se obnovuje komplex rodopsinu. Tento proces probíhá bez účasti fotonů, tedy světla. ⁶¹

3.4.2. Jaderné receptory

Fakt, že retinoidy vykazují biologickou aktivitu, je díky jejich schopnosti vázat se a aktivovat řadu odpovídajících jaderných receptorů.

V roce 1987 naklonovala skupina P. Chambon - R. M. Evans receptory zodpovědné za pozitivní odpovědi retinoidů. ¹ Tato rodina jaderných receptorů se skládá z transkripčních faktorů, závislých na ligandu. Regulace genové exprese probíhá pomocí vazby na DNA sekvenci v blízkosti cílových genů. ⁶²

Spolu s identifikací domén zodpovědných za navázání ligandu (DBD a LBD) a určením jejich krystalové struktury, došlo k vysvětlení molekulárního mechanismu retinoidních receptorů. ^{63, 64, 65}

Pokud mluvíme o retinoidních receptorech, máme na mysli proteiny, které se vyskytují v cytoplasmě nebo přímo v jádru buňky. Řadíme je mezi steroidní/thyroidní hormony. ^{6, 68,} ⁶⁹ Signál je zprostředkováván pomocí dvou rodin retinoidních receptorů: receptory kyseliny retinové (RAR- Retinoic acid receptor) a retinoidní X receptory (RXR- Retinoid X receptor), přičemž fungují jako heterodimery. ^{6, 67} Velmi rozdílná je už samotná primární struktura obou

receptorů. ⁶⁶ Oba tyto typy jaderných receptorů mají 3 podtypy α , β , γ , které kódují jednotlivé geny:

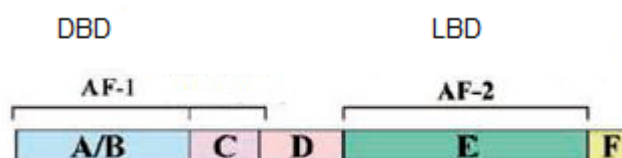
- $RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$
- $RXR\alpha$, $RXR\beta$, $RXR\gamma$ ^{6, 63}

Srovnání sekvence aminokyselin těchto tří podtypů receptorů odhalilo, že každý z nich má vlastní specifickou funkci. ⁶⁹ Exprese těchto šesti variací receptorů se značně liší mezi jednotlivými buňkami. ¹

RAR jsou aktivovány pomocí molekuly ATRA a jejích 9-cis izomerů, kyselina 13-cis retinová včetně jejích derivátů na RAR nepůsobí. Zatímco RXR bývají aktivovány pouze molekulami 9-cis retinové kyseliny. ^{6, 70}

Podobně jako ostatní hormonální receptory mají i RAR a RXR strukturu složenou z 6 konzervativních regionů, jenž jsou označeny písmeny A-F. ^{6, 71} V regionech můžeme nalézt 4 domény. Nejvíce konzervativní region C obsahuje DBD (DNA vázající doména), tato oblast poskytuje specifickou oblast pro rozpoznání specifických elementů. ⁶

Druhým nejvíce konzervativním regionem je část E. Funkčně se jedná o relativně složitý komplex, protože obsahuje dimerizační doménu a LBD (dimerizační doména vázající ligand). Další doména má transaktivační funkci a skládá se ze dvou subdomén. Jedna z nich (AF2) je závislá na navázaném ligandu a řadíme ji do regionu E, kdežto (AF1) na ligandu nezávisí a náleží k regionům A a B. Rotaci DBD připojenou na LBD umožňuje navázaný region D mezi DBD a LBD. Poslední region F nalezneme pouze u retinoidních X receptorů (RXR) ⁶



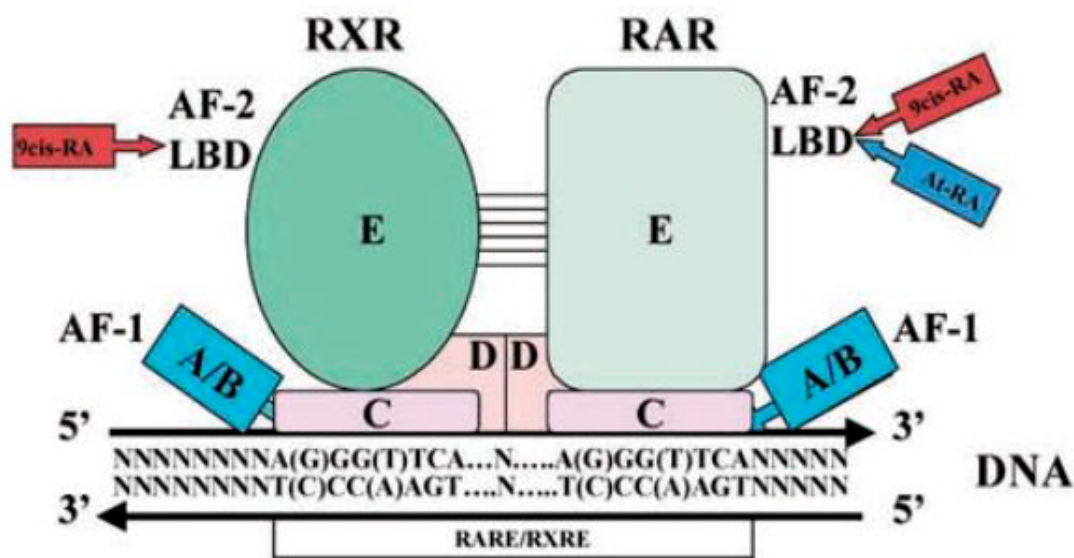
Obr. 19: Sekvence retinoidních receptorů

Upraveno podle ⁶

V odpovědi na vazbu retinoid-receptor dochází ke značným konformačním změnám a k přípravě specifických transkripčních sítí genů. Komplex způsobí lokální změnu konformace chromatinu anebo se zapojí do bazálního transkripčního mechanismu. Pak degradace RAR a RXR, řízená pomocí komplexů ubikvitin-proteazomy, reguluje trvání a velikost retinoidní odpovědi. Retinoidní receptory také mohou interagovat s dalšími signálními drahami pomocí fosforylace. Jedná se o děje, které kontrolují transkripci retinoidních cílových genů.^{6, 71}

Jak již bylo zmíněno, jaderné RAR fungují jako heterodimery. Tedy k efektivnějšímu navázání retinoidů na DNA je potřeba dimerizace struktury.^{6, 72} RAR jsou schopny dimerizace pouze s RXR. Jiná situace je u RXR receptorů, které ochotně tvoří různé heterodimery i s jinými receptory. Navíc RXR dokáží regulovat genovou expresi i ve formě homodimerního komplexu RXR-RXR. Vzniklé prvky bývají nazývány RAREs nebo RXREs (z angl. retinoid X response elements), ty se pak váží na promotory cílových genů.⁶

RAREs se skládají z opakující se konzervativní sekvence 5'-(A/G)G(G/T)TCA'-3', které oddělují 2 anebo 5 nukleotidů. Homodimery RXR-RXR jsou schopny vytvořit vazbu s promotorem, který obsahuje sekvenci RXREs. RXREs se skládají z repetice 5'-(A/G)G(G/T)TCA- 3', oddělují je pouze jednoduché páry bází.⁶ Vazbu umožňuje interakce mezi DBD vázaných na tyto prvky.⁷³



6

Obr. 20: Struktura retinoidních receptorů- Heterodimer RXR-RAR vázající se na DNA sekvenci RARE-RXRE je aktivován molekulami 9-cis retinové kyseliny a all-trans retinové kyseliny. Obě molekuly jsou navázány na LBD. Aktivace transkripce genu probíhá pomocí vazby DBD receptorů na sekvenci RARE-RXRE v promotoru.

Ze všech různých forem retinoidních receptorů se zdá RAR β jako vhodný supresor nádorového bujení. Jeho ztráta bývá spojena s progresí nádoru. Snížení jeho aktivity bylo již spojeno s výskytem několika nádorů, včetně plic, prsu, nádorů hlavy a krku, a cervikálních karcinomů.⁷⁴ Ztrátu exprese receptoru v nádorových buňkách nejspíše způsobuje umlčení (silencing) oblasti promotoru genu.^{6, 75} Na základě těchto poznatků bylo navrženo, že kombinace retinoidů selektivních k RAR β s látkami, které inhibují expresi tohoto receptoru, mohou vykazovat terapeutický potenciál.⁷⁶

V lidském organismu bylo zjištěno velké množství nekódujících RNA. Bylo také zjištěno, že značný počet nekódujících transkriptů je regulováno kyselinou retinovou a s největší pravděpodobností skrze RAR a RXR. Takže funkční role heterodimerů RAR-RXR může přesahovat regulaci transkripce genů.¹

3.4.3. Proteiny vázající retinoidy

Jak již bylo zmíněno, retinoidy jsou lipofilní a právě tato vlastnost je problémem pro jejich volný pohyb organismem.⁷⁷ Retinoidní molekuly se tedy mohou vyskytovat vázané na buněčné membrány nebo reagují *in vivo* s rozpustnými proteiny v extracelulárních prostorech.⁷⁸ Takovéto proteiny se vyskytují u všech obratlovců a jejich struktura je poměrně konzervativní.⁶ Proteiny se účastní zejména procesů transportu retinoidů. Kromě této obecné role mají ještě další specifické úkoly. Některé z těchto transportních proteinů vykazují schopnost izolovat ligandy a tím napomáhat k vytvoření koncentračního gradientu. Retinoidy tak mohou transportovat v energeticky nevhodných směrech. Dalším příkladem jsou proteiny, které chrání molekuly retinoidů před enzymy a regulují jejich metabolismus. Byly také objeveny proteiny, které se významně podílejí na transkripčních procesech, tím že transportují molekuly retinoidů k transkripčním faktorům.⁷⁸

Proteiny vázající retinoidy se vyskytují jak intracelulárně tak extracelulárně. Obecně je několik typů proteinů, které mají schopnost interagovat s různými formami a izomery retinoidních struktur.⁷⁸

All-trans retinol koluje v krvi navázaný v séru na retinolový vázebný protein (RBP). All-trans retinol a all-trans retinal asociují uvnitř buněk s buněčnými retinolovými vázebnými proteiny (CRBP). Ty se vyskytují ve dvou izoformách CRBP-I a CRBP-II. All-trans retinová kyselina se intracelulárně nachází navázaná na příslušné proteiny CRABP, tedy z angl. cellular retinoic acid binding protein. Ty mají opět dvě izoformy CRABP-I a CRABP-II.⁷⁸

Molekuly 11-cis retinalu a 11- cis retinolu, které se podílejí na procesu vidění, asociují pomocí proteinu CRALBP (z angl. cellular retinal-binding protein). Další z vázajících proteinů, který se vyskytuje v oční tkáni, je IRBP, tedy z angl. interphotoreceptor retinoid binding protein. Můžeme jej nalézt v extracelulárním prostoru, oddělující epitel pigmentu od fotoreceptorů buňky.

3.4.4. Role retinoidů v diferenciaci a karcinogenezi

Wolbach a Howe pozorovali u potkanů, kteří měli nedostatek vitamínu A, jasné změny v proliferaci a diferenciaci buněk. Bylo zjištěno, že nedostatek vitamínu způsobil selhání správné diferenciaci buněk kmenových buněk na zralé epiteliální buňky. Docházelo také k abnormální buněčné diferenciaci, která se vyznačovala nadměrným hromaděním keratinu.⁷⁹ Vzhledem k stále přibývajícím poznatkům ohledně působení retinoidů, našly tyto látky postupně praktické uplatnění v oblasti léčby rakoviny a rovněž v oblasti její prevence.

Mnohé studie prokázaly, že retinoidy vykazují schopnost potlačit proces karcinogeneze u experimentálních zvířat in vivo.^{80, 81, 82} Výsledky těchto experimentů tvoří základ pro dnešní experimenty zabývající se prevencí karcinogeneze za použití retinoidů. Schopnost molekul retinoidů potlačit rozvoj maligního fenotypu in vivo je základem předpokladu fungování v prevenci.^{83, 84, 85} V neposlední řadě bylo také prokázáno, že molekuly retinoidů mají značný vliv na buňky plně transformované, invazivní až nádorové, což může v některých případech vést až k potlačení proliferace,⁸³ nebo k terminální diferenciaci buněk. Výsledkem k druhé možnosti je non-neoplastický fenotyp.⁸⁶ Nicméně existuje řada typů nádorových buněk, na něž retinoidy nepůsobí.⁸¹

3.4.4.1. Vztah metabolismu retinoidů a rakovinového bujení

Jak syntéza tak metabolismus bioaktivních retinoidů může být narušena řadou faktorů. Tyto defekty jsou pak příznačné pro určité typy nádorových buněk.

Příkladem změn v metabolismu je mutace Stra6. Mutace Stra6 membránového receptoru, přes který prochází retinoidy do buňky, způsobuje celou řadu malformací jako jsou srdeční defekty, dysgeneze plic a mentální retardace.^{87, 88} Kromě Stra6 se podílí na příjmu retinoidů buňkami ještě enzym lecithin-retinol acyltransferáza (LRAT), který katalyzuje esterifikaci retinolu na retinyl estery. Důležitý enzym metabolismu retinoidů je již zmiňovaný RES, tedy z angl. retinyl ester hydrolases, který se vyskytuje ve střevním lumenu. Primárně je koncentrace retinoidů v buňkách regulována právě pomocí tří zmíněných proteinů Stra6, LRAT a

REH. Pokud dojde k defektu enzymů katalyzujících esterifikaci retinolu, sníží se i množství uloženého retinolu a retinyl esterů. Důsledkem pak je deficit vitamínu A vedoucí ke změnám diferenciaci a proliferaci.⁸⁹

Koncentrace těchto enzymů se liší v různých typech buněk a taky v různých fázích diferenciaci buněk. Úroveň biologicky aktivních retinoidů odpovídá i extracelulárním signálům. Různé typy rakoviny u lidí jsou spojeny s abnormálně nízkou hladinou retinyl esterů a sníženou expresí LRAT.⁹⁰

Enzym ze skupiny retinaldehyd dehydrogenáz (ADH) RDH10 metabolizuje oxidaci retinolu na retinal a představuje další kritický krok metabolismu retinoidů. Mutace RDH10 způsobila kraniofaciální syndrom končetin a další abnormality. Příčinou těchto poškození byl nedostatek kyseliny retinové v organismu myši.⁹¹ Pokud jsou enzymy ADH exprimovány na abnormálně nízké úrovni, může docházet u některých lidí k rakovinám prostaty a prsu, podobně jako u modelu myši.⁹²

Kyselina retinová je oxidována na polární metabolity jako je 4-oxo-retinová kyselina. Tyto produkty oxidace mohou aktivovat receptory RAR. Příkladem aktivujícího cytochromu je CYP26A1, CYP26B1 a CYP26C1. První ze tří jmenovaných bývá vysoce exprimován v případech primární rakoviny prsu a podporuje přežití buněk a tumorigenese.⁹³

3.4.4.2. Retinoidní signalizace, buněčný cyklus a apoptóza

Buněčný cyklus je řízen komplexem cyklin dependentních kináz (CDK) a cyklinů.⁹⁴ Rakovinové buňky vykazují schopnost akumulace mutací, které pak vedou k odchýlkám při proliferaci, nestabilitě DNA a nestabilitě chromosomů. Tyto aberance způsobuje nedokonalá regulace aktivity CDK.⁹⁵ Proto jsou cykliny, CDK a faktory regulující CDK hlavními cíly inhibice proliferace nádorových buněk.⁹⁶

Z provedených výzkumů jasně vyplývá, že retinoidy inhibují progresi buněčného cyklu ovlivněním různých signalizačních drah. Zároveň dochází k inhibici škály nádorových buněk buď přímo, nebo nepřímo modulací cyklinů, CDKs a inhibitorů buněčného cyklu.⁹⁷ Obecně lze říci, že kyselina retinová blokuje buněčný cyklus v G1 fázi.⁹⁸ K inhibičním účinkům kyseliny retinové na proliferaci buněk dojde, pokud je jeden z RAR, konkrétně RAR β ₂, indukován kyselinou retinovou.⁹⁹ Výsledky výzkumů prokázaly, že RAR β se receptory přímo regulují geny, které zprostředkovávají inhibici buněčného růstu. Dochází totiž k indukci některých inhibitorů cyklu jako jsou p21^{CIP1} a p21^{KIP1}.¹⁰⁰ Příkladem inhibice růstu nádorových

buněk kyselinou retinovou jsou lidské nádorové hepatální buňky a buňky nádoru prsu a teratokarcinomy u myši.^{98, 99} Míra exprese RAR β_2 je nepřímo úměrná stupni tumorigenese, je tedy příznačné, že v nádorových buňkách se ztrácí exprese RAR β_2 .^{100, 101}

Schopnost potlačení růstu nádorových buněk vykazuje i retinol, který dokáže potlačit proliferaci rakovinových buněk tlustého střeva přes mechanismus nezávislý na RAR.¹⁰²

Působení retinoidů na buněčný cyklus a apoptózu

Jak již bylo zmíněno, buněčný cyklus je regulován cykliny a CDK inhibitory. U savců můžeme nalézt dvě rodiny cyklinů, které jsou aktivovány během přechodu z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu, rodinu D a rodinu E. Právě rodina D, konkrétně D1, bývá nadměrně exprimována v některých typech rakoviny u lidí, jako jsou rakovina hlavy, krku, plic, prsu a žaludku.¹⁰³ Léčba pomocí retinoidů způsobí zvýšení procesu ubikvitinace a proteolýzy cyklinu D1 a snížení množství proteinů cyklinu D1.¹⁰⁴

Kromě regulace proteinů na úrovni cyklinů, dokáže kyselina retinová (ATRA i 9-cis) také zastavit buněčný cyklus zvýšením exprese a posttranslační stability inhibitorů CDK.^{105, 106} Při léčbě pomocí kyseliny retinové se zvedá hladina proteinu p27^{KIP1} v nádorových buňkách, čímž dochází v důsledku k zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu.¹⁰⁷

Retinoidy vykazují rovněž schopnost indukovat apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt. Při apoptóze nastává smrt buňky v důsledku sledů biochemických událostí vedoucích k pozměněné morfologii. Konkrétně molekuly retinoidů zahájí apoptózu buněk akutní promyelocytární leukémie (APL). Vazba kyseliny retinové na receptor RAR taky způsobuje apoptózu T buněk akutní lymfoblastické leukémie a myeloidní leukémie.^{100, 108}

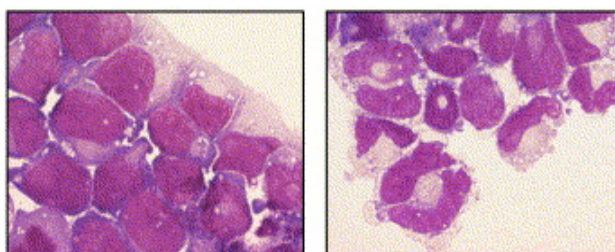
Zajímavé je, že k jinému typu buněčné smrti, tedy ne apoptóze, dochází při nedostatku retinolu. Tento proces probíhá při nadbytku aktivních forem kyslíku a za značného snížení hladiny ATP a NAD⁺. Proto je dostatečná hladina retinolu podmínkou, aby nedošlo k vyčerpání NAD⁺ a nežádoucí buněčné smrti. Tento typ smrti nevyžaduje působení molekul retinoidů na retinoidní receptory.¹⁰⁹

Využití derivátů retinoidů při léčbě APL

Maligní poškození buněk je spojováno se změnou nebo zrušením signálních drah, které jsou nepostradatelné pro udržení základních buněčných funkcí a ke kontrole buněčné smrti. Obnova normálního stavu signalizace pak vede k nucené selektivní smrti rakovinových buněk, které by již dávno podlehly apoptóze.¹⁰⁰

Jedním z takovýchto maligních onemocnění kostní tkáně je právě leukémie.⁶ Leukémii můžeme podle průběhu rozdělit na akutní a chronickou. Zatímco u akutní leukémie buňky ztrácí schopnost diferenciaci a vývoje, u chronické leukémie mohou buňky diferenciovat, ale je postižena apoptóza. Podle druhu postižených krvetvorných buněk lze leukémii rozdělit na lymfoblastickou a myeloidní.¹¹⁰

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nádorové onemocnění postihující buňky kostní dřeně. V těchto buňkách dochází k vývoji monocytů, granulocytů, erytrocytů a krevních destiček. Jako hlavní příznak této leukémie je selhání funkce buněk a jejich značný nedostatek.¹¹⁰ Akutní promyelocytární leukémie (APL) představuje specifický a poměrně vzácným subtyp AML. Značný podíl na vysokém procentu mortality této nemoci má koagulopatie. Příčinou vzniku je chromozomální přestavba, kterou způsobuje reciproká balancovaná translokace. K translokaci dochází vznikem dvou chromozomálních zlomů.⁶ První zlom narušuje gen odpovídající receptoru kyseliny retinové.¹¹¹, k druhému zlomu dochází na chromozomu fúzního partnera. Prozatím existuje šest různých fúzních partnerů,^{6, 113} přičemž nejčastějším bývá PML gen na chromozomu 15.^{6, 112}



114

Obr. 21: Buněčná linie NB4 (derivovaná z buněk APL) vlevo bez použití ATRA, vpravo aplikace 10 μM roztoku ATRA

Vyvolání samotného onemocnění způsobuje tvorba fúzního proteinu PML-RAR- α , protože blokuje dozrávání myeloidních buněk v promyelocytárním stádiu.^{100, 125} RAR α část komplexu vykazuje zvýšenou schopnost navázat se na transkripční represory N-CoR (z angl.

nuclear receptor co-repressor) a SMART (z angl. silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors). Důsledkem je post-transkripční umlčování cílových RAR genů, čímž se zastaví regulovaná tvorba myeloidních buněk (myelopoiesis) v promyelocytární fázi.¹¹⁵ Účinek ATRA na APL je díky uvolnění vazby mezi ko-represory a PML-RAR α fúzních proteinů a tím stimulace cílových genů, které obnoví myeloidní diferenciaci.¹¹⁶

Jak bylo mnohými studiemi prokázáno, retinoidy vykazují diferenciací a antiproliferační účinky na buňku. Proto se staly neodmyslitelnou složkou v diferenciací terapii při léčbě vybraných onkologických onemocnění.

Problémem obecné chemoterapie je její nespecificita a vysoký toxický účinek. Proto byl navržen postup diferenciací terapie. Zatímco normální buňky mají v rovnováze schopnost diferenciaci a proliferaci, u nádorových buněk značně klesá stupeň diferenciaci na úkor proliferaci, která probíhá velmi rychle. Diferenciací terapie je založena na faktu, že se stoupající mírou diferenciaci, klesá úroveň proliferaci.⁶

Sice se retinoidy omezeně používají při léčbě solidních nádorů, ale hlavním cílem diferenciací terapie pomocí retinoidů je akutní promyelocytární leukémie (APL). Jedná se o vůbec jednu z prvních cílených terapií svého druhu. Po zavedení léčby, využívající samotnou kyselinu retinovou, byla zaznamenána u pacientů vyšší remise.^{30, 111} Nicméně u pacientů, užívajících pouze ATRA došlo po čase k relapsu. Proto je dnes součástí běžné terapie APL konvenční chemoterapeutikum, většinou antracyklinového typu, v kombinaci s ATRA.^{6, 125}

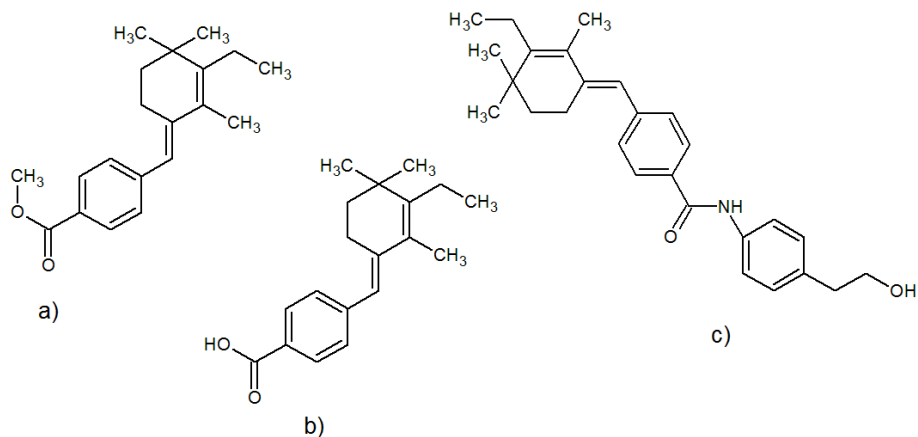
Nicméně ATRA, jako složka používané diferenciací terapie, vykazuje značnou toxicitu a existuje také možnost rezistence. V současné době probíhá celá řada studií, které se zabývají syntézou nových retinoidních derivátů, které by se uplatňovaly při terapii účinněji, nedocházelo by k rezistenci a zároveň by měly vykazovat nižší toxicitu.¹¹⁷

Příkladem takových nových derivátů jsou látky připravené týmem Schinke, Goel, Bhagat a kol. v roce 2010. Látky byly testovány na buňkách NB4, což je buněčná kultura AML, a na buněčných kulturách, vykazujících rezistenci na ATRA (NB4.007/6 a NB4.306).¹¹⁷ Připravené látky obsahovaly modifikovaný izoprenový řetězec a funkčními skupinami byly :

- ester (a),
- neporušená karboxylová skupina (b),

- aromatický amid (c).¹¹⁷

Ačkoli se v nových látkách vyskytovaly motivy retinoidů, sloučeniny nevykazovaly významnější aktivitu.¹¹⁷

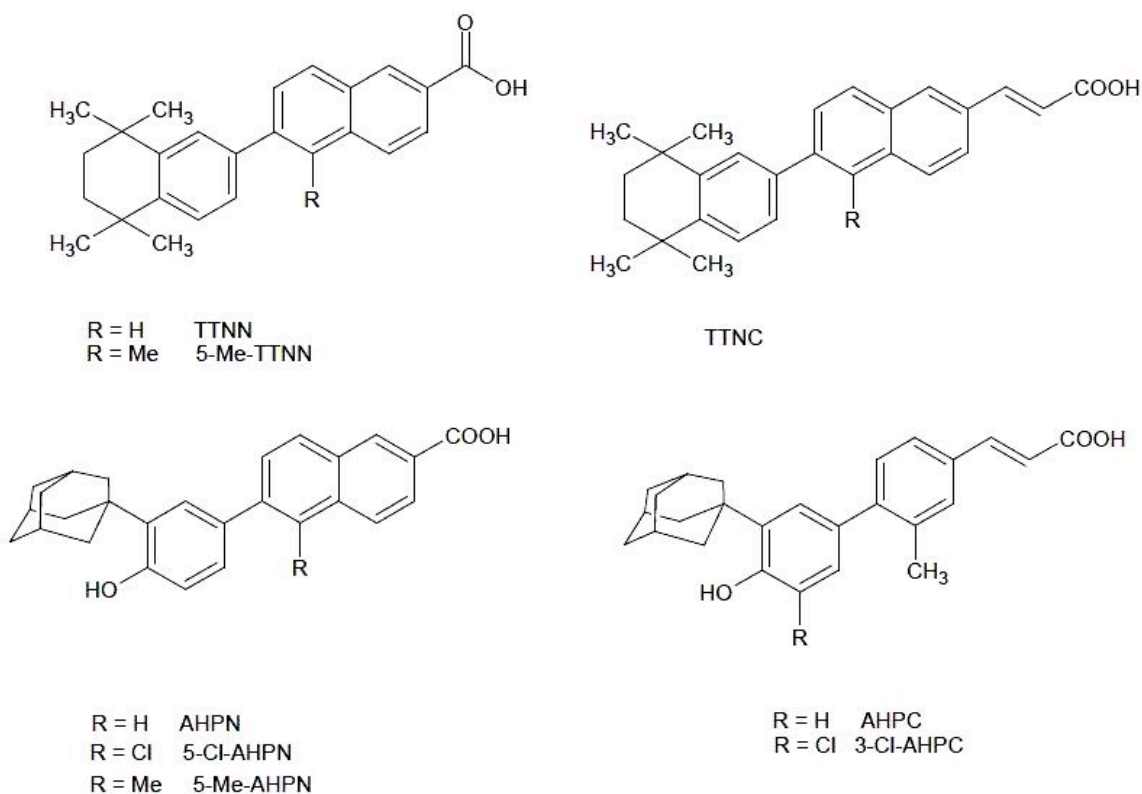


117

Obr. 22: Příklad nových účinných syntetických retinoidů

Mimo to je již dnes připravena celá škála nových retinoidů. Zatímco některé jsou strukturně velmi podobné původním přirozeným molekulám. Jiné naopak zahrnují pouze vybrané strukturní motivy. Vybrané z těchto látek vykazují i požadované parametry biologické aktivity. Příkladem je TTNN, TTNC, AHPN a AHPC spolu se svými strukturními analogy.

118



118

Obr. 23: Biologicky účinné syntetické deriváty retinoidů

Nicméně poměrně málo byly prozkoumány molekuly, které by obsahovaly karboxylovou skupinu spolu s další skupinou funkčních derivátů karboxylových kyselin. Naším cílem se tedy staly látky odvozené od 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny. Konkrétně jsme se zaměřili na amidy a estery této dikyseliny.

3.4.4.3. Příklady metod testující biologickou aktivitu retinoidů

Metody transformace savčích buněk

V experimentech, ve kterých dochází k cílené změně exprese proteinů, se využívá transfekce cizorodou DNA nebo RNA. Transfekce je proces, kdy je hostitelská buňka infikována nukleovou kyselinou. Existují tři možnosti, jak cizorodou DNA nebo RNA do buňky vpravit. První možností je využití endocytózy, kdy dochází k pohlcení komplexu DNA-lipid nebo DNA-polymer. Druhou možností je elektroporace. Třetí a zároveň nejefektivnější způsob je pomocí virového vektoru.

Transientní transfekce plasmidovou DNA představuje možnost, jak sledovat aktivaci jaderných receptorů působením různých látek. Plasmidová DNA obsahuje gen, jehož součástí je sekvence DNA komplementární k vazebnému místu sledovaného receptoru, tzv. promotor. Účinnost promotoru může být zvýšena opakováním vazebné sekvence. Po aktivování receptoru ligandem dochází k jeho navázání na promotorový úsek a ke spuštění transkripce. V případě použití známého ligandu lze sledovat aktivační popřípadě inhibiční schopnosti látek na transkripční aktivitu sledovaného jaderného receptoru.

Monitorovaným receptorem, v rámci sledování biologické aktivity retinoidů, je retinoidní receptor RAR. Plasmidová DNA, kterou vnášíme do buněk, obsahuje vazebné místo pro RAR jako opakování specifické sekvence DNA, na kterou se váže retinoidní receptor, který v našem případě moduluje expresi luciferasy.

Stanovení bílkovin metodou BCA

Metoda stanovení využívající sodné soli BCA (z angl. bicinchonic acid) se zakládá na barevné reakci. Sodné soli BCA barevně komplexují s Cu^{1+} za vzniku barevných komplexů. Cu^{1+} vznikají z Cu^{2+} po interakci s peptidovou vazbou. Vzniklé purpurové zabarvení je přímoúměrné obsahu bílkovin v buňkách a je možné jej měřit spektrofotometricky při 562 nm. Citlivost této metody je od 0,5 mg/ml. Metodu lze aplikovat: pro studium protein-proteinových interakcí, k měření frakcí po afinitní chromatografii, odhad procentuálního obsahu membránových proteinů z buněčných extraktů a ke screeningu fúzních proteinů.¹³⁰

Stanovení toxicity látek metodou MTT

Test MTT je kolorimetrické stanovení pro měření aktivity buněčných enzymů - dehydrogenáz. Dehydrogenázy se účastní mnoha metabolických pochodů v buňce a jejich celková aktivita je považována za ukazatel životaschopnosti buněk. V případě MTT dehydrogenázy redukují žlutý 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid na fialový formazan. Krystalky formazanu se rozpustí po přidavku DMSO, případně směsi DMSO/ NH_3 . Míra zabarvení se měří spektrofotometricky při 540 nm a je přímo úměrná obsahu živých buněk.

3.5. Syntetické metody přípravy jednotlivých retinoidů

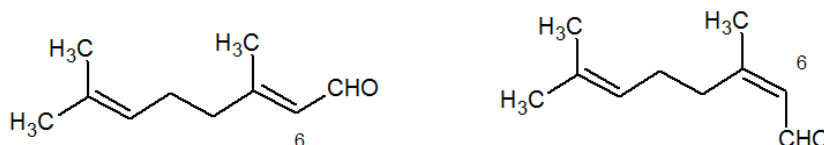
Tato kapitola pojednává o jednotlivých krocích, vedoucích k přípravě kyseliny retinové. S ohledem na konfiguraci molekul retinoidů a jejich biologickou aktivitu musí veškeré syntetické přístupy splňovat požadavky na stereochemii. Jen vysoce regioselektivním přístupem lze potom získat požadovaný izomer. Příprava konjugovaných dienů a trienů pomocí

různých syntetických přístupů je dnes dobře známa a popsána. Za posledních dvacet let byl kladen důraz na nový všestranný a efektivní přístup syntézy vyšších nenasycených E/Z polyolefinů, zejména ekonomicky důležitých retinoidů a karotenoidů.

3.5.1. Prekurzory syntézy kyseliny retinové

Citral (lemonal), tedy 3,7-dimethylocta-2,6-dienal, je hlavní složkou oleje z voňatky citrónové (angl. *lemon grass*). Citral se v oleji vyskytuje jako směs dvou geometrických izomerů: geranial (6E) a neral (6Z), kromě voňatky jej můžeme nalézt i v dalších rostlinách (myrta, meduňka, citronelová tráva) či citrusových plodech.¹¹⁹

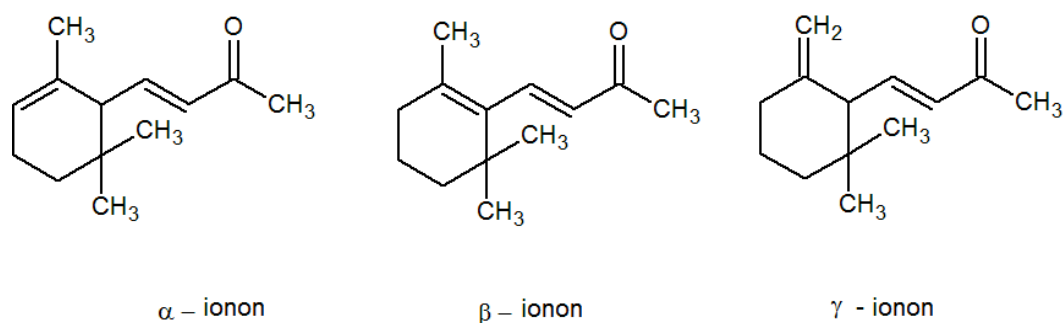
Geranial má intenzivní citrónovou vůni, neral voní méně intenzivněji a více sladce. Díky těmto vlastnostem našel široké uplatnění jako vonný olej v parfumerii. Dále se využívá také jako složka v ochucovadlech, má značné antimikrobiální vlastnosti a ferohormonální účinky na hmyz.¹¹⁹



Obr. 24: Oba geometrické izomery citralu, vlevo geranial (6E), vpravo neral (6Z)

Upraveno podle¹²⁰

Citral také slouží jako výchozí látka pro přípravu důležitých iononů. Ionony jsou skupinou látek, které patří mezi vonné silice, a proto jsou součástí mnoha vonných olejů (např.: růžový olej). Z těchto vlastností i vyplývá jejich využití v parfumerii.¹¹⁹ Ionony se vyskytují ve třech formách: α -ionon, β -ionon, γ -ionon.¹²¹ Kombinace α -iononu a β -iononu charakteristicky voní po fiáčkách.¹¹⁹

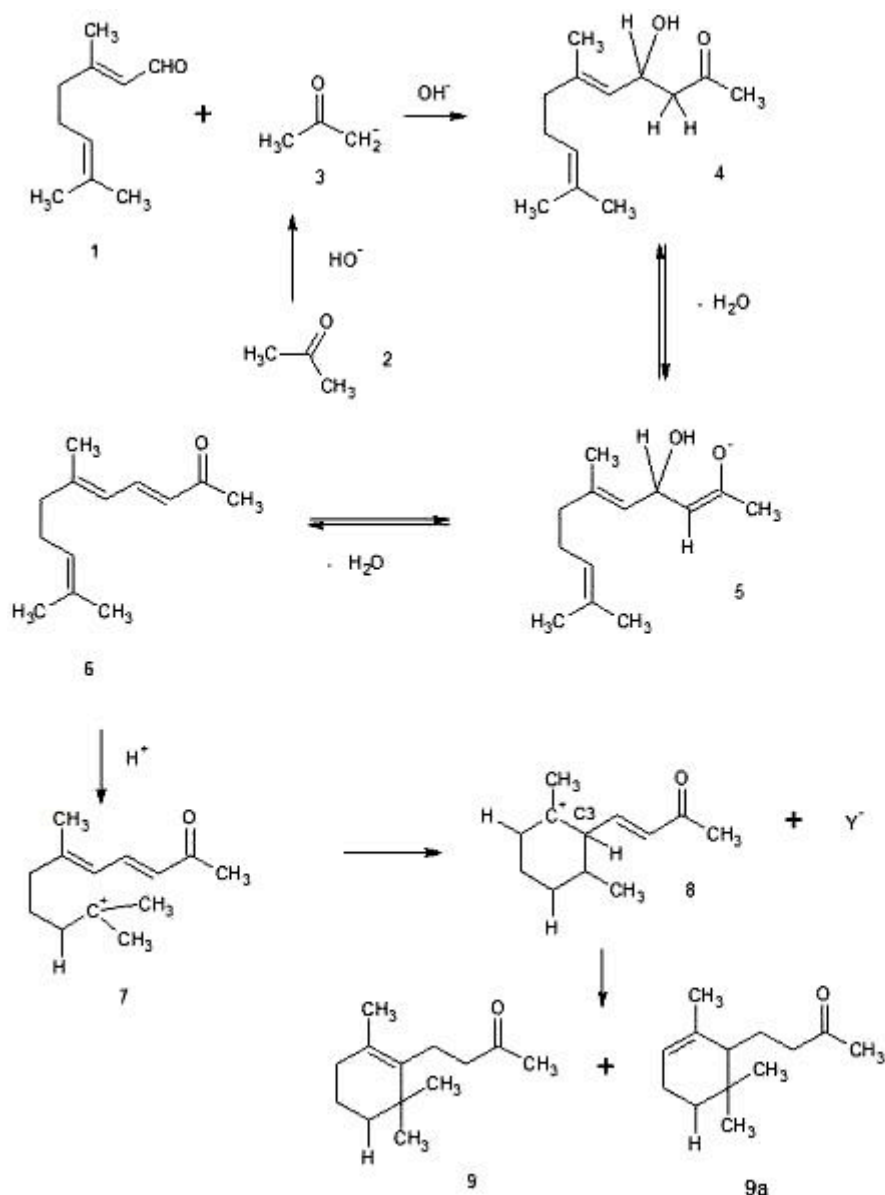


Obr. 25: Struktury iononů

Upraveno podle ¹²¹

Molekuly karotenoidů (α -karotenu, β -karotenu, γ -karotenu) obsahují ve své struktuře motiv β -iononu. Právě karotenoidy slouží jako prekurzory biosyntézy α - a β - iononů pomocí nesymetrického štěpení. Jak již bylo zmiňováno v kapitole 3.3.5.2 (Syntéza kyseliny retinové z karotenoidů), dalším produktem tohoto štěpení je 10'-apo - β -10'- karotenal, který je dále buď transformován na retinal (Obr. 9: Schéma štěpení beta-karotenu po intestinální absorpci), nebo za pomoci identického enzymu, jako v prvním kroku, tedy karotenoid 10'-dioxygenázy se dále štěpí na dvě molekuly β -iononu a C14-dialdehydu. Toto štěpení probíhá ve střevech. ²⁸

Organická syntéza iononů se zakládá na reakci citralu (1) a acetonu (2) s oxidem vápenatým za bazické katalýzy. Jedná se o aldolovou kondenzaci s následným přesmykem. Karbaniont acetonu (3) se nukleofilně aduje na karbonylovou skupinu citralu. Následně dochází k eliminaci vody z meziprojektu (4) za vzniku enolátového iontu (5) a následně pseudoiononu (6). Tento pseudoionon bývá také nazýván jako ψ -ionon. ¹²⁰ Reakce uzavírání cyklu probíhá za kyselých katalýzy, kde vzniká z dvojné vazby (6) příslušný karbaokationt (7). Následuje pak krok uzavírání kruhu (9), prostřednictvím akceptoru proběhne dehydrogenace na třetím uhlíku (C3) a vznikají α - (9a) a β -ionon (9) s konjugovným systémem dvojných vazeb. ¹²¹

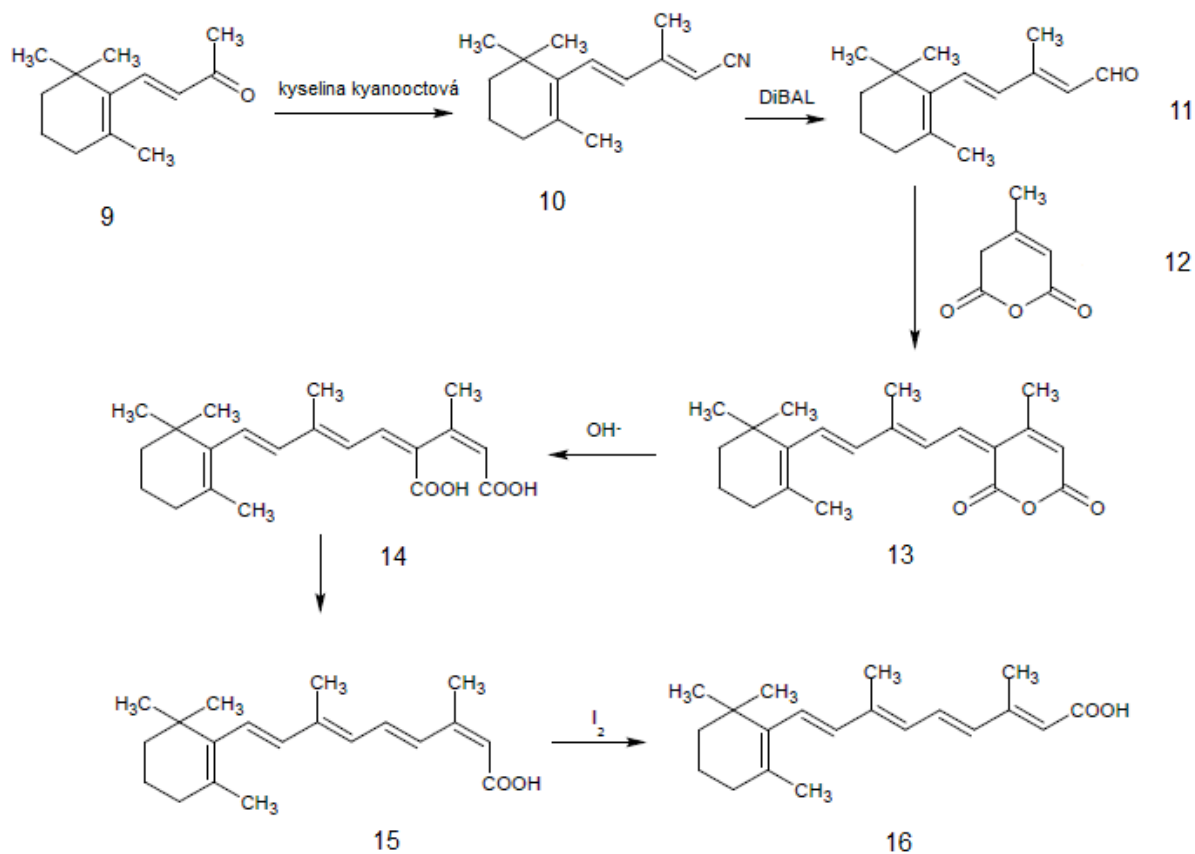


Obr. 26: Syntéza ψ -iononu (6) z citralu (1) a acetonu za bazické katalýzy (reakce 1-6) a následná syntéza α - a β -iononů (9a, 9) z ψ -iononu (6) za kyselé katalýzy (reakce 6-10)

Upraveno podle ¹²¹

3.5.2. Syntéza kyseliny all-trans-retinové

Metodika přímé syntézy je známa již řadu let a dnes se jednotlivé postupy používají i v průmyslové výrobě.



Obr. 27: Syntéza all-trans-retinové kyseliny

Upraveno podle ¹²²

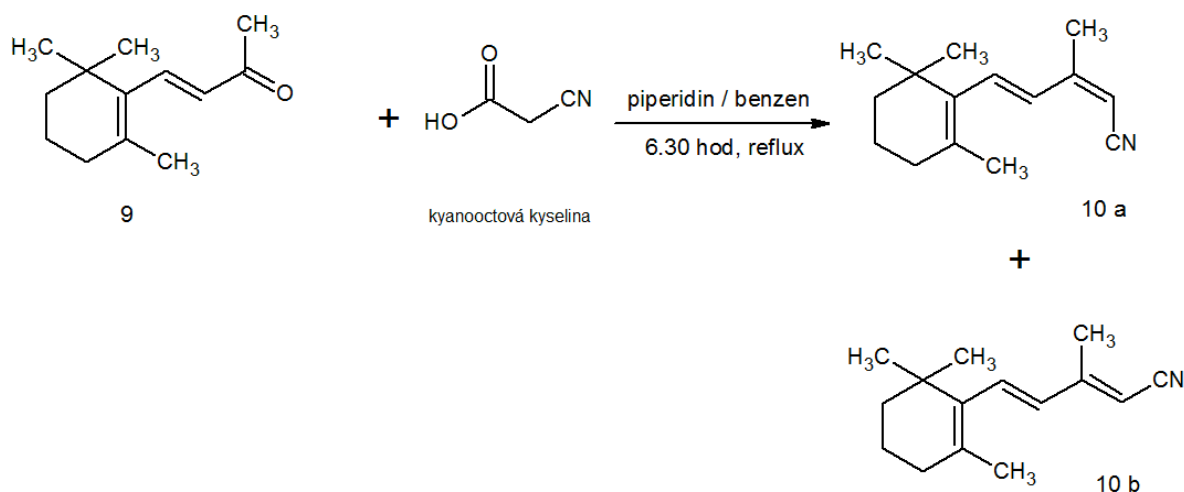
Jedná se o přímou syntézu, která se skládá z pěti oddělených kroků. Východí látkou je β -ionon (9), z něhož kondenzací s kyanooctovou kyselinou vzniká příslušný (2E,4E)/(2Z,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyklohex-1-en-1-yl)penta-2,4-dienitril (10). Po přečištění je nitril (10) redukován pomocí DiBAL-H na (β -ioniliden)acetaldehyd (11). Po opětovné purifikaci je provedena aldolová kondenzace s molekuou anhydridu β -methylglutakonové kyseliny (12). V bazickém prostředí se cyklus molekuly anhydridu (13) otevírá za vzniku 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14). Následně dojde k eliminaci karboxylové skupiny na C12 a vzniká molekula 13-cis-retinové kyseliny (15). Jak již bylo uváděno, retinoidy jsou citlivé na světlo a při kontaktu s ním může docházet ke změně geometrické izomerie. All-trans-retinovou kyselinu (16) pak připravíme, pokud látku 15 ponecháme ve tmě, za přítomnosti jódu. ¹²²

3.5.2.1. Syntéza nitrilu

Od roku 1990 byla vydána řada postupů syntézy využívajících (β -ioniliden)acetaldehyd (Obr. 29, struktura (11)) jako výhodný intermediát syntézy retinoidů.

Tento fakt můžeme přičítat skutečnosti, že aldehyd (11) s C15 lze syntetizovat několika způsoby z β -iononu (9), jenž je poměrně levnou výchozí surovinou.¹²⁰

Jednou z mnoha možných cest, kterou lze použít, je Knoevenagelova kondenzace β -iononu (9) a kyanooctové kyseliny v prostředí piperidinu a benzenu za použití Dean-Starkovy aparatury. Během reakce nejprve vzniká odštěpením protonu karboaniont kyseliny kyanooctové a ten se následně aduje na karbonylový uhlík β -iononu za současného odštěpení vody. Výtěžky připraveného (2E,4E)/(2Z,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyklohex-1-en-1-yl)penta-2,4-dienitrilu (10) dosahují až 82%. Kondenzací vzniká směs geometrických izomerů 9Z (10a) a 9E (10b). Poměr obou izomerů (9E)/(9Z) ve směsi se pak pohybuje v rozmezí 95:5 až 98:2. Prostředí piperidinu a benzenu jako rozpouštědla je zřejmě nezbytné pro dosažení výsledného zastoupení produktů. Pokud by byla použita jiná rozpouštědla, zvýšilo by se pravděpodobně zastoupení Z izomeru ve směsi.¹²⁰

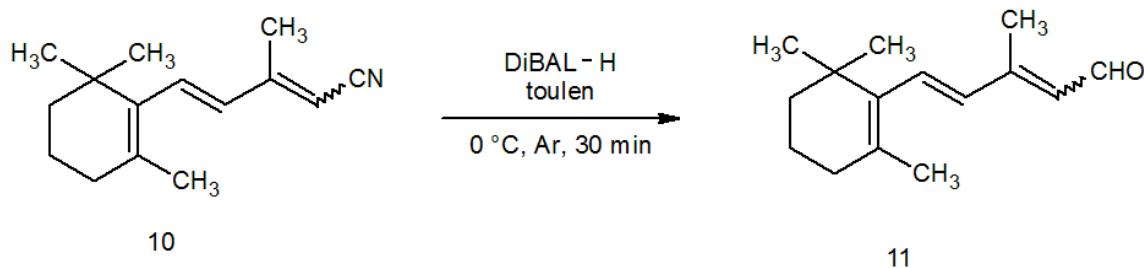


Obr. 28: Syntéza nitrilu Knoevenagelovou kondenzací

Upraveno podle¹²⁰

3.5.2.2. Syntéza (β -ioniliden)acetaldehydu

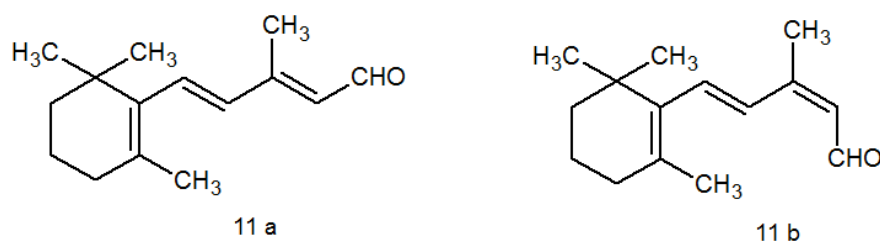
Druhým krokem v syntéze kyseliny retinové je redukce nitrilu (10) za vzniku (β -ioniliden)acetaldehydu (11). K redukci se používá DiBAL-H, tedy diisobuthylaluminium hydrid. Nutná je přítomnost inertní Ar atmosféry, reakce probíhá při 0 °C v bezvodém toluenu. Po rozložení nadbytečného DiBAL-H je potřeba produkt přečistit na sloupcové chromatografii (CC).¹²⁰ Po přečištění byl vyizolován produkt ve formě tmavé žluté olejovité kapaliny.



Obr. 29: Redukce nitrilu (10) za vzniku (β -ioniliden)acetaldehydu (11)

Upraveno podle ¹²⁰

Výtěžky reakce se v publikaci pohybovaly okolo 82% a vzniklý (β -ioniliden)acetaldehyd (11) byl směs geometrických izomerů v poměru (9E)/(9Z) 95:5 - 98:2.
120



Obr. 30: Geometrické izomery (β -ioniliden)acetaldehydu, izomer (9E): struktura 11a, izomer (9Z): struktura 11b

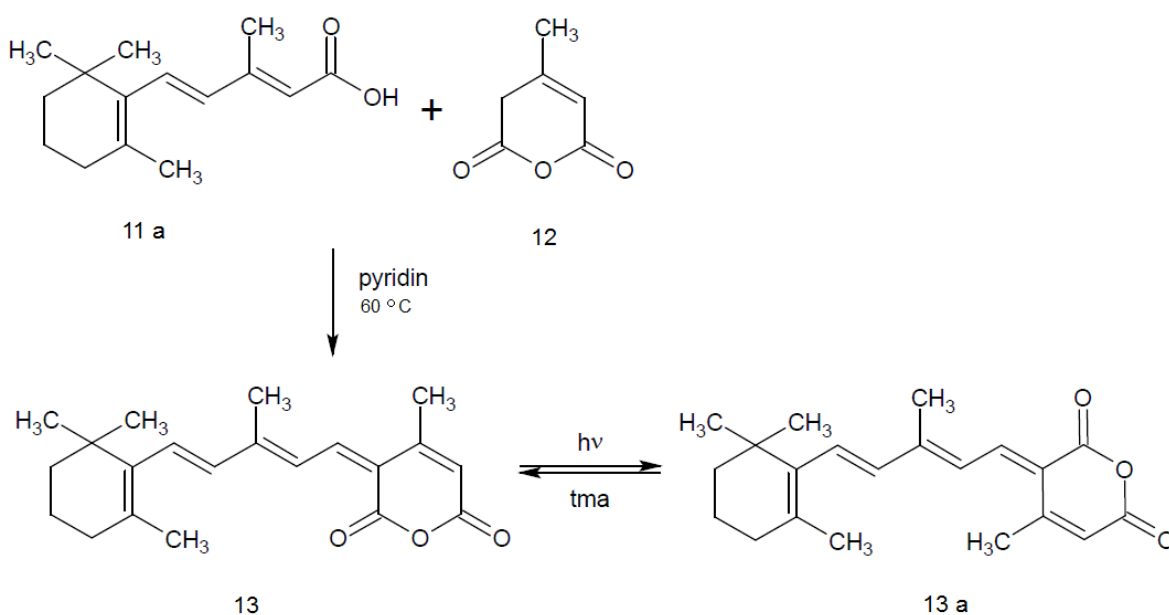
Upraveno podle ¹²⁰

3.5.2.3. Syntéza anhydridu 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny

Následuje třetí krok syntézy a to příprava anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13). Jedná se o kondenzaci (β -ioniliden)acetaldehydu (11) s anhydridem β -methylglutakonové kyseliny (12). Pro reakci je důležitá katalýza pyridinem a dochází k ní již za laboratorní teploty. Produkt má po izolaci formu tmavé červené látky s konzistencí gumy. Zahřátím na 60 °C s hexanem a následným odpařením je produkt (11) vyloučen jako rudé jehličkovité krystaly. ¹²²

Stejně jako všechny retinoly popisované v této práci, i tento retinoid vykazuje fotosenzibilitu. Lze předpokládat, že jestliže by byl do reakce použit pouze trans-(β -

ioniliden)acetaldehyd (11a) a jestliže by byla omezena i expozice světla, vznikl by převážně anhydrid 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (13). Pokud ale byl produkt dlouhodobě vystaven světlu, fotony pak mohou způsobit změnu geometrické izomerie na vazbě mezi C11 a C12 a dojde k vytvoření anhydridu 11-cis-13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (13a). Nicméně po odstranění zdroje fotonů by měla nastat rychlá konverze izomerie dvojných vazeb do původního uspořádání.¹²²

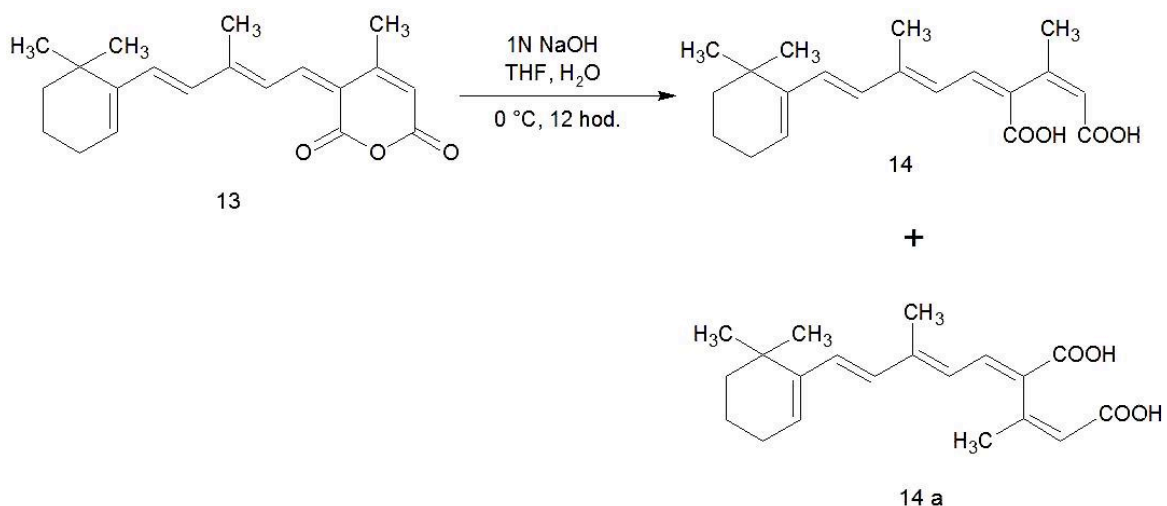


Obr. 31: Syntéza anhydridu 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny

Upraveno podle¹²²

3.5.2.4. Syntéza 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny

Čtvrtým, v praxi běžně používaným, krokem přímé syntézy je alkalická hydrolyza anhydridu 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (13) za vzniku 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14). Reakce se provádí za chladu pomocí 1 mol roztoku NaOH ve směsi rozpouštědel: THF a vody. Výtěžky se dle publikace pohybují okolo 83% a HPLC analýza methylovaných produktů stanovila zastoupení 85% dimethylesteru 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny, 8% dimethylesteru 11-cis-13-cis-12-karboxyretinové kyseliny, zbytek byly neznámé látky. Z těchto poznatků vyplývá, že během hydrolyzy vzniká i určité množství 11-cis-13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14a).¹²²



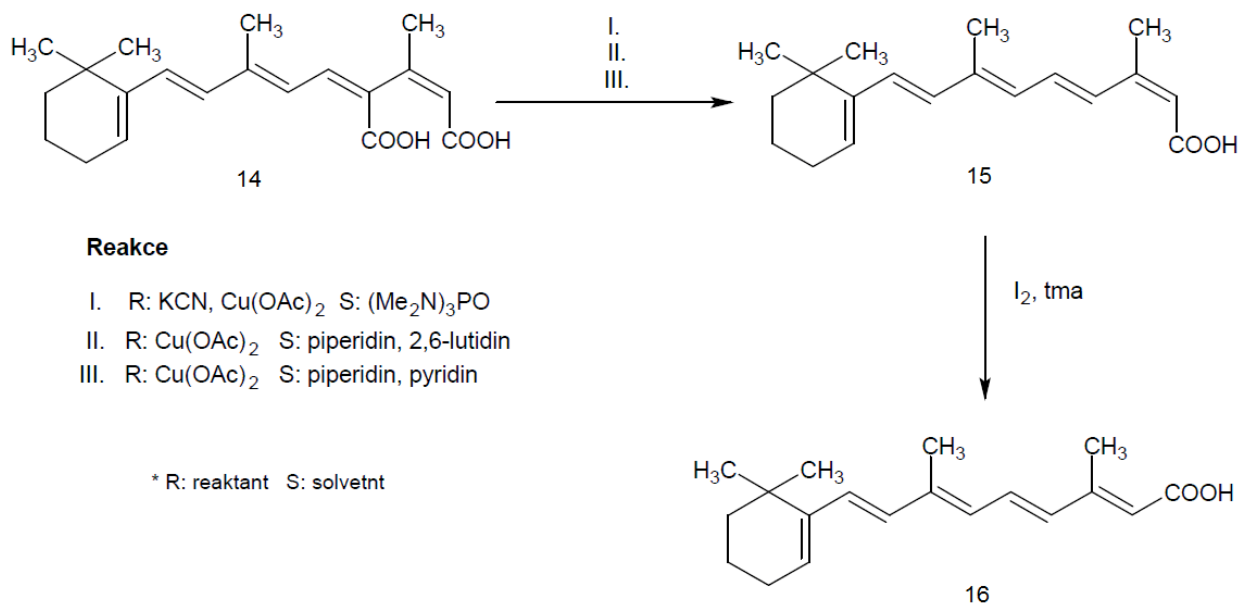
Obr. 32: Alkalická hydrolyzá anhydridu 13-cis-karboxyretinové kyseliny

Upraveno podle ¹²²

3.5.2.5. Syntéza 13-cis-12-retinové kyseliny, následná konverze na all-trans retinovou kyselinu

Pokud je požadovaným produktem syntézy ATRA, následuje krok odstraňující karboxylovou skupinu na uhlíku 12. Existuje hned několik variant, jak ji lze odštěpit. První možností je použití KCN a Cu(OAc)₂ ve (Me₂N)PO za vzniku kyseliny 13-cis-retinové (15) (reakce I.) ¹²³, k identické reakci dochází zreagováním 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14) s Cu(OAc)₂ v roztoku piperidinu a 2,6-lutidinu (reakce II.). Pokud by byl zaměněn 2,6-lutidin za pyridin, produktem je rovněž identická látka (reakce III). ¹²³

Omezením přísunu fotonů, tedy umístěním látky v delším časovém úseku do tmy spolu s přidavkem jódu, dochází ke změně geometrické izomerie molekuly, na C13 se změni konformace ze Z na E. Tím vzniká z 13-cis-retinové kyseliny (15) all-trans retinová kyselina (16). ¹²²



Obr. 33: Syntéza 13-cis-retinové kyseliny a all-trans retinové kyseliny

Upraveno podle ^{122, 123}

4. Výsledky a diskuze

4.1. Celková strategie

Jako výchozí látka pro přípravu potencionálně účinných derivátů byl použit anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13), který byl syntetizován v první části práce. V druhé části pak byla zkoumána reaktivita anhydridu (13) s cílem připravit několik strukturně odlišných funkčních derivátů dikyseliny (14), zejména amidy a estery, které by mohly ovlivňovat diferenciaci a proliferaci buněk. Nakonec byly připravené látky testovány na biologickou aktivitu a toxicitu na buněčné linii HepG2.

4.2. Syntéza výchozí látky

4.2.1. Příprava nitrilu

Požadovaný nitril (10) byl připravován dle publikovaného postupu týmu Valla a kol. z roku 2007 (Viz kapitola 3.5.2.1).¹²⁰ Jako bazický katalyzátor této Knoevenagelovy kondenzace byl použit piperidin. Vzhledem k malým množstvím reaktantů nebyla použita Dean-Starkova aparatura, nýbrž molekulové síto, které mělo zachycovat vodu vzniklou během kondenzace. S ohledem na nižší toxicitu byl jako rozpouštědlo použito toluen namísto benzenu.

Postup byl realizován s navážkami 0,59 g a 5,9 g. Reakční směs β -iononu (9), kyanoctové kyseliny a piperidinu byla za přítomnosti molekulového síta refluxována pod zpětným chladičem po dobu 6,30 hod. Jelikož bylo ve finální směsi přítomno značné množství výchozího β -iononu, byl reakční čas prodloužen na 12 hod. Tato doba se pak ukázala jako dostačující. Po odpaření toulenu byla provedena purifikace surového produktu sloupcovou chromatografií (SiO_2 , DCM). Výsledný nitril (10) byl žlutá kapalina olejovité konzistence. Analýza UPLC-MS surové směsi prokázala, že produkt byl připraven v čistotě 99%. (Viz Příloha, Obr. 1)

Reakce byla zopakována v pěti šaržích, relativní výtěžky reakcí dosahovaly hodnot: 39,6%; 41,9%; 42,5%; 75,7%.

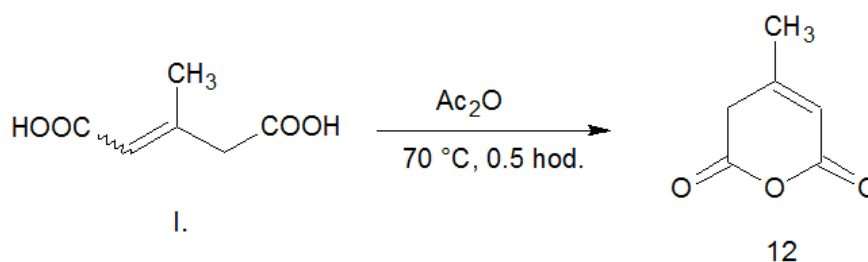
4.2.2. Příprava (β -ioniliden)acetaldehydu

Následujícím krokem byla redukce připraveného (2E,4E)/(2Z,4E)-3-methyl-5-(2,6,6-trimethylcyklohex-1-en-1-yl)penta-2,4-dienitrilu (10) pomocí DiBAL-H za vzniku (β -ioniliden)acetaldehydu (11). Tato reakce byla již popsána týmem Valla a kol. v roce 2007.¹²⁰ Při reprodukci postupu byl použit DCM namísto toulenu. Reakce byla provedena v bezvodém prostředí a v inertní argonové atmosféře po dobu 30 min. I zde ale bylo detekováno značné množství výchozí látky, proto byl prodloužen reakční čas na 2 hod. Ten se již ukázal jako dostatečný. Vzhledem k přítomnosti nečistot však bylo nutné surovou směs přechistit opět pomocí sloupcové chromatografie (SiO_2 , DCM). Vzniklý aldehyd (11) byl získán ve formě tmavě žlutého oleje. Protože měl experiment očekávaný průběh a relativní vysoký výtěžek 52,8%, byla reakce provedena ve třech dalších opakováních s dobrou reprodukovatelností: 48,7%; 53,4% a 40,1%.

Výsledky analýzy UPLC-MS stanovily přítomnost aldehydu (11) jako dominantní složky finálního produktu. Relativní čistoty připravených šarží byly: 93,8%, 94,6%, 93,2% a 94,2%. (Spektrum viz Příloha, Obr. 2)

4.2.3. Příprava anhydridu β -methylglutakonové kyseliny

Pro následující krok syntézy výchozího anhydridu (13) byla potřeba připravit anhydrid β -methylglutakonové kyseliny (12). Ten bylo možno získat jednoduchou dehydratací, kdy spolu reagovaly 3-methylglutakonová kyselina (I) a acetanhydrid (Ac_2O), jako dehydratační činidlo, při 70 °C po dobu 30 min. Dehydratace kyseliny (I) probíhala ve kvantitativním množství, takže nebylo potřeba další purifikace. Rozpouštědlo bylo odstraněno lyofilizací a relativní výtěžky interpretovaných experimentů dosahovaly hodnot 68,5% a 56,8%.



Obr. 34: Syntéza anhydridu β -methylglutakonové kyseliny

4.2.4. Příprava anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Požadovanou výchozí látku (13) bylo možno připravit Knoevenagelovou kondenzací anhydridu β -methylglutakonové kyseliny (12) a (β -ioniliden)acetaldehydu (11). Tento postup byl již popsán v publikaci Lewin a kol. v roce 1981.¹²² Jako bazický katalyzátor sloužil pyridin, velmi důležitá pro reakci pak byla inertní argonová atmosféra a použití bezvodého THF. Podobně jako v předešlých reprodukcích bylo potřeba i v našem případě prodloužit reakční čas, neboť finální směs obsahovala zvýšené množství reaktantu (11). Reakční směs byla monitorována pomocí TLC (SiO_2 , Et_2O -heptan) a jako optimální čas se ukázaly 4 hod, kdy již zreagovaly všechny výchozí látky. Po odpaření rozpouštědla měl produkt (13) konzistenci červené gumy. Nicméně po přidavku heptanu, ochlazením na -20°C na dobu 12 hod. a následným odpařením rozpouštědla se vyloučila látka (13) ve formě rudých krystalů. Nebylo tedy potřeba roztok zahřívat, jak bylo uvedeno v publikovaném postupu.¹²² Experiment byl reprodukován čtyřikrát, přičemž výtěžky byly ve všech případech kvantitativní. Z výsledů analýzy UPLC-UV-MS byla stanovena čistota produktu (13) na 99%. (Analýza viz Příloha, Obr. 3)

4.3. Reaktivita anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové a kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

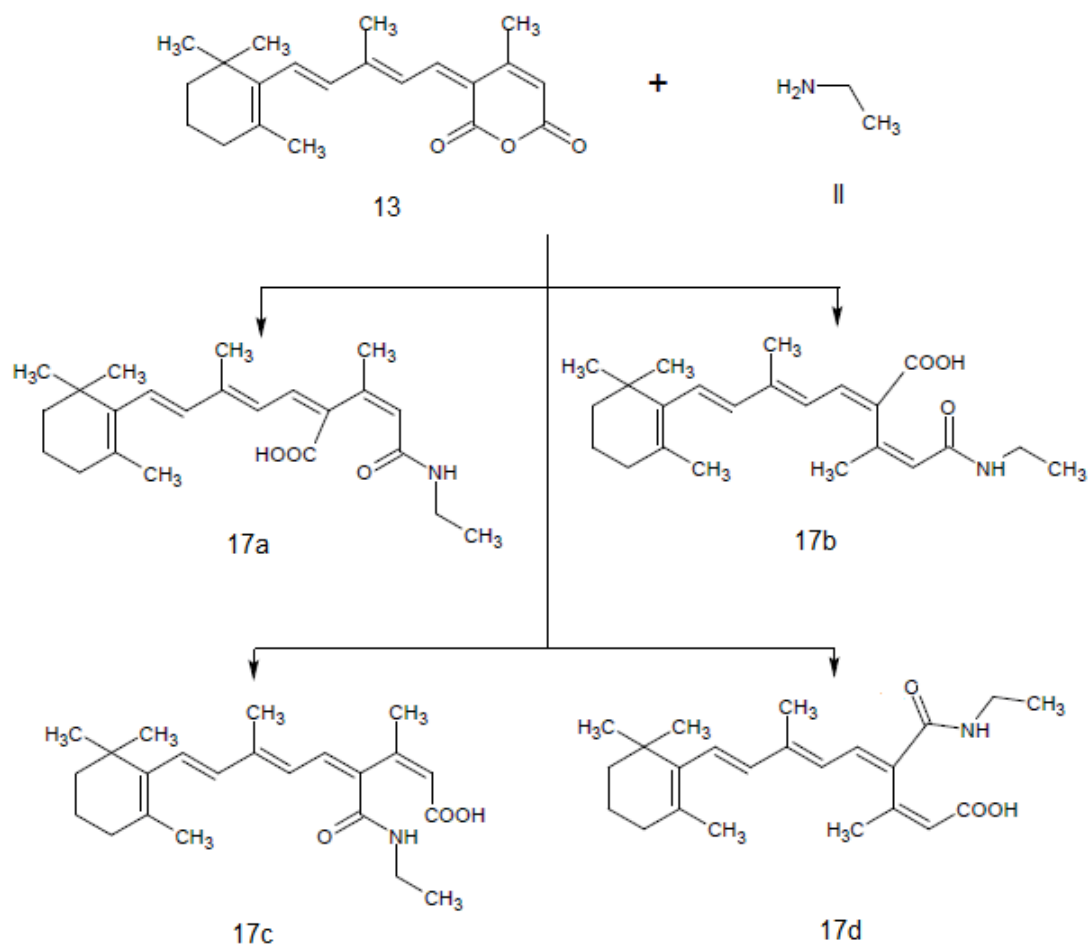
Výchozí látka-anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13)- byl podroben řadě reakcí, přičemž některé z nich se ukázaly jako vhodné pro přípravu požadovaných derivátů. Byly také prováděny experimenty, jenž zkoumaly reaktivitu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14). Nicméně dosažené výsledky nebyly uspokojivé, a proto nebyly znovu reprodukovány.

4.3.1. Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Reakce anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové s propylaminem

Obecně anhydridy vykazují při reakcích s nukleofilními činidly vysokou reaktivitu. Proto jsou schopny úspěšně reagovat spolu s amoniakem, primárními či sekundárními aminy za vzniku amidů. Reaktivita je způsobena záporným mezomerním efektem C=O skupin anhydridu, ty odčerpávají elektrony ze systému a způsobují jeho destabilizaci. Nukleofil se pak velmi snadno naváže na místa, kde je elektronový deficit a následuje rozštěpení molekuly anhydridu.

Těchto poznatků bylo využito i při přípravě propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové. Jako modelový nukleofil byl použit propylamin (II), který byl adován na molekulu anhydridu (13). Reakce probíhala 7 hod. za laboratorní teploty a jako rozpouštědlo byl použit DMSO. V daném případě může být výsledek reakce poměrně komplikovaný, neboť je nutné vzít v potaz možnou tvorbu hned několika izomerních sloučenin. Vzhledem k nesymetričnosti anhydridu může totiž reakce poskytovat dva polohové izomery adicí na jednu či druhou karbonylovou skupinu: 12-propylamid 13-cis-karboxylové kyseliny (17a) a 13-propylamid 13-cis-karboxylové kyseliny (17c). Navíc každá z těchto dvou molekul může koexistovat v různých geometrických variantách (cis-trans přechody analogických derivátů byly diskutovány v teoretické části). Při změně geometrické izomerie na dvojně vazbě C13 by tedy výsledná reakční směs obsahovala celkem 4 sloučeniny: (10E) (17b, 17d) a (10Z) (17a, 17c). Tato hypotetická situace je graficky znázorněna na Obr. 35. Při vyhodnocení reakce pomocí UPLC-MS byla skutečně detekována směs sloučenin o předpokládané molekulové hmotnosti ($M_h = 385$, spektrum viz Přílohy, Obr. 4). Jako dominantní byly detekovány tři nespécifické isomerní sloučeniny v poměru cca 1:1:2 (odvozeno z integrálních ploch jednotlivých píků). Reakce byla prováděna po dobu 7, 12 a 24 hod., nicméně na výsledcích analýz UPLC-MS nebyly postřehnuty větší rozdíly ve výsledném složení surové směsi produktů. (Analýza surové směsi viz Přílohy, Obr. 4). Následně byla surová směs purifikována pomocí preparativního HPLC na reverzní fázi. Dělením byly získány dvě frakce, které obsahovaly dva blíže neidentifikované izomerů propylamidu (17). Separace byla úspěšná jen částečně a relativní čistota frakcí byla 66,1% a 62,9%. (Analýza UPLC-MS viz Přílohy Obr. 5 a Obr. 6) Vzhledem k možné dynamice ve struktuře cílových látek je však nutné vzít v potaz také skutečnost, že jednotlivé geometrické izomery mohou za určitých podmínek přecházet v opačnou konfiguraci, což může v daném případě komplikovat snahu o získání čisté látky.

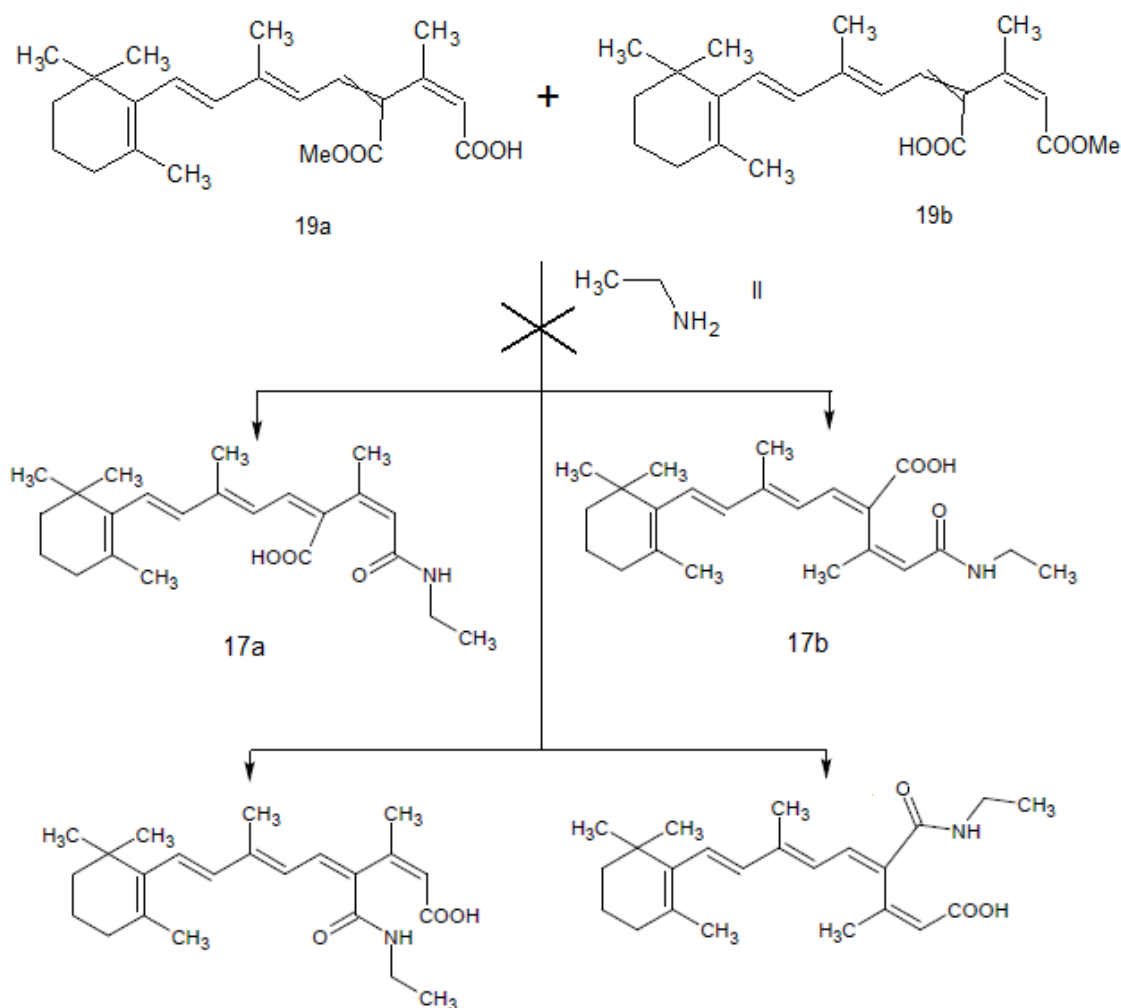


Obr. 35: Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové

Reakce methylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové a propylaminu

Další možností přípravy propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (17) byla nukleofilní adice propylaminu (II) na methylester kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (19a, 19b), jako rozpouštědlo byl použit DMSO. Experiment za laboratorní teploty neprobíhal a po zahřátí reakční směsi na 80 °C po dobu 12 hod. vznikla jen malá část amidu (17), nicméně v směsi byly majoritní složkou výchozí látky (II, 19). Obecně lze konstatovat, že estery vykazují vůči nukleofilním substitucím nižší reaktivitu než anhydridy. Proto byl následně methylester (19) podroben experimentu v mikrovlnném reaktoru.

V mikrovlnném reaktoru byla reakční směs zahřívána na 120 °C po dobu 15 min. Reaktor byl nastaven na výkon 300W. Po analýze na UPLC-MS bylo zřejmé, že reakcí došlo k rozštěpení izoprenového řetězce a tím i k rozkladu látky.



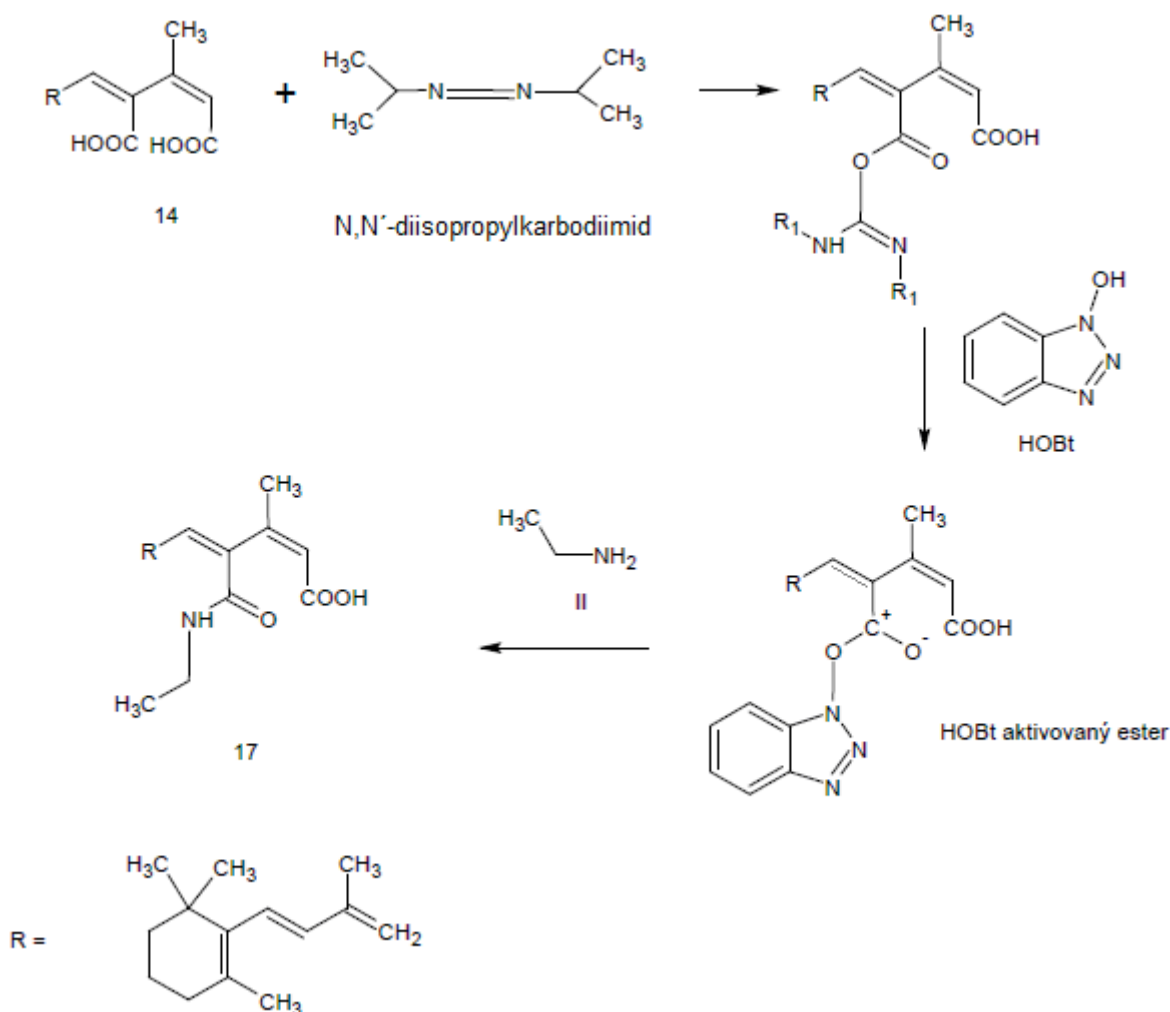
Obr. 36: Reakce methylesteru kyseliny 13-cis-karboxyretinové (19a, 19b) a propylaminu (II)

Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové metodou HOBt

Jedno z řešení, jak bylo teoreticky možné připravit propylamid (17) z 13-cis-12-karboxylové kyseliny (14), představovala metoda tvorby aktivovaného HOBt esteru.

V rámci této práce byl proveden experiment, kdy reagovala dikyselina (14) s HOBt (1-hydroxybenzotriazol), DIC (diisopropyl-dikarbodiimid) a propylaminem (II) za laboratorní teploty po dobu 3 hod. Během reakce by mělo docházet nejdříve k reakci mezi dikyselinou (14) a diisopropyl-dikarbonylem (DIC) za vzniku odpovídajícího aduktu. Jeho reakcí s HOBt měl vzniknout tzv. aktivovaný HOBt ester, který měl snadno podléhat nukleofilnímu ataku propylaminu (II). Z analýzy UPLC-MS bylo ale možno usuzovat že ve finální surové směsi se vyskytovala pouze malá množství vzniklého propylamidu (17). Nicméně majoritní složkou

směsi byly blíže nespecifikované sloučeniny. Tato reakce tedy nepředstavovala efektivní řešení vhodné pro další použití.

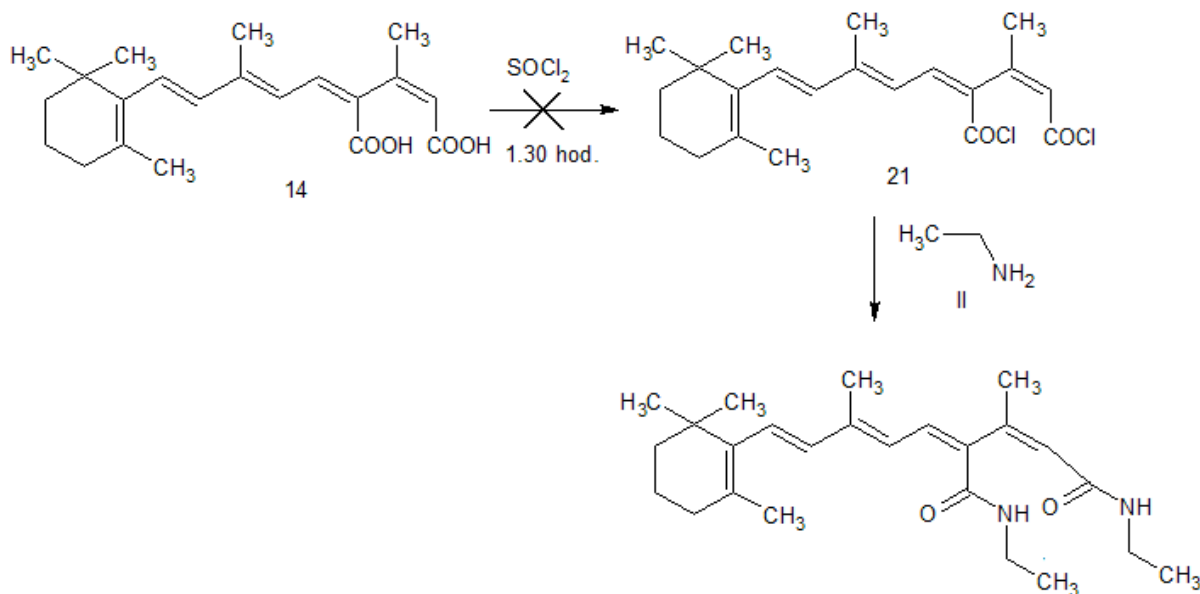


Obr. 37: Teoretický průběh přípravy propylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové (17), mechanismus při hypotetické reakci na C12 karboxyly

Reakce kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové s thionylchloridem

Vznik dichloridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (21) a jeho následná substituce aminem představoval východisko, jak z málo reaktivní 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14) připravit diamid. Mechanismus provedené reakce spočíval v ataku elektrofilní síry SOCl_2 na OH- skupiny dikyseliny (14). Rozpuštěním dikyseliny (14) v SOCl_2 a mícháním 1,30 hod. za laboratorní teploty měl vzniknout dichlorid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (21). Jelikož obecně platí, že chloridy jsou reaktivnější než karboxylové kyseliny, následně byla provedena nukleofilní substituce propylaminem (II) jeho přidávkem do reakční směsi. Nicméně

po provedení analýzy na UPLC-MS bylo prokázáno, že během reakce došlo k rozpadu molekuly na fragmenty. Díky této skutečnosti byla reakce nevhodná pro další experimenty.



Obr. 38: Teoretický průběh reakce kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14) s SOCl_2 a následná substituce s propylaminem (II)

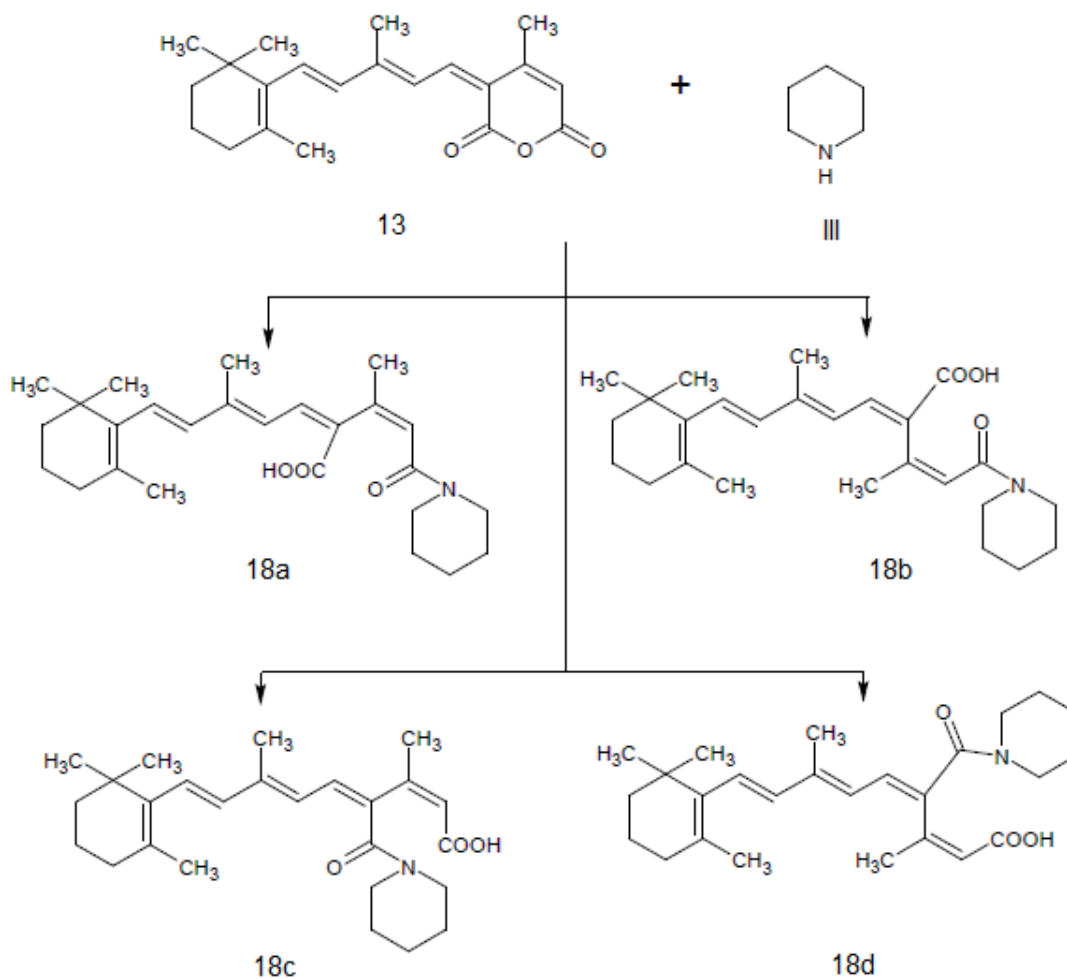
4.3.1.1. Příprava piperidinylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Protože uváděné substituce nebyly ani stereoselektivní ani regioselektivní, nabízenou možností, jak ovlivnit polohu substituce či zastoupení produktů ve výsledné směsi, bylo využito sterických efektů pomocí objemného nukleofilu. Jako objemný nukleofil byl zvolen piperidin.

Reakce anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové a piperidinu

Reakce mezi anhydridem kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) a piperidinem (III) probíhala za laboratorní teploty, použitým rozpouštědlem byl DMSO. Doba experimentu byla 12 hod. Po dostatečném zreagování reaktantů a ukončení reakce byla provedena finální analýza UPLC-MS. Ze spektra bylo možno vyvozovat, že surová směs obsahovala neznámé nečistoty, proto byl surový produkt přečištěn pomocí preparativní HPLC na reverzní fázi. (Analýza surové směsi viz Přílohy Obr. 7) Po purifikaci a následné evaporaci rozpouštědla byla provedena nová analýza. Ta stanovila relativní čistotu finálního produktu 45,1% a na záznamu byla zřejmá přítomnost dalších blíže nespecifikovaných izomerů piperidinylamidu (18) v produktu.

(Analýza viz Přílohy Obr. 8) Dá se tedy říci, že alternativa s piperidinem neposkytla ve srovnání s použitím propylaminu žádné výrazné zlepšení.



Obr. 39: Reakce anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) a piperidinu (III)

4.3.1.2. Příprava esterů kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Dalšími připravenými látkami byly estery kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové. Původním cílem bylo látky testovat jak na biologickou aktivitu, tak použít pro experimenty regioselektivní syntézy propylaminu (Viz předešlé kapitoly). Bylo totiž předpokládáno, že jestliže by byla připravena směs izomerů esteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové a jednotlivé izomery by bylo možno oddělit na preparativním HPLC, staly by se tak výhodnou výchozí látkou pro regioselektivní syntézu amidů. Toto řešení se ale se ale ukázalo jako nereálné. Estery také vykazovaly značnou nestabilitu při skladování v čase, tudíž nebylo možné zkoumat ani jejich biologickou aktivitu.

Alkalická methanolýza s následným okyselením

Jelikož průběh reakce níže uvedené tepelné methanolýzy, která se zdála nejjednodušším řešením, nebyl bezproblémový, další možností byla příprava methylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (19) alkalickou methanolýzou. Obecně je již dlouho známý fakt, že reakcí anhydridu s alkoholem v bazickém prostředí vzniká příslušný ester. Přítomnost báze usnadňuje nukleofilní atak volného elektronového páru methanolu na uhlík anhydridu s elektronovým deficitem. V našem případě reagoval anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) s methanolickým roztokem NaOH (50 mg/ml), reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 1,5 hod. Po této době byl ve směsi detekován cílový methylester.

Dále bylo zjištěno, že s delším reakčním časem se zvyšoval obsah kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14), vzniklé hydrolyzou methylesteru (19). Proto bylo nutné ihned po proběhnutí reakce odstranit nadbytek NaOH neutralizací, přechistit produkt (19) extrakcí a odpařit na vakuové odparce. K okyselení na pH 6 byl použit roztok zřed. CH₃COOH. Výsledky analýzy UPLC-MS však ukázaly, že extrakt neobsahuje požadovaný produkt (9). Příčinou problému byl zřejmě fakt, že během extrakce nedošlo k přechodu methylesteru (19) do organické fáze.

Alkalická methanolýza (ethanolýza) s následným okyselením HCl

Protože při použití CH₃COOH na okyselení reakční směsi docházelo k zadržování methylesteru (19) ve vodné fázi, byla zvolena vhodnější HCl. Po zreagování methanolického roztoku NaOH a anhydridu (6) byl roztok opatrně okyselen na pH= 4 zřed. 10% HCl. Po extrakci diethyletherem a po jeho odpaření byl produkt analyzován na UPLC-MS. Ze záznamu bylo zřetelné, že jak během reakce, tak během okyselení směsi současně docházelo k hydrolyze vzniklého methylesteru (19) na dikyselinu (14). Během reakce bylo zastoupení methylesteru (19) a dikyseliny (14) vyrovnané, nicméně po okyselení HCl došlo k úplné hydrolyze a vznikla čistá kyselina 13-cis-12-karboxyretinová (14). Tato látka byla posléze použita pro další experimenty a pro testování biologické aktivity. Analýza na UPLC-MS stanovila relativní čistotu produktu 99%. (Výsledky viz Příloha Obr. 9)

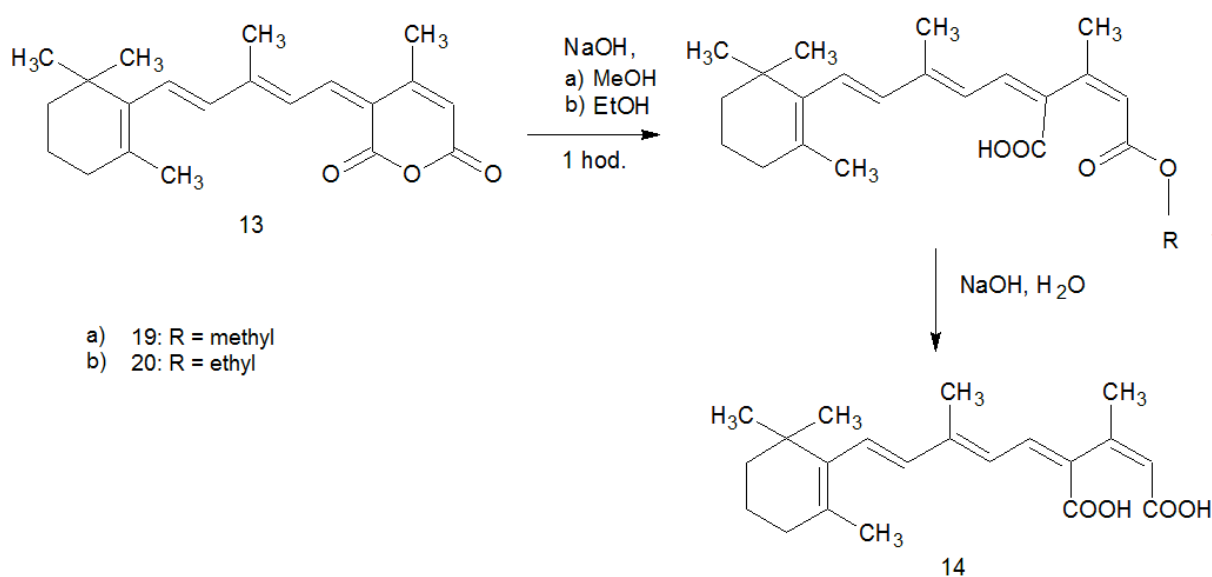
Alkalická ethanolýza s následným okyselením H₂SO₄

Skutečnost, že při neutralizaci dochází k hydrolyze vzniklého esteru, podstatně snižovala výtěžnost reakce. Proto byl proveden experiment, kdy byla použita H₂SO₄ (5%) pro neutralizaci nadbytku NaOH. Zvolen byl také podstatně kratší čas a to 1,5 hod. Výsledná směs

obsahovala jak dikyselinu (14) tak ester (20), jenž byl ale majoritní složkou. Experiment byl zopakován a bylo učiněno zjištění, že zásadní vliv na omezení hydrolyzy mělo i použití bezvodého ethanolu. Produktem alkalické ethanolýzy anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) tedy byla směs polohových a geometrických izomerů ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20). Reakce probíhala 1,5 hod. za laboratorní teploty a její průběh byl monitorován pomocí TLC (SiO₂, DCM-HCOOH) a pomocí UPLC-MS. (Analýza po ukončení reakce a odpaření rozpouštědla Přílohy, Obr. 10)

Ze získaných dat lze usuzovat, že tento postup byl z uvedených alkalických methanol-, ethanolýz nejvhodnější.

Finální surová směs druhého experimentu byla přečištěna na preparativním HPLC. Nicméně produkt se ukázal jako nevhodný pro testování biologické aktivity, jelikož jeví známky zvýšené nestability a při delším stání v čase i za chladu a v temnu došlo k jeho rozkladu. (Viz analýza UPLC-MS Příloha Obr. 11)

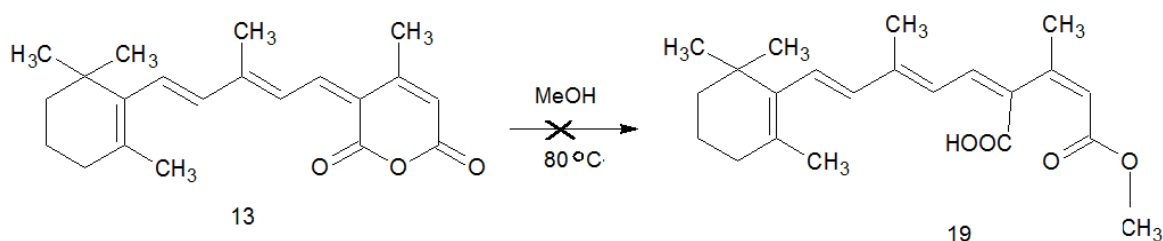


Obr. 40: Bazická alkoholýza anhydridu kyseliny 13-cis-karboxyretinové (13), za použití methanolickeho (a) nebo ethanolického (b) roztoku NaOH, při hypotetické reakci na C13

Tepelná methanolýza

Druhou možností, jak bylo možno připravit ester, byla methanolýza za zvýšené teploty. Methanolickeý roztok anhydridu (13) byl temperován při 80 °C 8 hod. Z výsledků analýzy UPLC-MS lze vyvozovat, že reakce však probíhala velmi pomalu, výtěžky byly mizivé a jas-

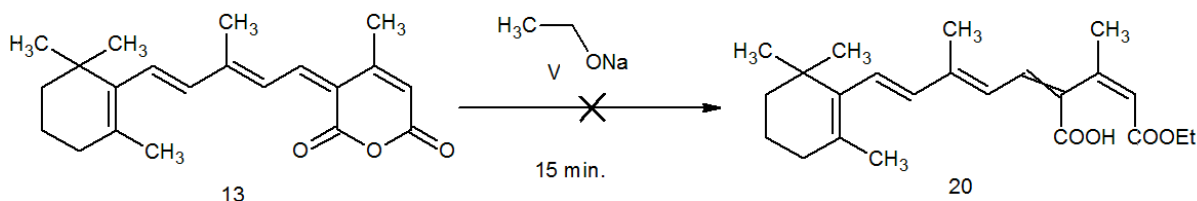
ně dominoval pík nezreagovaného anhydridu, viditelný byl také pík odpovídající dikyselině. Bylo možné se domnívat, že nedošlo ke vzniku methylesteru (19) ale rovnou k hydrolyze anhydridu (13) za vzniku dikyseliny (14). Postup tohoto experimentu se ukázal jako nevhodný pro přípravu žádaného esteru.



Obr. 41: Tepelná methanolýza anhydridu kyseliny 13-cis-karboxyretinové (13), při hypotetické reakci na C13

Reakce s ethanolátem sodným

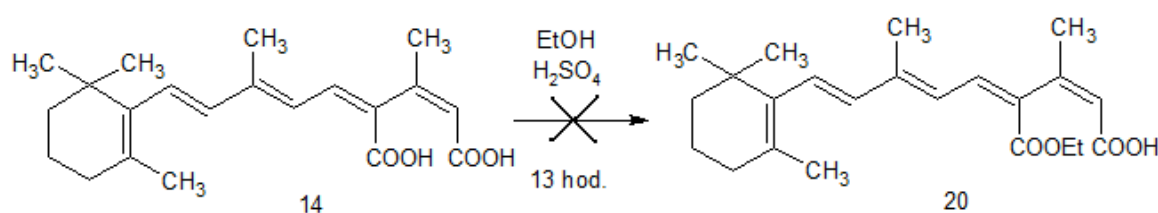
Dalším provedeným experimentem byla reakce anhydridu (13) s ethanolátem sodným (V). Předpokládaným produktem měl být ethylester kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20). Důvodem provedení experimentu byla snaha připravit čistý ester (20) bez dalšího rozkladu na dikyselinu (14) během reakce. V prvním kroku byl připraven roztok ethanolátu sodného reakcí kovového sodíku s bezvodým ethanolom. Ve vzniklém roztoku byl pak rozpuštěn anhydrid (13). Reakce probíhala 15 min. a následně byl nadbytek neutralizován HCOOH (5%). Aby nedošlo k hydrolyze produktu (20) bylo potřeba urychleně extrahovat produkt do diethyletheru. Po odpaření rozpouštědla byla provedena analýza UPLC-MS a ze spektra vyplývalo, že surová směs obsahovala z velké části nezreagovanou výchozí látku (13), zatímco produkt (19) měl pouze minoritní zastoupení.



Obr. 42: Předpokládaný průběh reakce anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) spolu s ethanolátem sodným (V) za vzniku blíže nespecifikovaného izomeru ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20)

Esterifikace v kyselém prostředí

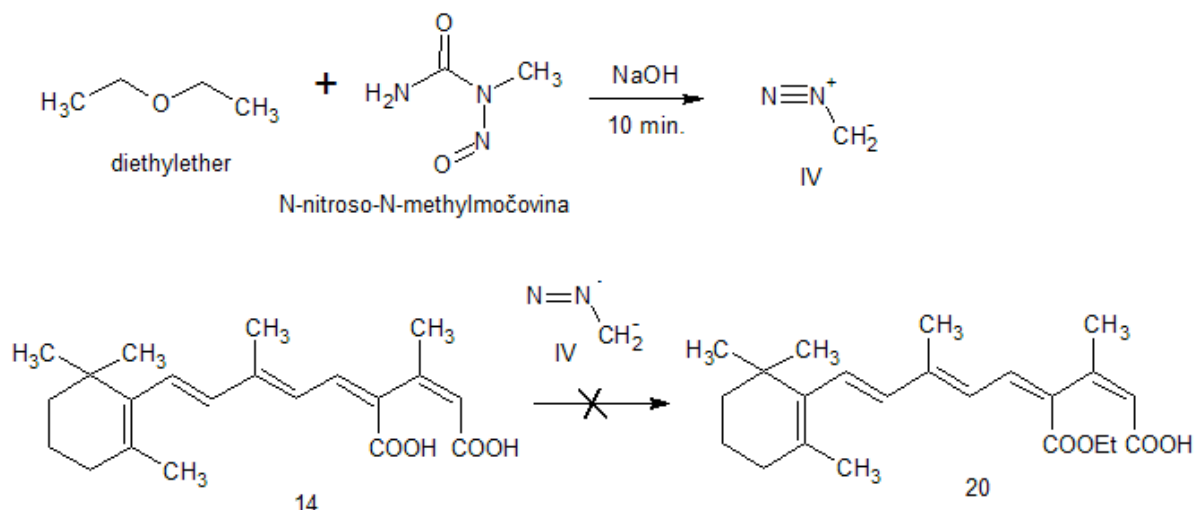
Esterifikace karboxylových kyselin alkoholem v kyselém prostředí H_2SO_4 patří mezi základní organické reakce. Principy esterifikace byly využity v experimentu, kdy spolu reagovala kyselina 13-cis-12-karboxyretinová (14) a bezvodý ethanol. K reaktantům bylo přidáno i malé množství H_2SO_4 katalyzující reakci. Reakční směs byla refluxována po dobu 13 hod. pod zpětným chladičem. Analýza po ukončení reakce ukázala, že podmínky experimentu jsou příliš drastické a tedy během experimentu došlo k fragmentaci látky.



Obr. 43: Reakce esterifikace kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14) za předpokládaného vzniku blíže nespecifikovaného izomeru ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20)

Reakce kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové s diazomethanem

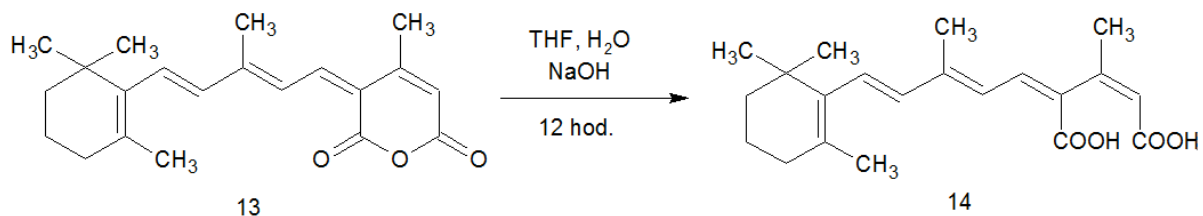
Méně drastických podmínek bývá potřeba při esterifikaci pomocí diazomethanu (CH_2N_2). Dalším pokusem proto byla reakce 13-cis-12-karboxyretinové kyseliny (14) s diazomethanem s cílem připravit blíže nespecifikovaný izomer methylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (19). Během reakce mělo nejprve docházet k protonaci CH_2N_2 karboxylovou kyselinou (14) za vzniku extrémně nestabilního diazoniového kationu, který následně odštěpil dusík za současného nukleofilního ataku RCO_2^- . Při experimentu musel být nejprve připraven diazomethan (IV), teprve poté byla do etherického roztoku, jenž ho obsahoval, přidána příslušná karboxylová kyselina (14). Obě uvedené reakce probíhaly za laboratorní teploty. Výsledky analýzy UPLC-MS poukazovaly pouze na stopový obsah požadovaného methylesteru (19). Reakce tedy vykazovala problematický průběh a nebylo ji možné použít.



Obr. 44: Reakce kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové s diazomethanem (IV)

4.3.1.3. Příprava kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Jak bylo již uvedeno v předešlém textu, čistá dikyselina (14) byla připravena alkalickou methanolýzou anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) při použití roztoku HCl k okyselení reakční směsi a při použití dlouhého reakčního času. Nicméně existují i publikované postupy, které popisují jiné metody přípravy dikyseliny (14) z anhydridu (13).¹²² V tomto experimentu bylo použito jako rozpouštědlo THF a voda a za neustálého chlazení byl přidán vodný roztok NaOH (1 mol). Čas reakce byl oproti dříve uvedenému postupu 12 hod. K neutralizaci nadbytku báze byl použit 10 % roztok H₂SO₄ a neutralizace vodné fáze byla provedena až během samotné extrakce diethyletherem. Po odpaření rozpouštědla byla provedena analýza UPLC-MS z naměřených dat bylo možno vyvozovat, že finální směs obsahovala řadu nečistot. Relativní čistota produktu byla 59,6%. (Analýza viz Příloha, Obr. 12) Tudíž byl postup uvedený výše (4.3.1.2. Alkalická methanolýza za použití HCl) vhodnější pro přípravu karboxylové kyseliny (14).



Obr. 45: Příprava kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

4.4. Testování biologické aktivity

Výše uvedenými reakcemi byla připraveny pro testování následující látky:

| | Látka | Číslo produktu | m [mg] |
|---|------------------------------------|----------------|--------|
| 1 | Nitril | 10 | 3,8 |
| 2 | Aldehyd | 11 | 4,6 |
| 3 | Anhydrid | 13 | 3,0 |
| 4 | Kyselina 13-cis-12-karboxyretinová | 14 | 8,0 |
| 5 | Propylamid | 17 | 1,8 |
| 6 | Piperidinylamid | 18 | 1,5 |

Tab. 1: Přehled testovaných látek

Látky uvedené v Tabulce 1 byly testovány na buněčné linii lidského hepatálního karcinomu, tedy na buňkách HepG2. Byly provedeny testy chemiluminiscenční detekce aktivity luciferasy a β -galaktosidasy (tzv. dual-light system). Buňky, které byly podrobeny tomuto experimentu, musely být nejprve transfekovány RARE plasmidem a β -galaktosidázovým plasmidem. Dalšími provedenými experimenty byly kolorimetrická zkouška MTT a stanovení celkových proteinů BCA.

Význačné pro použité HepG2 buňky jsou jejich perpetuální vlastnosti, byly odvozeny z dobře diferenciovaného hepatocelulárního karcinomu. Jedná se o epitelální buňky, které rostou v monovrstvách a obsahují model chromosomu 55. Buňky vylučují škálu hlavních plasmatických proteinů jako je albumin, transferin a proteiny akutní fáze jako jsou fibrogen, α -makroglobulin, α -antitrypsin. Tudíž jsou buňky HepG2 vhodným systémovým modelem pro *in vitro* studie na lidských polarizovaných hepatocytech^{127, 128}, proto byly použity i v rámci tohoto experimentu.

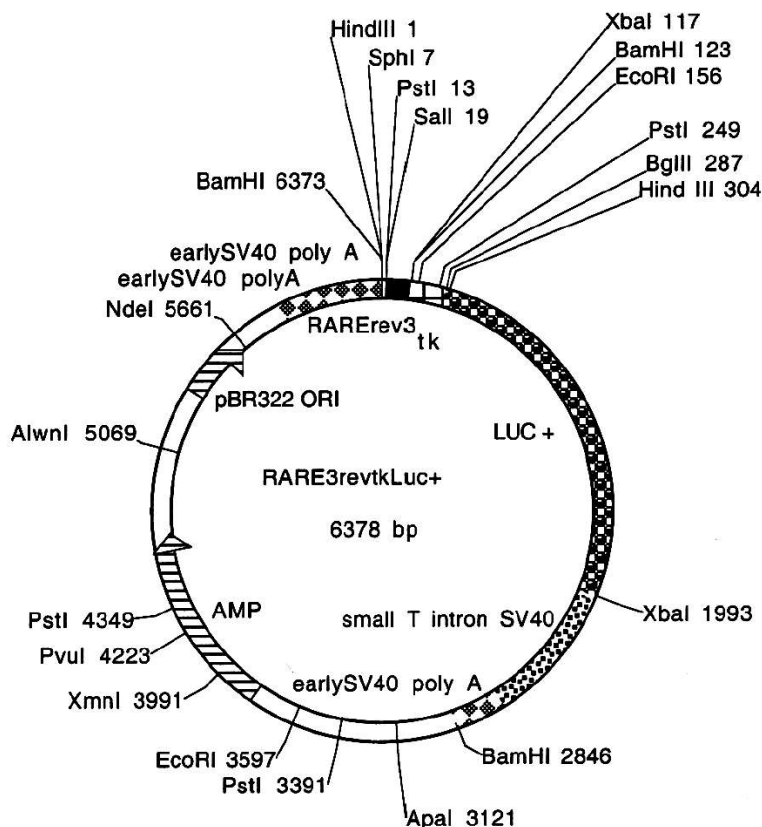
4.5. Testy biologické aktivity

Při testech aktivity připravených retinoidů byly používány buněčné linie HepG2. Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna sterilně v laminárním boxu.

4.5.1. Principy chemiluminiscenčního stanovení luciferázy

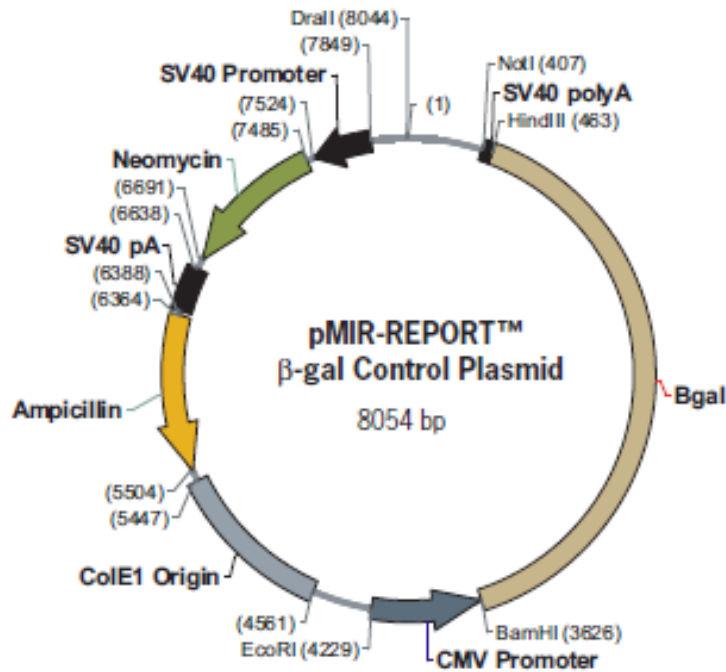
RARE3revtkLuc+ plasmid, který byl do buněk inkorporován transfekcí, sloužil k sledování aktivity receptoru kyseliny retinové (RAR). Plasmid byl původně vytvořen Anne-Marie Boussioux a Patrickem Balaguerem v roce 1996, do laboratoře byl získán jako dar (Obrazek 46). Aktivita receptoru mohla tak být indukována signální transdukcí v kultivovaných

buňkách. Po vazbě ligandu na RAR a následné aktivaci transkripce docházelo k expresi luciferázy. Monitoring aktivity byl prováděn měřením chemiluminiscence. V okamžiku, kdy pak luciferáza reagovala se substrátem docházelo k luminiscenci, která byla kvantitativně měřena na luminometru.¹²⁹



Obr. 46: Mapa plasmidu RARE3revtkLuc+ autorů Anne-Marie Boussioux a Patrick Balaguer.

Pro kontrolu účinnosti transfekce plasmidu RARE-luc byl v experimentech použit plasmid pMIR-REPORT β -gal, vytvořený a dodávaný firmou Ambion (Obrázek 47). Obecně je tento plasmid využíván jako kontrolní reportérový marker pro sledování exprese. Gen β -galaktosidasy je součástí *lacZ* genu, jenž patří do indukovatelného systému lac operonu. Exprese Lac operonu je nejúčinnější v přítomnosti laktózy a při nízké hladině glukózy.¹³¹



Obr. 47: Mapa kontrolního plasmidu β -gal firmy Ambion®

4.5.2. Transfekce s využitím Lipofectamine 2000

Nejprve bylo smícháno 1,8 ml Opti-Mem média s 45 μ l Lipofectamine. Ten bylo nutno přikapávat opatrně přímo do média. Roztok byl ponechán za laboratorní teploty 5 min. Mezitím bylo napipetováno na dno samostatné zkumavky 200 ng/jamku RARE-luc a 20 ng/jamku β -gal (pro 70 jamek: 27 μ l plasmidu RARE-luc o $c=0,52 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 4,3 μ l β -gal o $c=0,325 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Po uplynutí inkubační doby byla směs Opti-Mem + Lipofectamine opatrně napipetována na DNA, byla opatrně promíchána jemným poklepáním zkumavky a znovu byla ponechána inkubovat po dobu 15 min. Následně byla přidána ke směsi suspenze buněk (cca 100 000 buněk na 1 jamku 24 jamkové desky, bylo používáno 70 jamek). Po jemném promíchání byla suspenze nanášena na desky.

4.5.3. Dual-light system

Po provedené transfekci bylo následujícího dne vyměněno čerstvé médium s příslušným obsahem zkoumaných látek. Třetího dne pak bylo prováděno chemiluminiscenční měření dual-light. Použitou metodou byly detekovány chemiluminiscenční aktivity luciferasy a β -galaktosidasy.

Nejprve byl připraven Lyzační pufr na potřebný počet jamek. Tedy 70 jamkám odpovídá 7,6 ml Lysis solution a 7,6 μ l 0,5M DTT. Po opláchnutí buněk PBS bylo do každé jamky

napipetováno 110 μ l Lyzačního pufru. Následně byly buňky seškrábány do eppendorfek a centrifugovány 2 min při otáčkách 4500 rpm. Mezitím byly nahřány pufrы A a B na laboratorní teplotu. Pufr B byl smíchán s 7,6 μ l Galaction-PLUS substrátu. Do zkumavek pro měření chemiluminiscence bylo odpipetováno 10 μ l buněčného lyzátu a 25 μ l pufru A. Nejpozději do 10 min bylo ke směsi napipetováno 100 μ l upraveného pufru B. Po promíchání byla okamžitě měřena chemiluminiscence. Zkumavky se vzorky byly ponechány inkubovat 30-60 min za laboratorní teploty. Poté bylo do zkumavky přidáno 100 μ l roztoku Accelerator-II a po promíchání byla okamžitě změřena chemiluminiscence.

4.5.4. Chemiluminescenční měření luciferázy

Další možnou metodou bylo chemiluminescenční měření samotné luciferázy, které mohlo být posléze doplněno o stanovení celkových proteinů BCA. Poté co první den proběhla již popisovaná transfekce a co druhý den bylo přidáno čerstvé médium s příslušným obsahem retinoidů, třetího dne byla měřena míra exprese reportérového genu luciferázy chemiluminiscencí. Buňky byly nejdříve opláchnuty roztokem PBS a poté je bylo nutné zlyzovat pomocí Lyzačního pufru (ředění s vodou 1:5). Na každou jamku desky bylo nanášeno 150 μ l tohoto pufru a deska byla následně umístěna do mrazicího boxu a ochlazená na -80 °C. Po 1 hod. byly roztoky za laboratorní teploty na třepače rozmrazeny. Následně bylo odebráno z každé jamky 7 μ l lyzátu a po přidání 70 μ l Luciferase pufru a promíchání bylo ihned provedeno měření na chemiluminometru.

4.5.5. Stanovení celkových proteinů metodou BCA

Pro stanovení byly potřeba následující standardní roztoky, které byly připraveny předem:

| standard | <i>I</i> | <i>II</i> | <i>III</i> | <i>IV</i> | <i>V</i> | <i>VI</i> | <i>VII</i> |
|----------------------------|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|------------|
| c [mg/ml] | 0,000 | 0,0125 | 0,025 | 0,050 | 0,100 | 0,250 | 0,500 |

Tab. 2: Použité standardní roztoky BSA ve vodě

Toto stanovení bylo prováděno u transfekovaných HepG2 linií, do nichž byly první den inkorporovány plasmidy RARE a β -gal, po 24 hod. bylo aplikováno médium s příslušným obsahem testovaných sloučenin a třetího dne pak byl měřen obsah celkových proteinů. Nejprve bylo potřeba buňky zlyzovat. K tomu byl využit lyzační pufr (ředění s vodou 1:4), kterého bylo aplikováno 150 μ l na jamku. Posléze byla deska spolu s roztoky zamrazena na -80 °C.

Po 1 hod. byly roztoky vyjmuty a umístěny na třepačku, kde za laboratorní teploty došlo k jejich rozmrznutí. Na 96 jamkovou desku bylo napipetováno 10 µl připraveného buněčného lyzátu a 10 µl jednoho z výše uvedených standardů a 200 µl BCA working reagent. Deska byla následně ponechána 30 min. inkubovat při 37 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla spektrofotometricky měřena absorbance při 562 nm.

4.5.6. Stanovení toxicity metodou MTT

První den byly vysety na 96 jamkovou desku buňky HepG2. Přibližný počet buněk se pohyboval okolo 20 000 na jamku. Druhého dne bylo přidáno médium s obsahem testované látky. Následujícího dne byly buňky opláchnuty roztokem PBS. Poté bylo aplikováno do každé jamky 100 µl čerstvého média s přidavkem roztoku MTT (100 µl roztoku MTT do 1 ml média). Deska byla ponechána 2 hod. v inkubátoru. Následně bylo přítomné médium odstraněno a namísto něj bylo aplikováno 100 µl směsi DMSO a NH₃, v níž se vzniklé krystaly rozpustily. Po 5 min byla spektrofotometricky měřena absorbance při 540 nm. Pokud přesahovaly její hodnoty 1, bylo nutno měřené roztoky zředit.

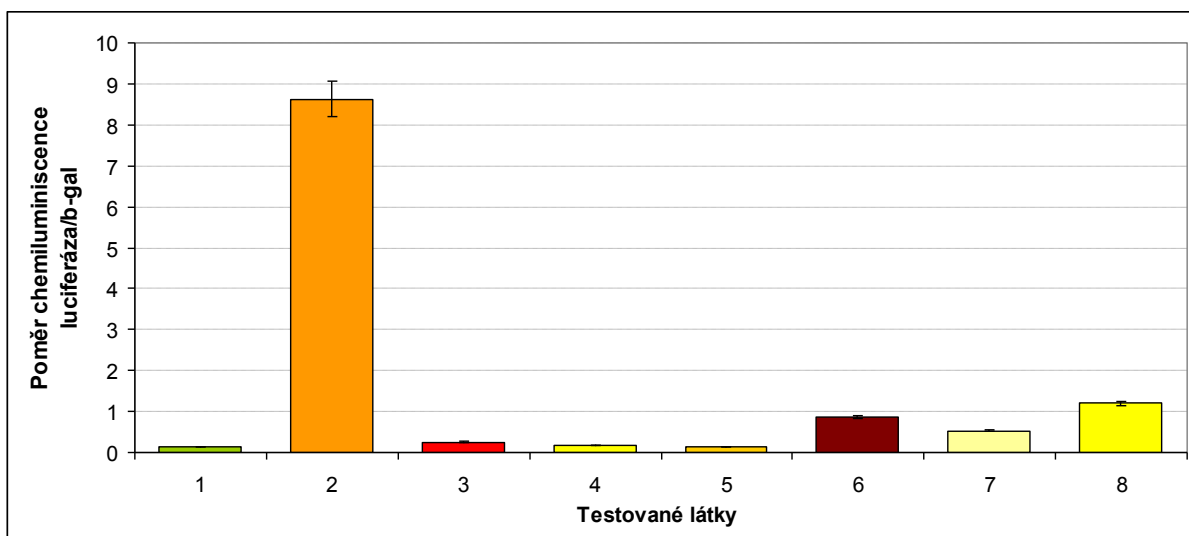
4.5.7. Provedené experimenty

4.5.7.1. Obecný screening vlivu retinoidů na transkripční aktivitu

Prvním provedeným experimentem byl obecný screening vlivu jednotlivých sloučenin na expresi genů. Kvantitativně vyjádřilo míru aktivace RAR chemiluminiscenční měření dual-light, kdy jako kontrola transfekce sloužila β-galaktosidasa. V experimentu byly testovány roztoky připravených látek o koncentraci 10 µmol/l. Pro porovnání výsledků byla rovněž testován 10 µmol/l roztok ATRA, jehož účinky jsou již známy. Jelikož látky byly během experimentu rozpuštěny v DMSO, bylo nutné monitorovat vliv tohoto rozpouštědla na viabilitu buněk. Proto bylo na jeden z tripletů nanášeno médium, které obsahovalo pouze DMSO (o koncentraci 0,5 µl/jamka). Každá látka byla testována v tripletu.

Výsledky experimentu byly vyjádřeny jako poměr chemiluminiscence luciferázy ku chemiluminiscenci β-galaktosidázy. Z vzniklého grafu (Obr. 48), bylo možné vyvozovat závěr, že všechny připravené látky vykazují při koncentraci 10 µmol/l nižší aktivitu oproti ATRA. Zatímco piperidinylamid (18), propylamid (19) a aldehyd (11) měli biologickou aktivitu zanedbatelnou, u sloučenin: anhydrid (13), dikyselina (14) a nitril (10) byla zaznamenána jistá aktivita na retinoidních receptorech. Proto byla v následujících experimentech monitorována závislost chemiluminiscence na vzrůstající koncentraci látek.

Měření bylo prováděno s 95% přesností.



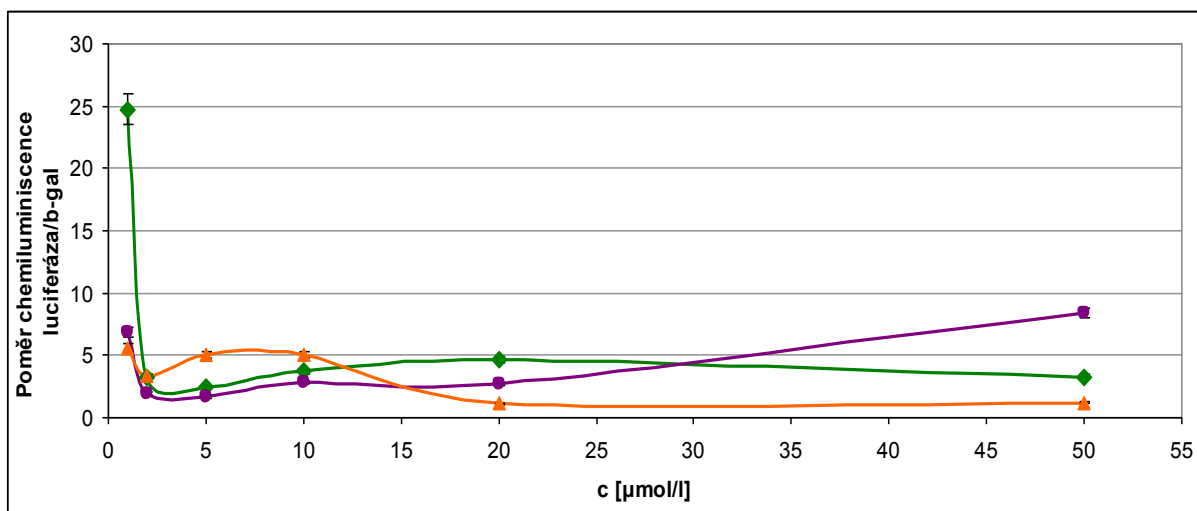
Obr. 48: Screening vlivu připravených retinoidů na transkripční aktivitu, vyjádřeno jako poměr chemiluminiscence luciferázy/β-gal. Jednotlivé sloupce označují použité látky: (1) DMSO; (2) ATRA; (3) piperidinylamid; (4) propylamid; (5) aldehyd; (6) anhydrid; (7) dikyselina; (8) nitril

4.5.7.2. Koncentrační řady retinoidů

Experiment I

Na základě naměřených výsledů z předešlého experimentu byly vybrány tři látky, které vykazovaly potenciál ovlivňovat skrz vazbu na retinoidní jaderné receptory (RAR) míru exprese určitých genů. Jako vhodní adepti pro další testy byly vybrány tyto látky: anhydrid (13), dikyselina (14) a nitril (11). Jelikož existovala možnost cytotoxicity nebo možnost blokáce RAR při použití příliš koncentrovaných roztoků, byla měřena koncentrační řada. Použity byly koncentrace látek: 1, 2, 5, 10, 20 a 50 μmol/l. Negativní kontrola byla provedena pomocí dvou tripletů obsahujících pouze DMSO (0,5 a 2,5 μl/jamku). Pro ověření funkčnosti inkorporovaných plasmidů byl na jeden z tripletů nanesen 10 μmol/l roztok ATRA.

Buňky byly opět transfekovány jak RARE, tak β-gal plasmidem, chemiluminiscence byla pak detekována metodou dual-light. Měření bylo prováděno opět v tripletu s 95% přesností. U naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr. Posléze byla vytvořena koncentrační závislost poměru chemiluminiscence luciferázy/β-gal na koncentraci roztoku v μmol/l.



Obr. 49: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu RAR obrázek vyjadřuje koncentrační závislost aktivity RAR testovanými látkami: anhydrid: zelená křivka s kosočtverci, dikyselina: fialová křivka s kruhy, nitril: oranžová křivka s trojúhelníky. Data jsou vyjádřena jako poměr chemilum luciferázy na chemilum β-gal ve vzorku versus koncentrace testované látky

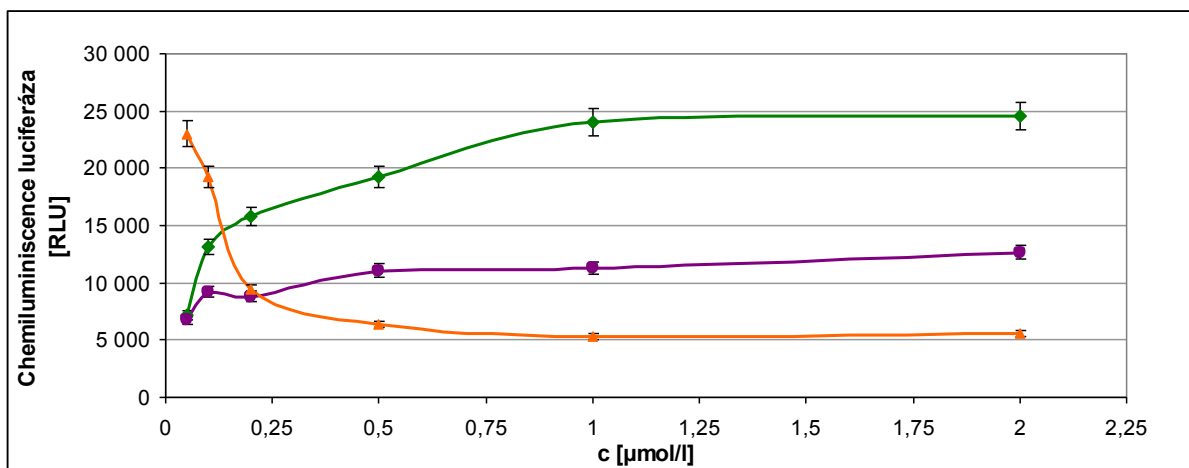
Experiment II

Z vyhodnocení předešlého Experimentu I bylo jasně zřetelné, že všechny ze zkoumaných látek vykazovaly nejvyšší hodnoty chemiluminiscence při nejnižších koncentracích. Tedy bylo možno říct, že méně koncentrované roztoky vykazovaly vyšší míru aktivity na RAR. Proto byla při dalším experimentu vytvořena nová koncentrační řada roztoků o koncentracích: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 μmol/l.

Při experimentu II byly buňky transfekovány pouze RARE plasmidem a detekce tedy byla prováděna pouze chemiluminiscenčním měřením luciferázy. Jako negativní kontrola posloužily triplety, na které byl aplikován pouze DMSO (0,5 a 2,5 μl/jamka) a pro posouzení funkčnosti plasmidu byl během experimentu také testován roztok ATRA (1 μmol/l). Měření bylo prováděno s 95% přesností.

Výsledky byly shrnuty do níže uvedené tabulky a experiment byl vyhodnocen grafickou závislostí chemiluminiscence luciferázy (RLU) na koncentraci měřených roztoků (μmol/l). Z grafického vyhodnocení experimentu bylo možné usuzovat, že závislost chemiluminiscence na koncentraci testovaného anhydridu (13) exponenciálně vzrůstala a nejvyšší odezvy bylo dosaženo při koncentracích 1 a 2 μmol/l. U buněk, na které byl aplikován roztok dikyseliny (14), byl sice také zaznamenán exponenciální nárůst chemiluminiscence, nicméně

nedošlo až tak k výraznému nárůstu ve srovnání s anhydridem (13). U poslední testované látky nitrilu (10) byl zpozorován naopak pokles chemiluminiscence s rostoucí koncentrací. Vysvětlení tohoto faktu mohlo být hned několik počínaje cytotoxicitou látky, až po blokaci jaderného receptoru RAR konče. Proto byly následně provedeny testy toxicity MTT.



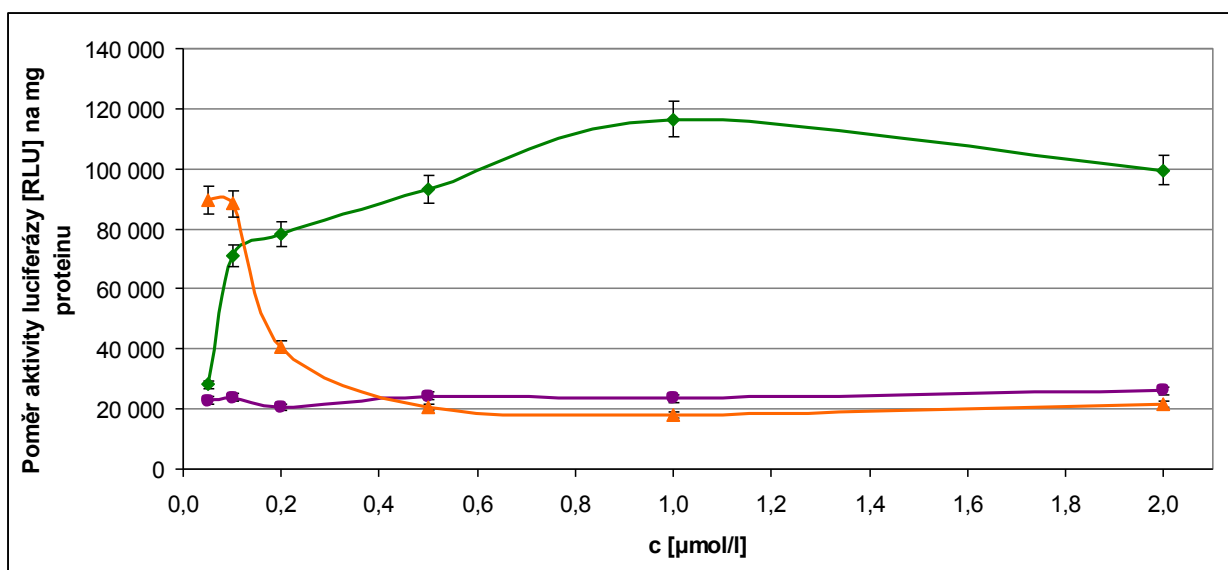
Obr. 50: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu RAR, obrázek vyjadřuje koncentrační závislost aktivity RAR testovanými látkami: anhydrid: zelená křivka s kosočtverci, dikyselina: fialová křivka s kruhy, nitril: oranžová křivka s trojúhelníky. Data jsou vyjádřena jako závislost chemilum luciferázy na koncentraci testované látky

Experiment III

Pro potvrzení naměřených dat z Experimentu II byla proměřena identická koncentrační řada látek ještě jednou. Do HepG2 buněk byl transfekován plasmid RARE. Chemiluminiscence byla detekována opět jen pro luciferázu a naměřené hodnoty byly ještě doplněny o stanovení celkových proteinů metodou BCA. Experiment byl vyhodnocen graficky jako závislost poměru chemiluminiscence luciferázy ku koncentracím testovaných látek ($\mu\text{mol/l}$). Měření bylo prováděno s 95% přesností, jako negativní kontrola posloužily triplety obsahující pouze DMSO (0,5 a 2,5 μl /jamku), pro ověření funkčnosti plasmidu byl během experimentu použit triplet obsahující ATRA (1 $\mu\text{mol/l}$).

Grafické vyhodnocení Experimentu III potvrdilo závěry z předešlého Experimentu II. Tedy anhydrid (13) vykazuje nejvyšší aktivitu na retinoidních receptorech při koncentraci 1 až 2 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty detekované chemiluminiscence a tedy i aktivity na RAR u dikyseliny (14) byly během Experimentu III rovněž nejvyšší při koncentracích 1-2 $\mu\text{mol/l}$, nicméně při

srovnání s Experimentem I, kdy dosahovala chemiluminiscence dikyseliny (14) nejvyšších hodnot při nejvyšších koncentracích (50 $\mu\text{mol/l}$), bylo možné předpokládat, že aktivita této látky vzrůstá s koncentrací. Jelikož koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ byla nejvyšší měřená, nebylo možné určit, při jakém množství dojde k nasycení receptoru a tedy kdy již nebude aktivita dikyseliny (14) vzrůstat. Zároveň ale míra detekované chemiluminiscence dikyseliny (14) při koncentraci 2 $\mu\text{mol/l}$ byla v řádech desetitisíců nižší než u anhydridu (13). Experiment III také potvrdil naměřená data u nitrilu (10), který vykazoval nejvyšší detekovanou chemiluminiscenci při koncentracích 0,05 a 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

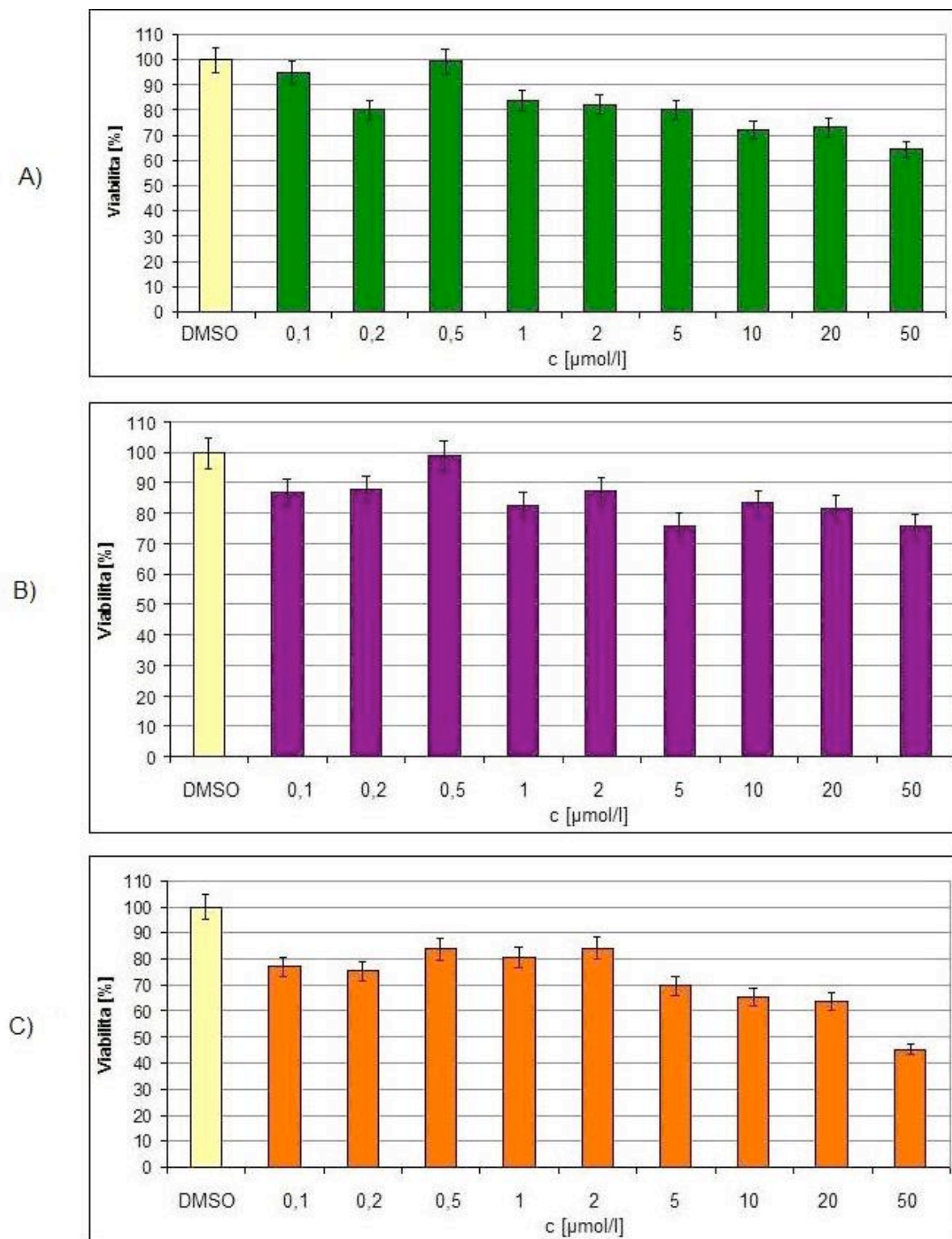


Obr. 51: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu RAR, obrázek vyjadřuje koncentrační závislost aktivity RAR testovanými látkami: anhydrid: zelená křivka s kosočtverci, dikyselina: fialová křivka s kruhy, nitril: oranžová křivka s trojúhelníky. Data jsou vyjádřena jako poměr aktivity luciferázy na množství proteinu ve vzorku versus koncentrace testované látky

MTT I

Pro základní screening toxického působení látek na viabilitu buněk byl proveden MTT test. Testovány byly veškeré použité koncentrace během Experimentů I, II, III s výjimkou nejnižší 0,05 $\mu\text{mol/l}$. Každá koncentrace byla měřena v tripletu a z naměřených hodnot absorbance byl vypočítán aritmetický průměr. Od hodnot tohoto průměru byla odečtena absorbance pozadí, tedy blanku. Výsledky byly udávány v procentech jako poměr korigovaných absorbancí vzorku a standardu, tedy DMSO. Viabilita buněk v tripletech standardu dosahovala 100% . Pro koncentrace vzorků 0,1 až 10 $\mu\text{mol/l}$ byl používán standard DMSO o koncentraci 0,001 $\mu\text{mol/l}$, pro vyšší koncentrace vzorků (20 a 50 $\mu\text{mol/l}$) byly do výpočtu použity hodnoty

standardu DMSO o koncentraci 0,005 $\mu\text{mol/l}$. Měření bylo prováděno s 95% přesností a získané data byla graficky vyhodnocena.



Obr. 52: Grafické vyhodnocení MTT I testu, panel A) anhydrid, panel B) dikyselina, panel C) nitril,

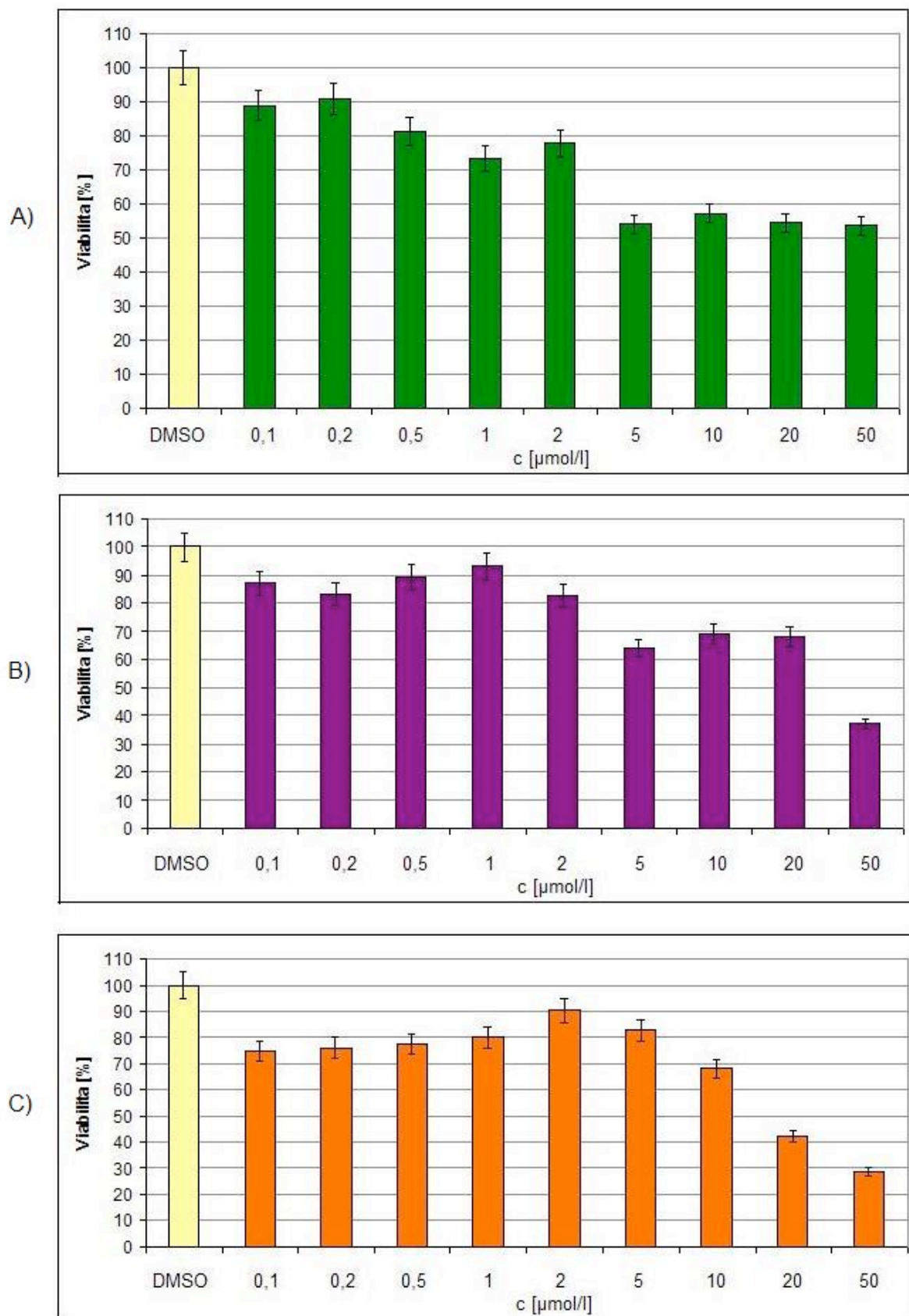
1. sloupec je pouze DMSO s viabilitou 100%

MTT II

Pro ověření experimentální dat z MTT I byl experiment zopakován. Výsledky byly shrnuty do níže uvedené Tabulky 7 a poté byly graficky vyhodnoceny. I když nebyly hodnoty zcela totožné, tendence výsledků obou experimentů se shodovaly.

Jak z experimentu MTT I tak z MTT II bylo možné vyvozovat, že u všech tří látek byla viabilita nejvyšší pro první tři koncentrace (0,1; 0,2; 0,5 $\mu\text{mol/l}$). Od koncentrace 1 $\mu\text{mol/l}$ dále došlo k poklesu životaschopných buněk.

Anhydrid (13) vykazoval nejnižší toxicitu z testovaných retinoidů vůbec. Nicméně u koncentrací 2 až 50 $\mu\text{mol/l}$ byl již postřehnutelná cytotoxicita. Hodnoty viability buněk s aplikovanou dikyselinou (14) dosahovaly podobných hodnot jako u anhydridu (13). Nicméně procenta životaschopných buněk byly v řádech jednotek procent nižší. Třetí testovaná látka nitril (10) se ukázal v obou experimentech jako cytotoxický. Zvláště při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ dosahovalo procento životaschopných buněk sotva 50%. Tento fakt může vysvětlovat nízké hodnoty naměřené chemiluminiscence a tedy i aktivity nitrilu na jaderných receptorech RAR.



Obr. 53: Grafické vyhodnocení MTT II testu, panel A) anhydrid, panel B) dikyselina, panel C) nitril, 1. sloupec je pouze DMSO s viabilitou 100%

5. Experimentální část

5.1. Příprava výchozí látky

5.1.1. Příprava nitrilu

Ke směsi β -iononu (9) (0,5827 g) a kyseliny kyanooctové (0,51850 g, 2 ekv.) v 15 ml toluenu byl pomalu přikapáván piperidin (0,6 ml, 2 ekv.) za neustálého chlazení na 0 °C. Následně spolu s dostatečným množstvím molekulového síta (9,1 g) byla směs refluxována pod zpětným chladičem po dobu 12 hod. Případné zbytky neabsorbované vody, která vznikla kondenzací, byly odstraněny přidávkem Na₂SO₄. Molekulové síto a hydrát Na₂SO₄ byly odděleny filtrací. Následně byl produkt (10) zahuštěn na vakuové odparce. Z důvodu přítomnosti nečistot bylo nezbytné surovou směs přečistit sloupcovou chromatografií (SiO₂, DCM). Po purifikaci a opětovném odpaření rozpouštědla vznikla žlutá olejovitá látka. Vzhledem k faktu, že reakce měla očekávaný průběh i dobré výtěžky, byl experiment proveden v dalších třech šaržích (viz Tabulka 3).

| | I | II | III | IV |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| <i>m</i> (β -ionon) [g] | 0,5862 | 5,5861 | 5,5867 | 5,6013 |
| <i>m</i> (kyanooctová kys.) [g] | 0,52 | 5,1837 | 5,1598 | 5,1942 |
| <i>V</i> (piperidin) [ml] | 0,6 | 6 | 6 | 6 |
| <i>V</i> (toluen) [ml] | 10 | 100 | 100 | 100 |
| <i>m</i> (mol. síto) [g] | 1,01 | 9,15 | 9,2 | 9,13 |
| <i>m</i> (surový produkt) [g] | 0,59 | 4,90 | 5,16 | 6,43 |
| <i>m</i> (čistý produkt) [g] | 0,26 | 2,62 | 2,66 | 4,75 |
| Relativní výtěžek reakce [%] | 39,6 | 41,9 | 42,5 | 75,7 |
| Relativní čistota [%] | 99% | | | |

Tab. 3: Přehled navážek a výtěžků přípravy nitrilu

5.1.2. Příprava (β -ioniliden)acetaldehydu

K roztoku nitrilu (10) (0,2 g) v bezvodém DCM (20 ml) v inertní Ar atmosféře byl přidán 1,0 M DiBAL-H v DCM (1,115 ml). Reakce probíhala za neustálého chlazení a míchání 2 hod. Po zreagování bylo ke směsi přidáno malé množství 1M H₂SO₄ tak, aby výsledné pH roztoku bylo rovno 4. Následně byla organická vrstva oddělena a sušena pomocí Na₂SO₄. Po zfiltrování bylo odpařeno rozpouštědlo a produkt (β -ioniliden)acetaldehyd (11) byl ještě přečištěn na sloupcové chromatografii (SiO₂, DCM). Jelikož bylo experimentem dosaženo požadovaného produktu v dobrých výtěžcích, byla reakce zopakována v dalších třech šaržích, navážky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce (Tabulka 4).

| | I | II | III | IV |
|--|--------|--------|--------|--------|
| <i>m(nitril)</i> [g] | 0,2000 | 0,1982 | 0,2016 | 2,0202 |
| <i>m(DiBAL-H)</i> [ml] | 1,115 | 1,115 | 1,115 | 12,370 |
| <i>V(DCM)</i> [ml] | 20 | 20 | 20 | 100 |
| <i>m(aldehyd)</i> [g] | 0,1070 | 0,0979 | 0,1091 | 0,8215 |
| <i>Relativní výtěžek reakce</i> [%] | 52,8 | 48,7 | 53,4 | 40,1 |
| <i>Relativní čistota</i> [%] | 93,8 | 94,6 | 93,2 | 94,2 |

Tab. 4: Přehled navážek a výtěžků přípravy (β -ioniliden)acetaldehydu

5.1.3. Příprava anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Do baňky s inertní Ar atmosférou byl vnesen anhydrid kyseliny β -methylglutakonové (5) (0,664 g) rozpuštěný v bezvodém THF (5 ml). Po ochlazení na ledové lázni byl přes septum přidán aldehyd (11) (1,08 g), který byl předem rozpuštěn v bezvodém THF (1 ml). Po opětovném ochlazení směsi byl pomalu přikapáván pyridin (100 μ l). Po 2 hod. byla reakční směs zředěna diethyletherem (50 ml) a vysušena pomocí Na₂SO₄. Vzniklý hydrát byl odfiltrován a po odpaření rozpouštědla z filtrátu vznikla sytě červená látka gumové konzistence. Tento postup byl proveden ve třech šaržích.

| | I | II | III |
|--|----------|-----------|------------|
| <i>m</i> (aldehyd) [g] | 0,1599 | 0,25 | 0,4782 |
| <i>m</i> (anhydrid kys. β -methylglutakonové) [g] | 0,0978 | 0,154 | 0,294 |
| <i>V</i> (pyridin) [ml] | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| <i>m</i> (anhydrid kys. 13-cis-12-karboxyretinové) [g] | 0,2390 | 0,3727 | 0,6677 |
| Relativní výtěžky reakce [%] | 99,7 | 99,4 | 93,1 |

Tab. 5: Přehled navážek a výtěžků přípravy anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

5.1.3.1. Příprava anhydridu kyseliny β -methylglutakonové

Směs 3-methylglutakonové kyseliny (I) (0,47 g) a Ac_2O (0,75 ml) byla zahřívána při 70 °C po dobu 1 hod. Následně bylo rozpouštědlo odstraněno v lyofilizátoru. Výsledný produkt - anhydrid kyseliny β -methylglutakonové (12) - byla krystalická oranžová látka. Reakce byla provedena ve dvou šaržích.

| | I | II |
|--|----------|-----------|
| <i>m</i> (3-methylglutakonová kys.) [g] | 0,4371 | 0,864 |
| <i>V</i> (Ac_2O) [ml] | 0,75 | 1,50 |
| <i>m</i> (anhydrid kys. β -methylglutakonové) [g] | 0,3552 | 0,5829 |
| Relativní výtěžek reakce [%] | 68,5 | 56,8 |

Tab. 6: Přehled navážek a výtěžků přípravy anhydridu kyseliny β -methylglutakonové

5.2. Reaktivita anhydridu kyseliny 13-cis-13-karboxyretinové

5.2.1. Příprava propylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové

Během prvního a druhého experimentu byla použita pouze analytická množství anhydridu (13) a nadbytek propylaminu (II). Při třetím experimentu bylo již přesně navážené množství anhydridu (13) (46,2 mg) rozpuštěno v DMSO (0,5 ml), potom byl přidán nadbytek pro-

pylaminu (0,85 ml). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 7 hod. Experiment byl ještě zopakován s reakčními časy 12 a 24 hod. Výsledná směs vždy obsahovala 4 izomery propylamidu, jak nastínila analýza HPLC-MS. Proto byla posléze u třetího experimentu provedena purifikace produktu na preparativním HPLC. Rozpouštědlo bylo po separaci následně odpařeno na vakuovém koncentrátoru a získaný produkt (17) byl vyizolován ve formě žlutého oleje. Surové finální směsi bylo připraveno 67,7 mg. Purifikací bylo odděleno 1,4 mg a 1,8 mg dvou frakcí propylamidu (17). Relativní výtěžek reakce po chromatografickém čištění byl 6%.

5.2.2. Příprava piperidinylamidu kyseliny 13-cis-karboxyretinové

Příprava piperidinylamidu byla provedena třikrát. Pvní experiment pracoval s analytickým množstvím anhydridu (13). Při druhém a třetím experimentu byl navážen a rozpuštěn anhydrid (13) (6,6 mg, 41 mg) ve DMSO (1,5 ml, 2 ml), následně byl napipetován nadbytek piperidinu (0,200 ml; 2,00 ml). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě 12 hod. Po odpaření rozpouštědla a analyzování výsledné směsi, bylo zřejmé na záznamu analýzy HPLC-MS přítomnost několika blíže nespecifikovaných izomerů piperamidu (18), proto pro další biologické testování byla směs produktů třetího experimentu přečištěna na preparativním HPLC. Hmotnost surového produktu byla 68,4 mg. Po purifikaci bylo vyizolováno pouze 1,1 mg. Relativní výtěžek reakce činil 1,7%.

5.2.3. Příprava esterů kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Alkalická methanolýza s následným okyselením HCl

Do slzové baňky byl navážen anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) (196,6 mg) a následně byl rozpuštěn v methanolickém roztoku NaOH (50 mg/ml) (16 ml) a míchán za laboratorní teploty. Doba reakce byla 48 hod. Po okyselení 10% HCl na pH 4 byla reakční směs extrahována diethyletherem. Ten byl následně odstraněn na vakuové odparce. Analýza HPLC-MS prokázala uplnou hydrolýzu methylesteru (19) za vzniku kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14). Karboxylové kyseliny (14) bylo připraveno 206 mg, což odpovídá relativnímu výtěžku 99,3%.

Alkalická ethanolýza s následným okyselením H₂SO₄

Do předem připraveného bezvodého ethanolického roztoku NaOH (50 mg/ml) (4 ml) byla přidána navážka anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) (48,6 mg, 45,5 mg), reakce probíhala 1,5 hod. za laboratorní teploty a za neustálého míchání. Posléze byl roztok

okyselen 5% H_2SO_4 na pH 3 a urychleně byla provedena extrakce do diethyletheru. Následně bylo provedeno odpaření rozpouštědla na vakuovém koncentrátoru. Experimentem bylo připraveno 37,6 mg a 64,4 mg surového produktu. Druhá šarže byla přečištěna na preparativním HPLC. Purifikací byly vyizolovány dvě frakce obsahující 0,9 mg a 1,9 mg ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20). Relativní výtěžek reakce činil 5,4 %.

5.2.4. Příprava kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové

Do baňky bylo umístěno analytické množství anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13), který byl poté rozpuštěn v dostatečném množství THF. K čirému roztoku byla přidána destilovaná voda, přidavkem došlo k zakalení. Následně byl opět přidán malý objem THF. Reakční směs byla následně ochlazená na ledové lázni na 0 °C. Za neustálého míchání byl přidán roztok NaOH (40 mg/ml, 1 mol). Přidavkem došlo ke změně barvy roztoku z žlutého na červený, potom reakce probíhala dalších 12 hod. Následně byla provedena opakovaná extrakce do diethyletheru, přičemž vodná fáze byla okyselena 10 % H_2SO_4 a znovu extrahována diethyletherem. Následně byla organická fáze vysušena Na_2SO_4 , zfiltrována a odpařena na vakuovém koncentrátoru.

6. Závěr

Cílem této práce bylo připravit nové deriváty retinoidů s potenciálem působit na retinoidní receptory buněk a ovlivňovat tak expresi určitých genů.

Nejprve byl připraven pomocí reprodukováných postupů anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové. Posléze byla u této látky zkoumána reaktivita. Na základě získaných experimentálních dat byly připraveny následující produkty: propylamid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (17), piperidinylamid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (18), ethylester kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20), kyselina 13-cis-12-karboxyretinová (14).

V biologické části práce pak byly testovány veškeré retinoidy které byly během chemické syntézy připraveny a izolovány v dostatečném množství. Jako buněčný model sloužila linie HepG2. Interakce látek s RAR byla monitorována chemiluminiscencí luciferázy, která byla regulována právě transkripční aktivitou RAR. Z naměřených dat bylo možné vyvozovat, že připravené retinoidy nedosahují stejné míry aktivity oproti ATRA. Nicméně zejména nitril (10), kyselina 13-cis-12-karboxyretinová (14) a anhydrid kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13) vykazovaly zvýšenou schopnost aktivovat jaderné retinoidní receptory (RAR). Poslední dvě látky zmiňované dosahovaly nejlepších výsledků při koncentraci 1-2 $\mu\text{mol/l}$. Zároveň ani anhydrid (13), ani kyselina (14) nevykazovaly zvýšenou míru cytotoxicity, cytotoxické vlastnosti byly ale zjištěny u nitrilu (10).

7. Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---------------------------------------|
| 4-HPR: N-(4-hydroxyphenyl)retinamide | N-(4-hydroxyfenyl)retinamid |
| A: adenine | adenin |
| ADH: alcohol dehydrogenase | alkohol dehydrogenáza |
| APL: acute promyelocytic leukemia | akutní promyelocytární leukemie |
| ATP: adenosinetriphosphate | adenosintrifosfát |
| ATRA: all- <i>trans</i> retinoic acid | kyselina all- <i>trans</i> retinová |
| BCO1: beta-carotene 15-15'-oxygenase | beta-karoten 15-15'-oxygenáza |
| C: cytosine | cytosin |
| CC: column chromatography | sloupcová chromatografie |
| CDK: cyclin dependent kinase | cyklin dependentní kináza |
| cGMP: cyclic guanosine monophosphate | cyklický guanosin monofosfát |
| CM: chilomicrone | chilomikron |
| CRABP: | |
| cellular retinoic acid binding protein | buněčný vazebný protein kys. retinové |
| CRALBP: cellular retinal binding protein | buněčný retinalový vazebný protein |
| CRBP: cellular retinol binding protein | buněčný retinolový vazebný protein |
| CYP: cytochrome P450 | cytochrom P450 |
| DBD: DNA-binding domain | doména vázající se na DNA |
| DCM: dimethylsulfoxide | dimethylsulfoxid |
| DGAT: acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2 (EC: 2.3.1.75 a EC: 2.3.1.76) | |
| DiBAL-H: diisobutylaluminium hydride | diisobutylaluminium hydrid |
| DMSO: dimethyl sulfoxide | dimethyl sulfoxid |
| G: guanine | guanin |
| LBD: ligand-binding domain | doména vázající ligand |
| LRAT: lecithin retinol acyltransferase | lecitin retinol acyltransferáza |
| NAD⁺: nicotinamide adenine dinucleotide | nikotinamidadenindinukleotid |
| PNPLA 4: patatin-like phospholipase domain containing 4 (EC: 3.1.1.3) | |
| RA: retinoic acid | kyselina retinová |
| RALDH: retinaldehydrogenase | retinal dehydrogenáza |
| RAR: retinoic acid receptor | receptor kyseliny retinové |
| RARE: retinoic acid responsive element | responzivní element kyseliny retinové |
| RBP: retinol binding protein | retinolový vazebný protein |

| | |
|---|--|
| RDH: retinol dehydrogenase | retinol dehydrogenáza |
| REH: retinol ester hydrolase | retinol ester hydroláza |
| RNA: ribonucleic acid | ribonukleová kyselina |
| RXR: retinoid X receptor | retinoidový receptor |
| RXRE: retinoids responsive element | responzivní element retinoidů |
| SDR: | dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem |
| STRA6: | receptor RBP |
| T: thymine | thymin |
| THF: tetrahydrofurane | tetrahydrofuran |
| TLC: thin layer chromatography | tenkovrstvá chromatografie |
| TTR: transthyretin | transthyretin |
| U: uracil | uracil |
| UPLC-MS: | |
| ultra performed liquid chromatography | vysoko-účinná kapalinová chromatografie |

8. Seznam použité literatury

1. BLOMHOFF R., BLOMHOFF H. K.: Overview of Retinoid Metabolism and Function, *Journal of Neurobiology*. **2005**, 606-630.
2. BLOMHOFF R., GREEN M. H., BERG T. and NORUM K. R.: Transport and storage of vitamin A, *Science*. **1990**, 250, 399-404.
3. BLOMHOFF R., HELGERUND P., RASMUSSEN M., BERG T. and NORUM K. R.: In vitro uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver; evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells, *Proc Natl Acad Sci USA*. **1982**, 19, 7326-7330.
4. BLOMHOFF R., RASMUSSEN M., NILLSON A., NORUM K. R., BERG T., BLANER W. S., KATO M., et al.: Hepatic metabolism. Distribution of retinoids, enzymes and binding proteins in isolated rat liver cells. *J Biol Chem*. **1985**, 260, 13560-13565.
5. BLOMHOFF R., WAKE K.: Perisinusoidal stellate cells of the liver; important roles in retinol metabolism and fibrosis, *FABES J*. **1991**, 5, 271-277.
6. CHOVANCOVÁ S.: Využití retinoidů při diferenciacní terapii malignit. **2011**, 42.
7. CLIFFORD J. L., CVEK U., GILL J. N., CHEEPALA S. B., KLEINER H. E., LOGANANTHARAJ R., LYNCH M., MCMILLIAN A., SYED Z., TRUTSCHL M., YIN W.: Identification of the B-Raf/Mek/Erk MAP kinase pathway as a target for all-trans retinoic acid during skin cancer promotion, *Mol Cancer*. **2009**, 8:27
8. BARUA A. B., FURR H. C.: Properties of Retinoids. Structure, Handling, and Preparation, *Molecular Biotechnology*. **1998**, 10, 167-176.
9. SPORN M. B., ROBERTS A. B.: What is a retinoid?, *Ciba Found Symp*. **1985**, 113, 1-5.
10. SPORN M. B., ROBERTS A. B., Role of Retinoids in Differentiation and Carcinogenesis, *Cancer Research*. **1983**, 43, 3034-3040.
11. RIGAS J. R., DRAGNEV K. H.: Emerging role of retinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene, *Oncologist*. **2005**, 10, 22-33.
12. VAHLQUIST A.: What Are natural retinoids?, *Dermatology*. **1999**, 199, 3-11

13. ZÁHEJSKÝ J.: Zvení dermatologická terapie a kosmetika, Pohledy klinické, fyziologické a biologické, *Grada*. **2006**.
14. D'AMBROSIO D. N., CLUGSTON R. D., BLANER W. S.: Vitamin A: An Update, *Nutrients*. **2011**, 3(1), 63-103.
15. FIELDS A. L., SOPRANO D. R., SOPRANO K. J.: Retinoids in Biological Control and Cancer, *J Cell Biochem*. **2007**, 102: 886–898.
16. BRAMLEY P. M., FRASER P. D.: The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids, *Prog Lipid Res*. **2004**, 43, 228–265.
17. NAGAO A.: Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr*. **2004**, 134, 237-240.
18. HARRISON E. H.: Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* . **2005**, 25, 87–103.
19. HARRISON E. H.: Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids, *Biochim Biophys Acta*. **2012**, 1821 (1), 70-77.
20. FENG Y., YU Y. M., YIN M. Z., HONG L., CAI W.: Ectopic expression of retinoic acid receptors and change of myocardial structure in the offspring heart with vitamin A deficiency, *J Nutr Sci Vitaminol*. **2012**, 58, 5, 309-318.
21. WEST K. P. jr.: Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age, *J Nutr*. **2002**, 132, 11, 3432.
22. DUESTER G., MIC F. A., MOLOTKOV A.: Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid, *Chem Biol Interact*. **2003**, 143–144, 201–210
23. DUESTER G.: Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis, *Cell*. **2008**, 134 (6), 921- 931.
24. LI Z., SHEN J., WU W. K. K., WANG X., LIANG J., QIU G., LIU J. and Mc CORMICK D. L.: Vitamin A Deficiency Induces Congenital Spinal Deformities in Rats, *PLoS One*, **2012**. 7 (10), e46565.

25. MELENOTTE C., BROUQUI P., BOTELHO-NEVERS E.: Severe Measles, Vitamin A Deficiency, and the Roma Community in Europe, *Emerg Infect Dis.* **2012**, 18(9), 1537-1539.
26. MOORE T.: Vitamin A and carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. *Biochem J.* **1930**, 24, 692–702.
27. KARRER P., HELFENSTEIN A., WEHRLI H., WETTSTEIN A.: Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv Chim Acta.* **1930**, 13.
28. WOGGON W. D.: Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase, *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 8, 1397–1408.
29. KIEFER C., HESSEL S., LAMPERT J. M., VOGT K., LEDERER M. O., BREITHAUPT D. E., VON LINTING J.: Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A., *J Biol Chem.* **2001**, 76, 14110–14116.
30. WANG Q., WIEDER R.: All-trans retinoic acid potentiates Taxotere-induced cell death mediated by Jun N-terminal kinase in breast cancer cells, *Oncogene.* **2004**, 23, 426–433.
31. RETINOL METABOLISM. In: *KEGG DATABASE* [online]. [cit. 2013-04-22]. Dostupné z: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00830.
32. CROW A., ONG D. E.: Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1985**, 82, 4707–4711.
33. E X. ZHAG L., LU J., TSO P., BLANER W. S., LEVIN M. S., LI E.: Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II, *J Biol Chem.* **2002**, 277, 36617-36626.
34. BATTEN M. L., IMANISHI Y., MAEDA T., Tu D. C., MOISE A. R., BRONSON D. and POSSIN D.: Lecithin-retinol avyltransferase is essential for accumulation of all-trans retinyl esters in the eye and in the liver, *J. Biol Chem.* **2004**, 279, 10422-10432.
35. NEWCOMER M. E., ONG D. E.: Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin, *Biochim Biophys Acta.* **2000**, 1482, 57-64.

36. PETERSON P. A.: Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A, *J Biol Chem.* **1971**, 246, 44-49.
37. RONNE H., OCKLIND C., WIMAN K., RASK L., OBRINK B., PETERSON P. A.: Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin A on the secretion of the retinol-binding protein, *J Cell Biol.* 1983, 96, 907-910
38. GHYSENLINCK N. B., BAVIK C., SAPIN V., MARK M., BONIER D., HINDELANG C., DIETRICH A. et al.: Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis, *EMBO.* **1999**, 18, 4903-4914.
39. NAGY N. E., HOLVEN K. B., ROOS N., SENOO H., KOJIMA N., NORUM K. R. BLOMHOFF R.: Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats, *J Lipid Res.* **1997**, 38, 645-658.
40. KANAI M., RAZ A., GOODMAN D. S.: Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma, *J Clin Invest.* **1968**, 47, 2025-2044.
41. ZANOTTI G., BERNI R.: Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids and transthyretin, *Vitam Horm.* **2004**, 69, 271-295.
42. SOPRANO D. R., SOPRANO K. J., GOODMAN D. S.: Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat, *J Lipid Res.* **1986**, 27, 166-171.
43. GREEN M. H., GREEN J. B.: The use of model-based compartmental analysis to study vitamin A metabolism in a non-steady state, *Adv Exp Med Biol.* **2003**, 537, 159-172.
44. QUADRO L., BLANER W. S., SALCHOW D. J., VOGEL S., PIANTEDOSI R., GOURAS P., FREEMAN S. et al.: Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein, *EMBO J.* **1999**, 18, 4633-4644.
45. WYSS R., BUCHELI F.: Determination of endogenous level of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1997**, 700, 31-47.

46. HARTMANN S., BRORS O., BOCK J., BLOMHOFF R., BAUSCH J., WIEGAND U. W. HARTMANN D. et al.: Exposure retinyl esters, retinol, and retinoic acid in non-pregnant women following increase single an repeated oral doses of vitamin A, *Ann Nutr Metab.* **2005**, 49, 155-164.
47. EVERTS H. B., ONG D. E., SUNDBERG J. P.: Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat, *Exp Cell Res.* **2005**, 308: 309–319.
48. HASELBECK R. J., HOFFMANN I., DUESTER G.: Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways, *Dev Genet.* **1999**, 25, 353–364.
49. NIEDERREITHER K., McCAFFERY P., DRAGER U. C., CHAMBON P., DOLLE P.: Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development, *Mech Dev.* **1997**, 62, 67–78.
50. LI E., TSO P.: Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol.* **2003**, 14, 241–247.
51. NAPOLI J. L.: Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* **1999**, 1440, 139-162.
52. NAPOLI J. L., RACE K. R.: Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal, *J Biol Chem.* **1988**, 263, 17372–17377.
53. WHITE J. A., BECKETT-JONES B., GUO Y. D., DILWORTH F. J., BONASORO J., JONES G., PETKOVICH M.: cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450, *J Biol Chem.*, **1997**, 272, 18538-18541.
54. WHITE J. A., RAMSHAW H., TAIMI M., STANGLE W., ZHANG A., EVERIGHAM S., CREIGHTON S. et al.: Identification of the human cytochrome P450, p450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2000**, 97, 6403-6408.
55. SWINDELL E. C., THALLER C., SOCOKANATHAN S., PETKOVICH M., JESELL T. M., EICHELE G.: Complementary domains for retinoic acid production and degradation in the early chick embryo, *Dev Biol.* **1999**, 216, 218-296.

56. REIJNTJES S, BLENTIC A, GALE E, MADEN M.: The control of morphogen signalling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol.* **2005**, 285, 224-237.
57. FROLIK C.: Metabolism of retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. *The Retinoids*, New York: *Academic Press*. **1984**, 177–208.
58. KUMBALASIRI T., PROVENCIO I.: Melanopsin and other novel mammalian opsins, *Exp Eye Res.* **2005**, 81, 368-375.
59. BENINGTON J.: Why do things look black and white in moonlight?, Department of biology St. Bonaventure University. [online]. 2011 [cit. 2013-03-04]. Dostupné z: <http://prohumanextremist.wordpress.com/tag/light/>.
60. STRYER L.: *Biochemistry*. 4th ed. *New York*: W.H. Freeman, c1995, xxxiv, 1064 p. ISBN 07-167-2009-4.
61. Mc CAFFERY P., MAY P., DRAGER U. C.: Light-mediated retinoic acid production. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1996**, 93, 12570-12574.
62. MANGELSDORF D. J., UMESONO K., EVANTS R. M.: The retinoid receptors, *Raven Press, New York*. **1994**, 83, 319-349.
63. CHAMBON P., KASTNER P., LEID M.: Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathway, *Trends Biochem Sci.* **1992**, 17, 427–433.
64. CHAMBON P.: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *Faseb J.* **1996**, 10(9), 940-954.
65. RENAUD J.P., MORAS D.: Structural studies on nuclear receptor, *Cell Mol Life Sci.* **2000**, 57(12), 1748-1769.
66. SZANTO A., NARKAR V., SHEN Q., URAY I. P., DAVIES P. J., NAGY L.: Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions, *Cell Death Differ.* **2004**, 11, 2, 126-143.
67. KASTNER P, MARK M, CHAMBON P.: Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life?, *Cell.* **1995**, 83, 859–869.

68. PETKOVICH M.: Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors, *Annu Rev Nutr.* **1992**,12, 443–471.
69. PETKOVICH M., BRANF N.J., KRUST A., CHAMBON P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors, *Nature.* **1987**, 330,444–450.
70. ALLENBY G., OCQUEL M. T., GRIPO J. F., CHAMBON P., KASTNER P., KAZMER S., LEVIN A. A., LOVEY A., ROSENBERGER M., SAUNDERS M., SPECK J.: Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids, *Proc Natl Acad Sci USA.* **1993**, 90, 30-34.
71. BASTIEN J., ROCHETTE-EGLY C.: Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes, *Gene.* **2004**, 328, 1–16.
72. FONTANA J. A., RISHI A. K.: Classical and novel retinoids: their targets in cancer therapy, *Leukemia.* **2002**, 16, 463–472.
73. ZECHEL C., SHEN Q. X., CHEN Y. J., CHEN Z. P., CHAMBON P., GRONEMEYER H.: The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats, *EMBO.* **1994**, 13(6), 1425-1433.
74. IVANOVA T., PETRENKO A., GRITSKO T., VINOKOUROVA S., ESHILEV E., KOBZEVA V., KISSELJOV F., KISSELJOVA N.: Methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β 2 gene in cervical cancer, *BCM Cancer.* **2001**, 2, 4.
75. NARAYAN G., ARIAS-PULIDO H., KOUL S., VARGAS H., F ZHANG F., VILLELLA J., SCHNEIDER A., B TERRY M., MANSUKHANI M., MURTY V.: Frequent Promoter Methylation of *CDHI*, *DAPK*, *RARB*, and *HIC1* Genes in Carcinoma of Cervix Uteri: Its Relationship to Clinical Outcome, *Molecular Cancer.* **2003**, 2, 1, 24.
76. ABU J, BATUWANGALA M, HERBERT K, SYMONDS P.: Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer, *Lancet Oncol.* **2005**, 6(9), 712-720.
77. BENSON M. J., NOELLE R. J., PINO-LAGOS K.: Retinoic Acid in the Immune System, *Ann NY Acad Sci.* **2008**. 1143, 170–187.

78. NOY N.: Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem. J.* **2000**, 348, 481–495.
79. WOLBACH S. HOWE P.: Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin, *J Exp Med.* **1925**, 42, 753-777.
80. BOLLAG W.: Retinoids and cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1979**, 3, 207-215.
81. MAYER H., BOLLAG W., HANNI R., RUEGG R.: Retinoids, a new class of compounds with prophylactic and therapeutic activities in oncology and dermatology, *Experientia.* **1978**, 34, 1105-1119.
82. SAFFIOTTI U., MONTESANO R., SELLA Kumar A. R., BORG S. A.: Experimental cancer of lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors, *Cancer.* **1967**, 20, 857-864.
83. LOTAN R.: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells, *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, 605, 33-91.
84. BERTRAM J. S., MORDAN L. J., DOMANSKA-JANIK K. and BERNACKI R. J.: Inhibition of In vitro neoplastic transformation by retinoids, *Molecular Interrelations of Nutrition and Cancer.* **1982**, 315-335.
85. BOREK C.: Vitamins and micronutrients modify carcinogenesis and tumor promotion in vitro, *Raven Press.* **1982**, 337-350.
86. BREITMAN T. R., COLLINS S. J., KEENE B. R.: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid, *Blood.* **1981**, 57, 1000-1004.
87. CHASSAING N., GOLZIO C., ODENT S., LEQUEUX L., VIGOUROUX A., et al.: Phenotypic spectrum of STRA6 mutations: from Matthew-Wood syndrome to nonlethal anophthalmia, *Hum. Mutat.* **2009**, 30, 673–681
88. ISKEN A., GOLCZAK M., OBERHAUSER V., HUNZELMANN S., DRIEVER W., et al.: RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome, *Cell Metab.* **2008**, 7, 258–68.

89. LIU L., GUDAS L. J.: Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 40226–34.
90. TANG X. H., GUDAS L. J., KOUL S., VARGAS H., ZHANG F. F., VILLELLA J., SCHNEIDER A., TERRY M. B., MANSUKHANI M., MURTY V.: Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer. *Molecular Cancer*. **2010**, 2, 1, 24.
91. SANDELL L. L., SANDERSON B. W., MOISEYEV G., JOHNSON T., MUSHEGIAN A., et al.: RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development, *Genes Dev.* **2007**, 21, 1113–24.
92. KIM H., LAPOINTE J., KAYGUSUZ G., ONG D. E., LI C., et al.: The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res.* **2005**, 65, 8118–24.
93. OSANAI M., SAWADA N., LEE G. H.: Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1, *Oncogene*. **2010**, 29, 1135–44.
94. SATYANARAYANA A., KALDIS P.: Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms, *Oncogene*. **2009**, 28, 2925–39.
95. MALUMBRES M., BARBACID M.: Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*. **2009**, 9, 153–66.
96. MONGAN N. P., GUDAS L. J.: Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment, *Differentiation*. **2007**, 75, 853–70.
97. FARIA T. N., MENDEKSIHN C., CHAMBON P., GUDAS L. J.: The targeted disruption of both alleles of RAR β 2 in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 26783–88.
98. SUZUI M., SHIMIZU M., MASUDA M., LIM J. T., YOSHIMI N., WEINSTEIN I. B.: Acyclic retinoid activates retinoic acid receptor β and induces transcriptional activation of p21CIP1 in HepG2 human hepatoma cells, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3, 309–16.
99. CHEN H., ZHANG H., LEE J., LIANG X., WU X., et al.: HOXA5 acts directly downstream of retinoic acid receptor β and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition, *Cancer Res.* **2007**, 67, 8007–13.

100. ALTUCCI L., LEIBOWITZ M. D., OGILVIE K. M., de LERA A. R., GRONEMEYER H.: RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 793–810.
101. XU X. C.: Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor β in cancer, *Cancer Lett.* **2007**, 253, 14–24.
102. PARK E. Y., DILLARD A., WILLIAMS E. A., WILDER E. T., PEPPER M. R., LANE M. A.: Retinol inhibits the growth of all-*trans*-retinoic acid-sensitive and all-*trans*-retinoic acid-resistant colon cancer cells through a retinoic acid receptor-independent mechanism, *Cancer Res.* **2005**, 65, 9923–33.
103. KIM J. K., DIEHL J. A.: Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer, *J. Cell Physiol.* **2009**, 220, 292–96.
104. MA Y., FENG Q., SEKULA D., DIEHL J. A., FREEMANTLE S. J., DMITROVSKY E.: Retinoid targeting of different D-type cyclins through distinct chemopreventive mechanisms, *Cancer Res.* **2005**, 65, 6476–83.
105. BAO G. C., WANG J. G., JONG A.: Increased p21 expression and complex formation with cyclin E/CDK2 in retinoid-induced pre-B lymphoma cell apoptosis, *FEBS Lett.* **2006**, 580, 3687–93.
106. NAKA K., YOKOZAKI H., DOMEN T., HAYASHI K., KUNIYASU H., et al.: Growth inhibition of cultured human gastric cancer cells by 9-*cis*-retinoic acid with induction of cdk inhibitor Waf1/Cip1/Sdi1/p21 protein, *Differentiation.* **1997**, 61, 313–20.
107. NAKAMURA M., MATSUO T., STAUFFER J., NECKERS L., THIELE C. J.: Retinoic acid decreases targeting of p27 for degradation via an N-myc-dependent decrease in p27 phosphorylation and an N-myc-independent decrease in Skp2, *Cell Death Differ.* **2003**, 10, 230–39.
108. LUO P., LIN M., LIN M., CHEN Y., YANG B., HE Q.: Function of retinoid acid receptor α and p21 in all-*trans*-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic leukemia apoptosis, *Leuk. Lymphoma.* **2009**, 50, 1183–89.

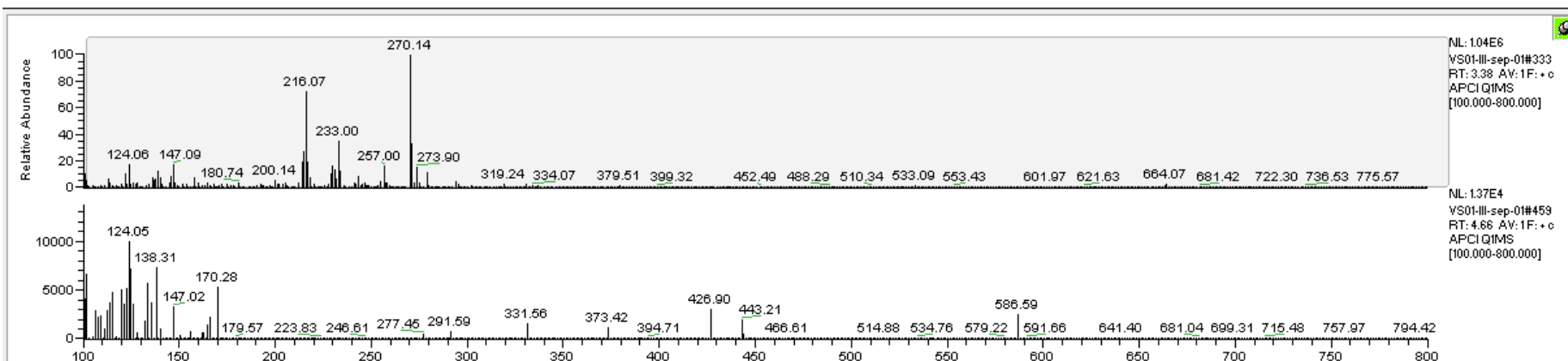
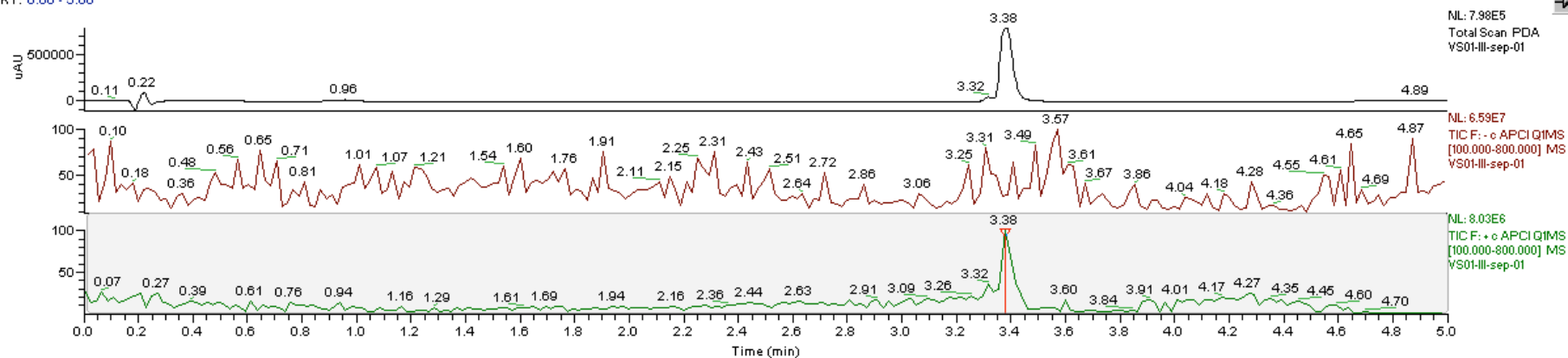
109. CHIU H. J., FISCHMAN D. A., HAMMERLING U.: Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation, *FASEB J.* **2008**, 22, 3878–87
110. HARRIS N. L., JAFFE E. S., STEIN H., BANKS P. M., CHAN J. K. C., CLEARY M. L. et al., A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group, *Blood J.* **1994**, 84, 1361-1392.
111. ANDREOLA F., DE LUCA L.M., HANSEN L.A., KELLOFF G.J., ROSS S.A., SIGMAN C.: Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy, *Carcinogenesis.* **2000**, 21, 1271-1279.
112. CHEN Z., WANG Z.-I.: Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable, *Blood.* **2008**, 111, 2505-2515.
113. LICHT J. D., MELNICK A., SIRULNIK A., ZELENY A.: Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants, *Best Pract Res Clin Haematol.* **2003**, 16, 387–408
114. BASTIE J. N., BALITRAND N., GUILLEMOT I., CHOMIENNE C., DELVA L.: Cooperative action of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid in NB4 acute promyelocytic leukemia cell differentiation is transcriptionally controlled, *Experimental Cell Research.* **2005**, 310, 2, 319-330.
115. REGO E. M.: Molecular basis of Acute Myelogenous Leukemia, *Rev Bras Hematol Hemoter.* **2002**, 24, 3.
116. MELNICK A., LICHT J. D.: Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia, *Blood.* 1999, 15, 93, 10, 3167-215.
117. SHINKE C., SWANTI G., BHAGAT T. D., ZHOU L., YONGAKI M., GALLAGHER R., KABALKA G.W., PLATANIAS L. C., VERMA A. and DAS B.: Design and synthesis of novel derivatives of all-trans retinoic acid demonstrate the combined importance of acid moiety and conjugated double bonds in its binding to PML-RAR- α -oncogene in acute promyelocytic leukemia, *Leukemia & Lymphoma.* **2010**, 51, 6, 1108-1114.

118. DAWSON M. I., XIA Z., LIU G., FONTANA J. A., FARHANA L., PATEL B. B., et al.: An Adamantyl-Substituted Retinoid-Derived Molecule That Inhibits Cancer Cell Growth and Angiogenesis by Inducing Apoptosis and Binds to Small Heterodimer Partner Nuclear Receptor: A Effects of Modifying Its Carboxylate Group on Apoptosis, Proliferation, and Protein-Tyrosine Phosphatase Activity, *Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 50, 11, 2622-2639.
119. CURTIS T., WILLIAMS D. G.: Introduction to Perfumery, *Micelle Press*. **2008**, ii, 800, ISBN 978-1-87022824-4.
120. VALLA A., VALLA B., LE GUILLOU R., CARTIER D., DUFOSSÉ L. and LABIA R.: New synthesis of retinal and its acyclic analog γ -retinal by an extended aldol reaction with a C6 building block that incorporates a C5 unit after decarboxylation. A formal route to lycopene and β -carotene, *Helvetica Chimica Acta*. **2007**, 90, 512-518.
121. NODA, C., ALT G. P., WERNECK R. M., HENRIQUES C. A., MONTEIRO J. L. F., LABIA R.. Aldol Condensation of Citral with Acetone on Basic Solid Catalysts, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **1998**, 15, 2.
122. LEWIN A. H., WHALEY M. G., PARKER S. R., CARROLL F. I., MORELAND CH. G, FLEISCHMANN P. and WATANABE N.: 12-Carboxyretinoic acids. Synthesis and structure, *The Journal of Organic Chemistry*. **1981**, 47, 10, s. 1799-1807.
123. POLYACHENKO L. N., et al.: Synthetic studies of polyene compounds. XLVIII. Structure and reactions of 12-(hydroxycarbonyl)retinoic acids and their esters. Synthesis of 13-cis-retinoic acid, *Zhurnal Organicheskoi Khimii*. **1985**, 21, (4), 756-66.
124. NAGIA A., RAO B. M., PRASUNA G.: Facile synthesis of anhydromevalonolactone from ethyl acetonacetate, *Synthetic communications*. **1992**, 22, 4, 593-602.
125. DE THÉ H., LALLEMAND-BREITENBACH V.: PML Nuclear Bodies, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2010**.
126. HERR F. M., ONG D. E.: Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry*. **1992**, 31, 6748–6755.

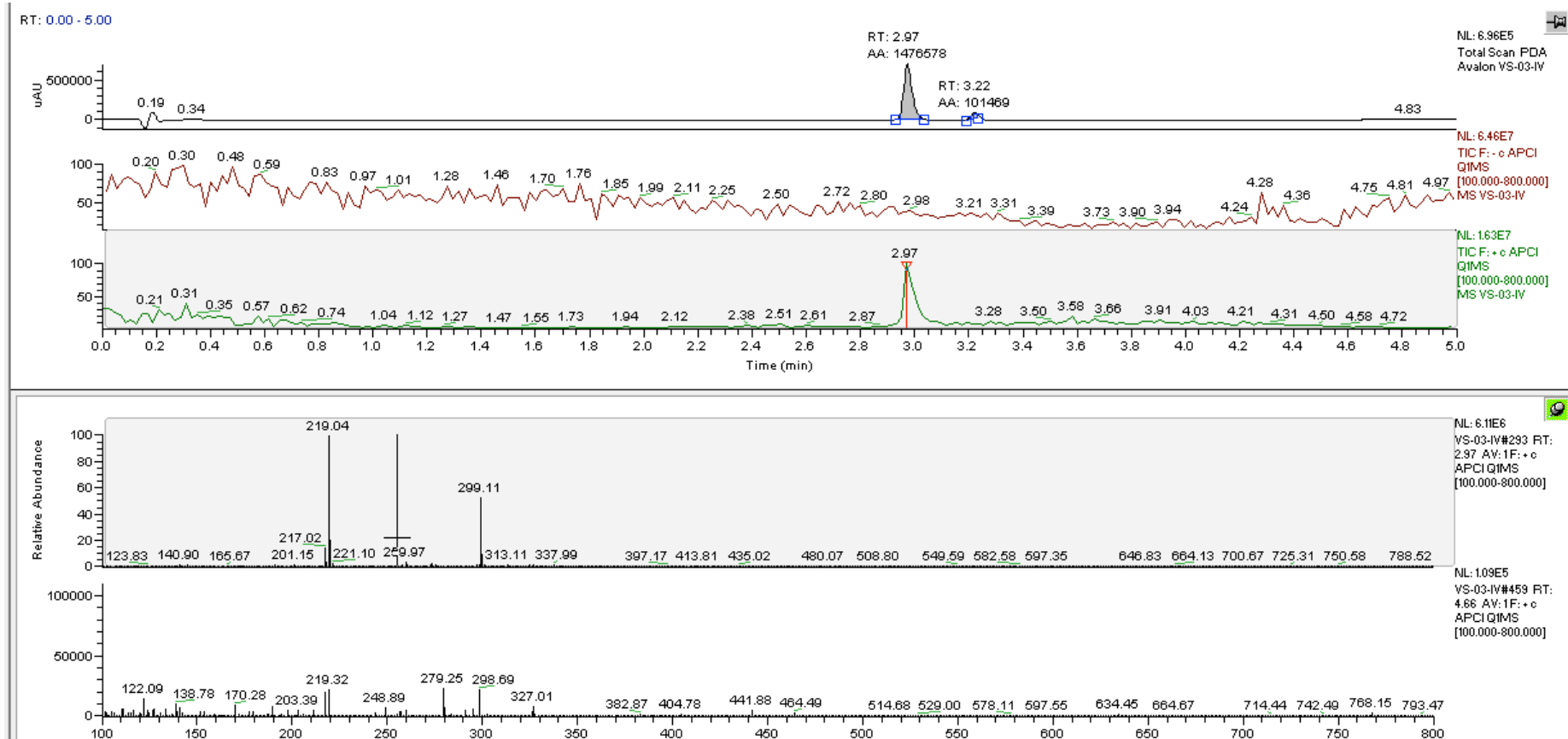
127. IHRKE G.; NEUFELD E. B., et al.: WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity, *Journal of Cell Biology*. **1993**, 123, 6, 1761-1775.
128. MERSCH-SUNDERMANN V., et al.: Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents, *Toxicology*. **2004**, 198, 1–3, 329–340.
129. GREER L. F., SZALAY A. A.: Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review, *Luminescence*. 2002, 17, 1, 43-74.
130. SMITH P. K., et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem*. **1985**, 150, 1, 76-85.
131. DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT G, et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 20, 9363–7.

9. Přílohy

RT: 0.00 - 5.00

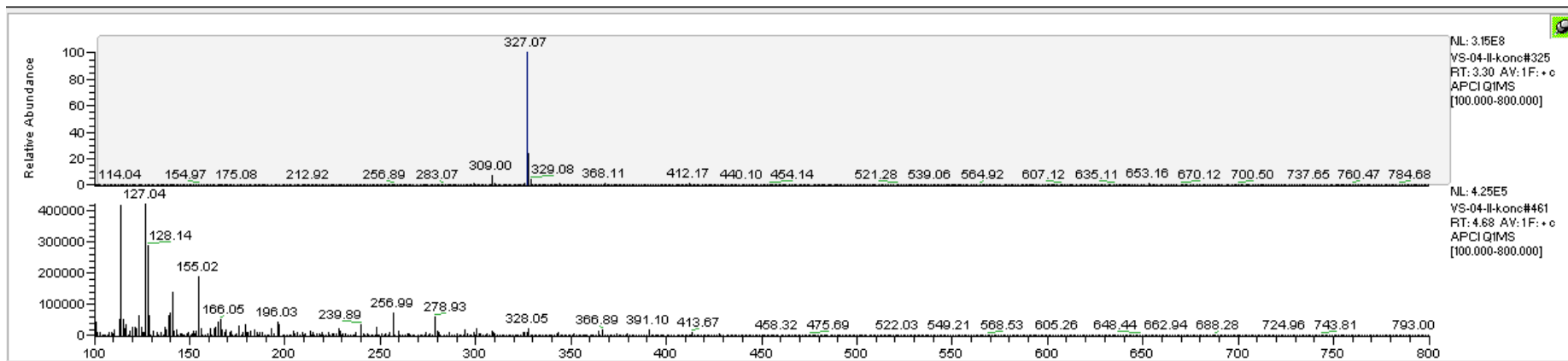
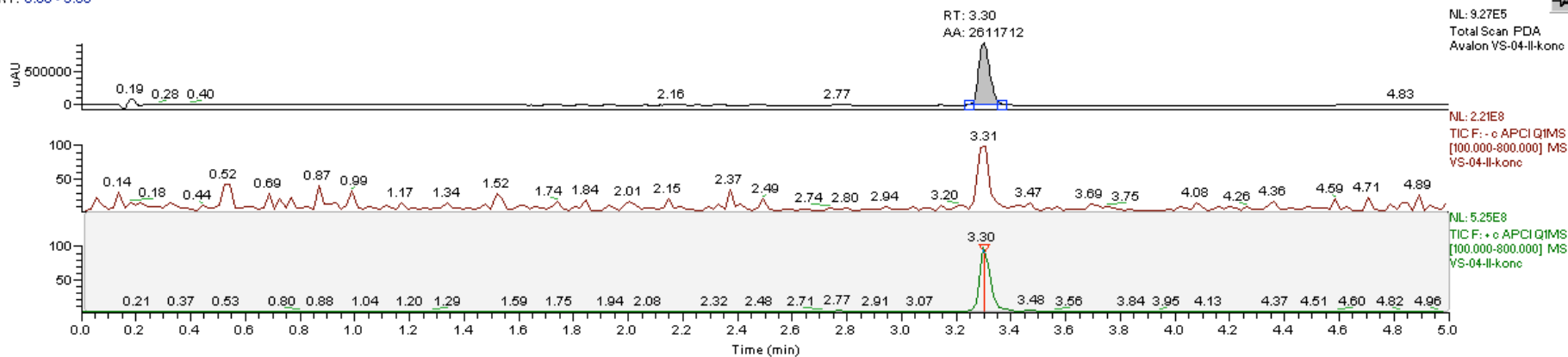


Obr. 1: Připravený nitril (10) měřené po purifikaci na CC

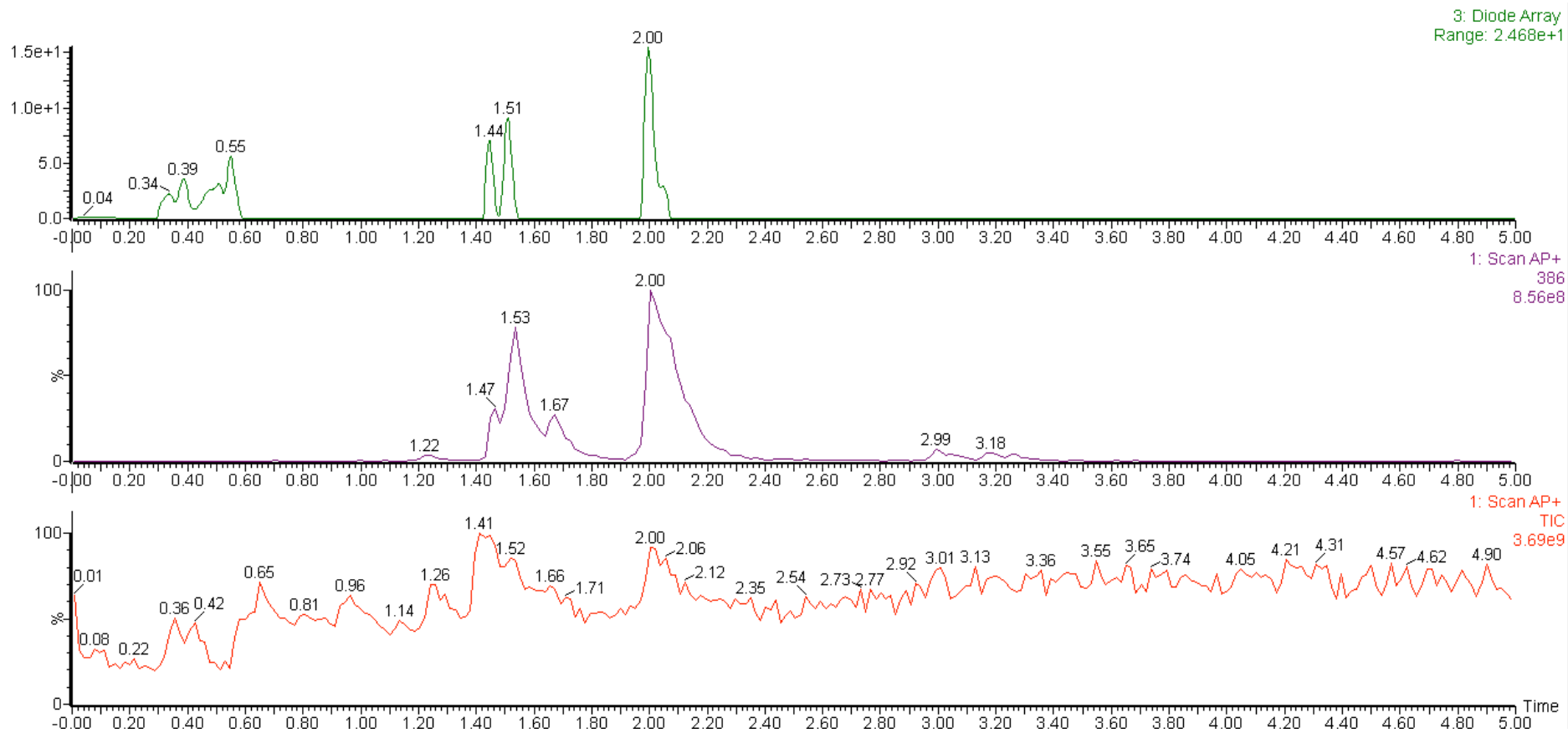


Obr. 2: Připravený (β -ioniliden)acetaldehyd (11), měřeno po purifikaci na CC

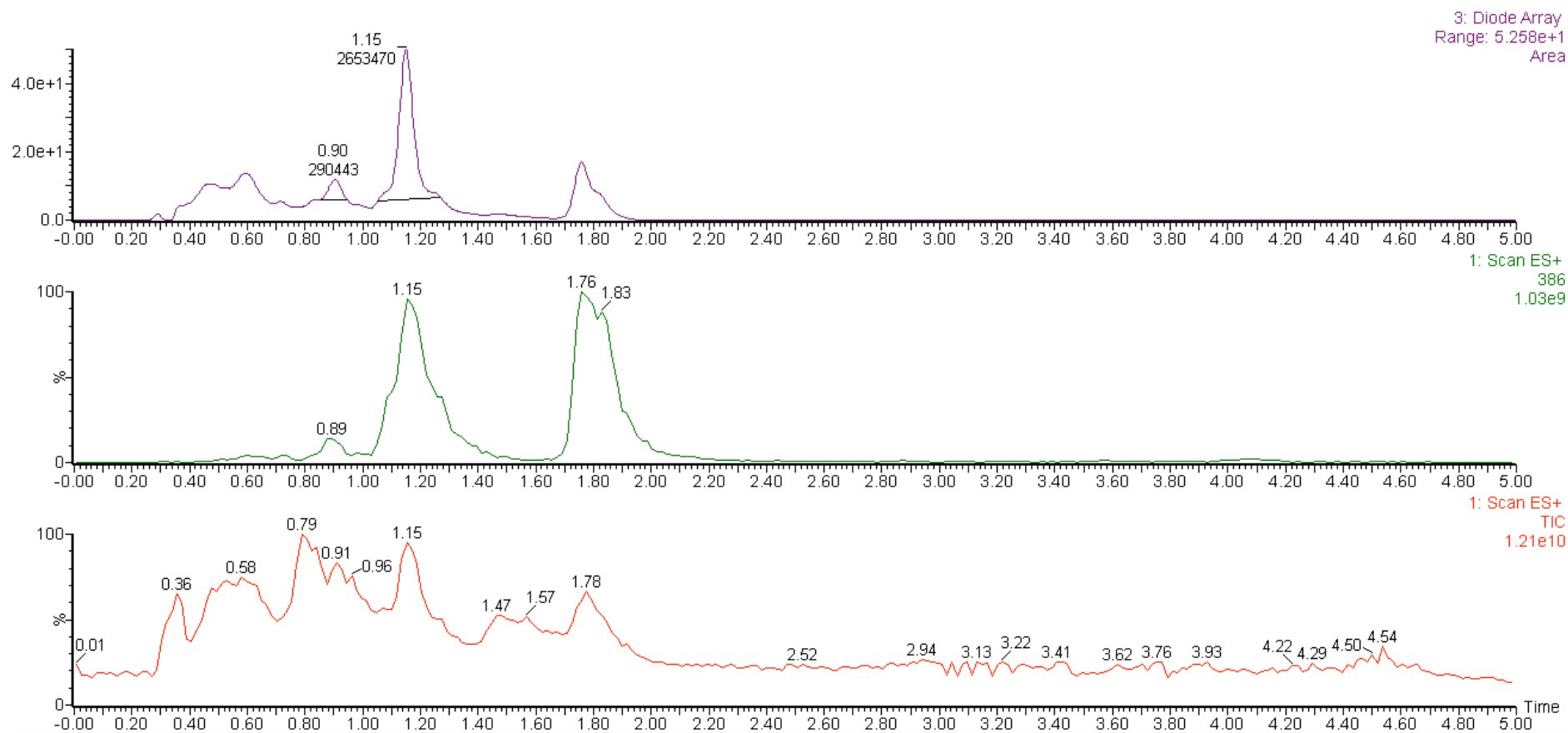
RT: 0.00 - 5.00



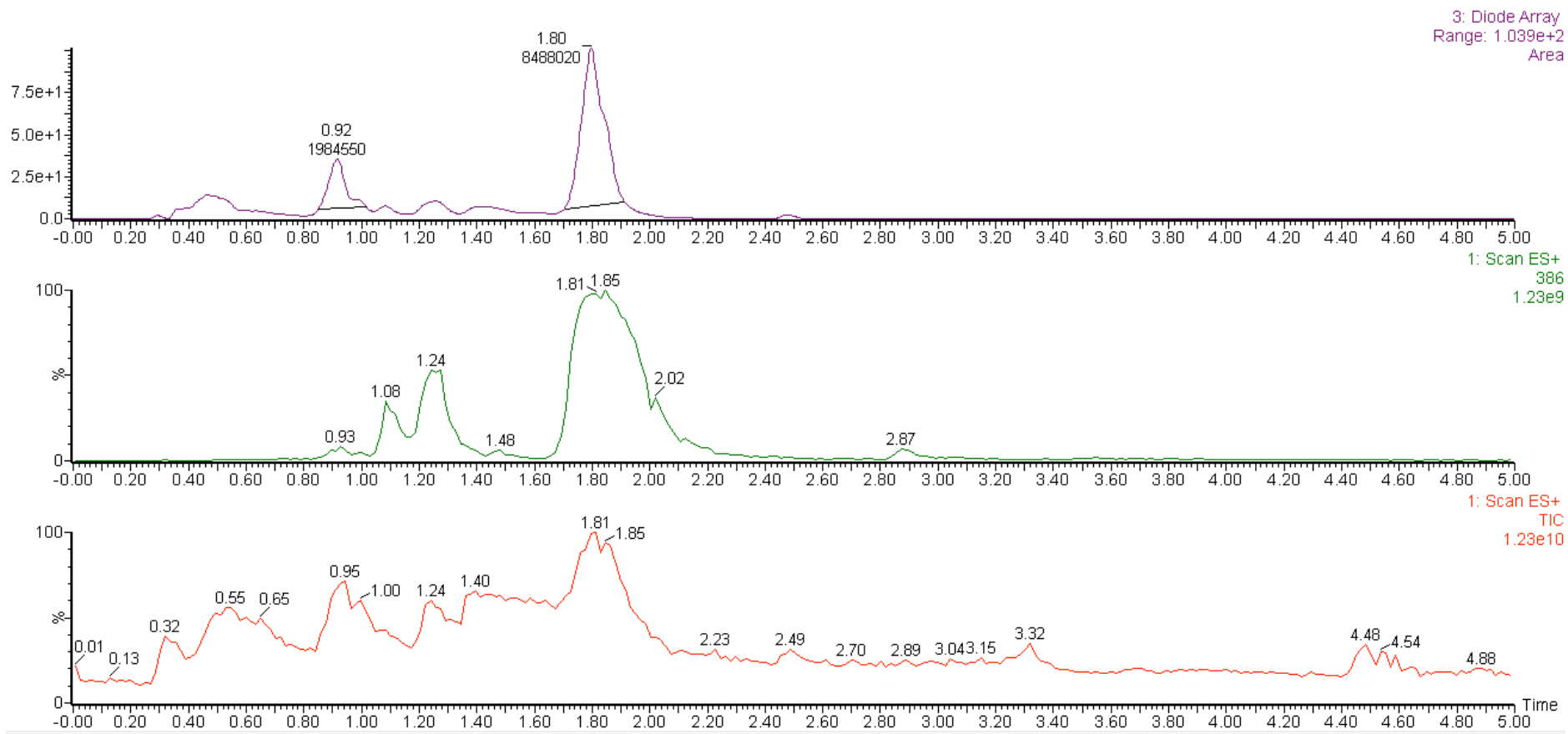
Obr. 3: Analýza připraveného anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (13)



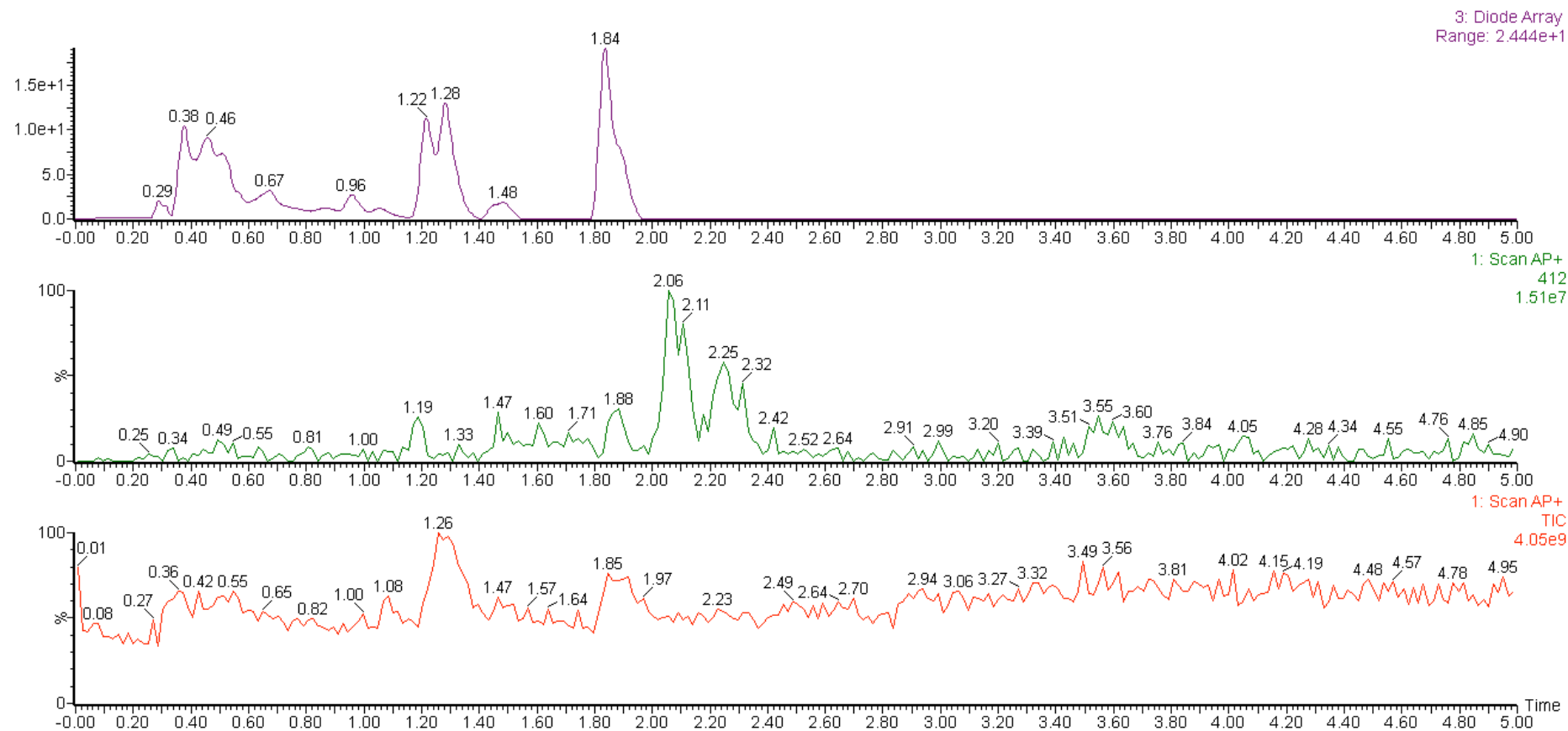
Obr. 4: Analýza surové směsi přípravy propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (17)



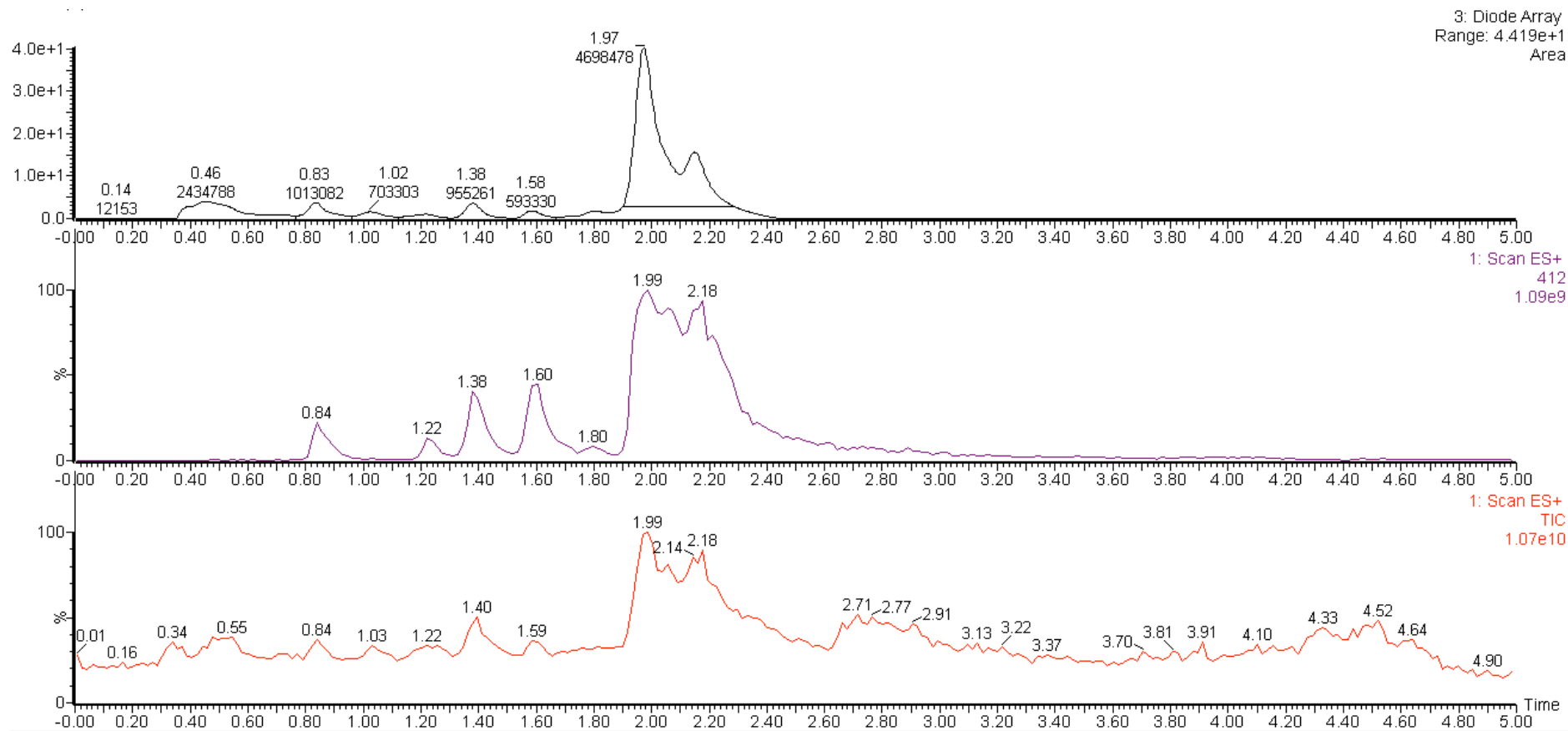
Obr. 5: Analýza připraveného propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (17) po purifikaci na preparativním HPLC, frakce I.



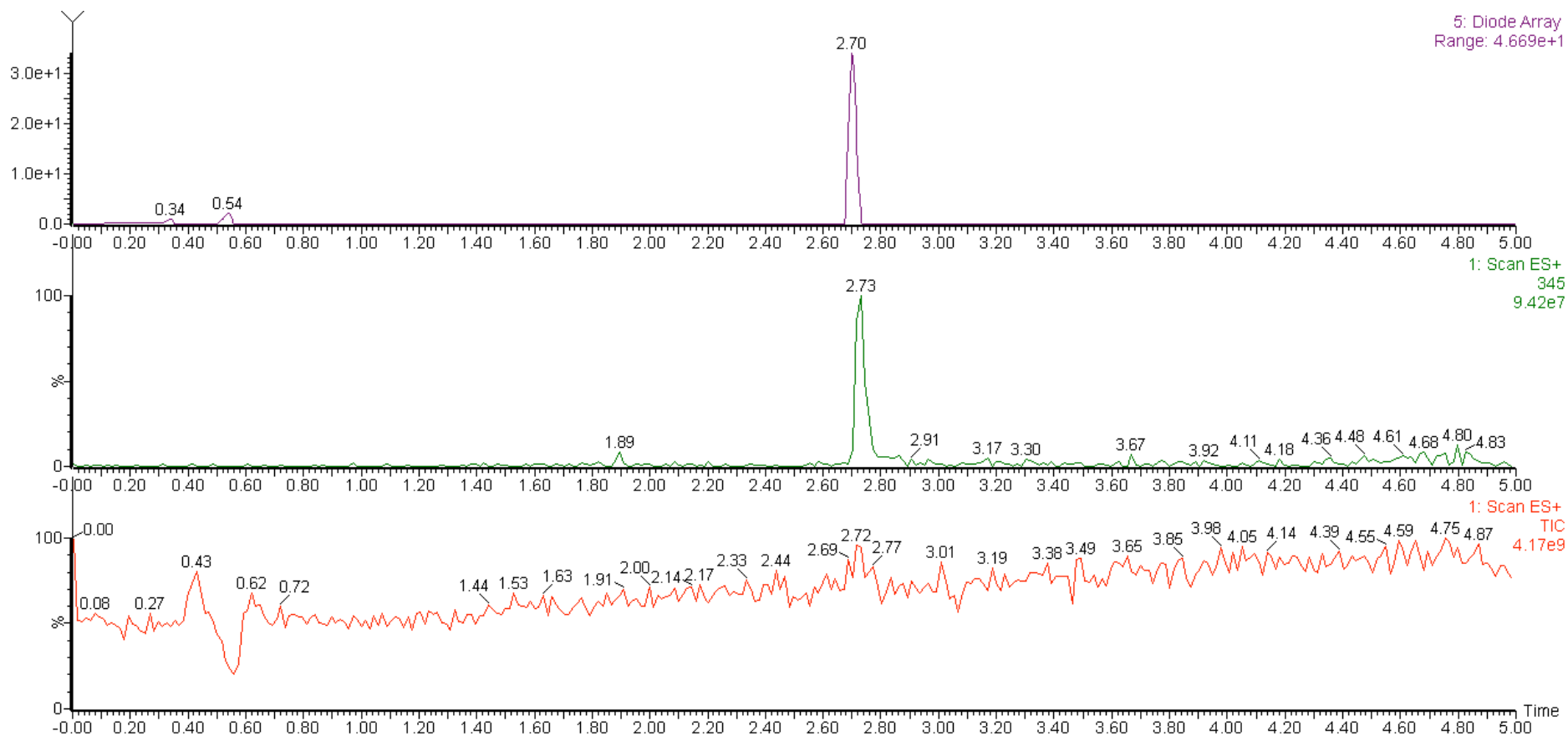
Obr. 6: Analýza připraveného propylamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (17) po purifikaci na preparativním HPLC, frakce II.



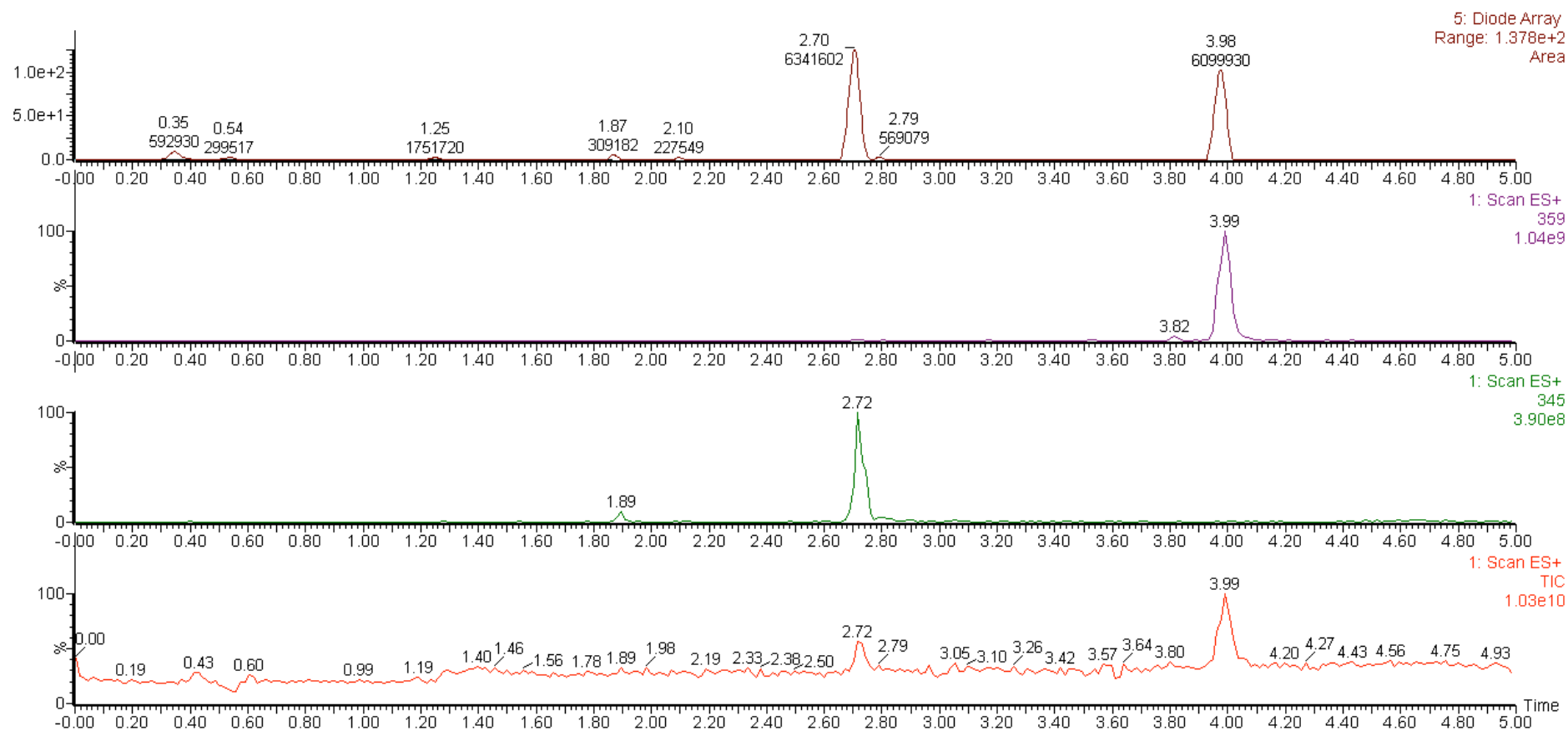
Obr. 7: Analýza surové směsi přípravy piperamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (18)



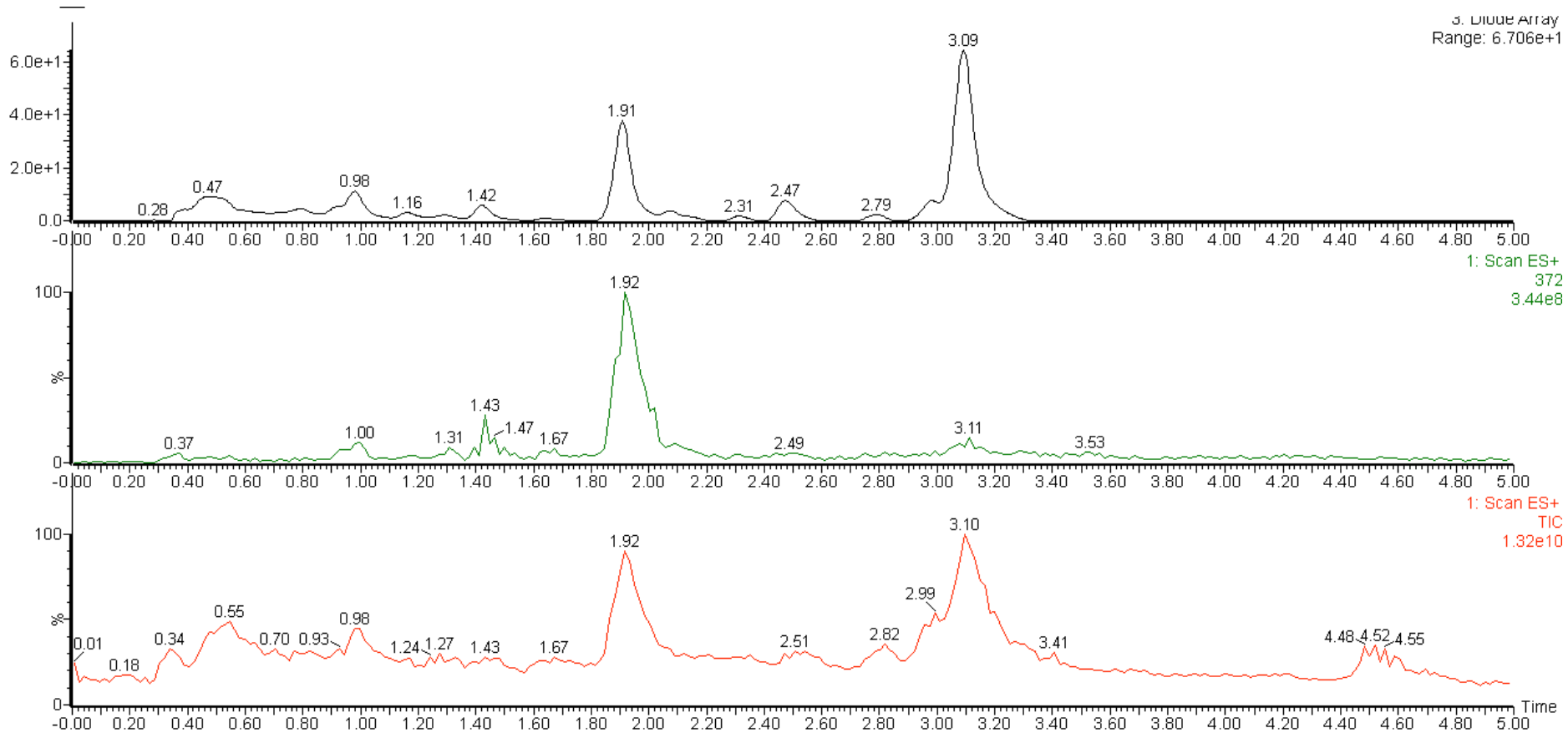
Obr. 8: Analýza připraveného piperamidu kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (18) po purifikaci na preparativním HPLC



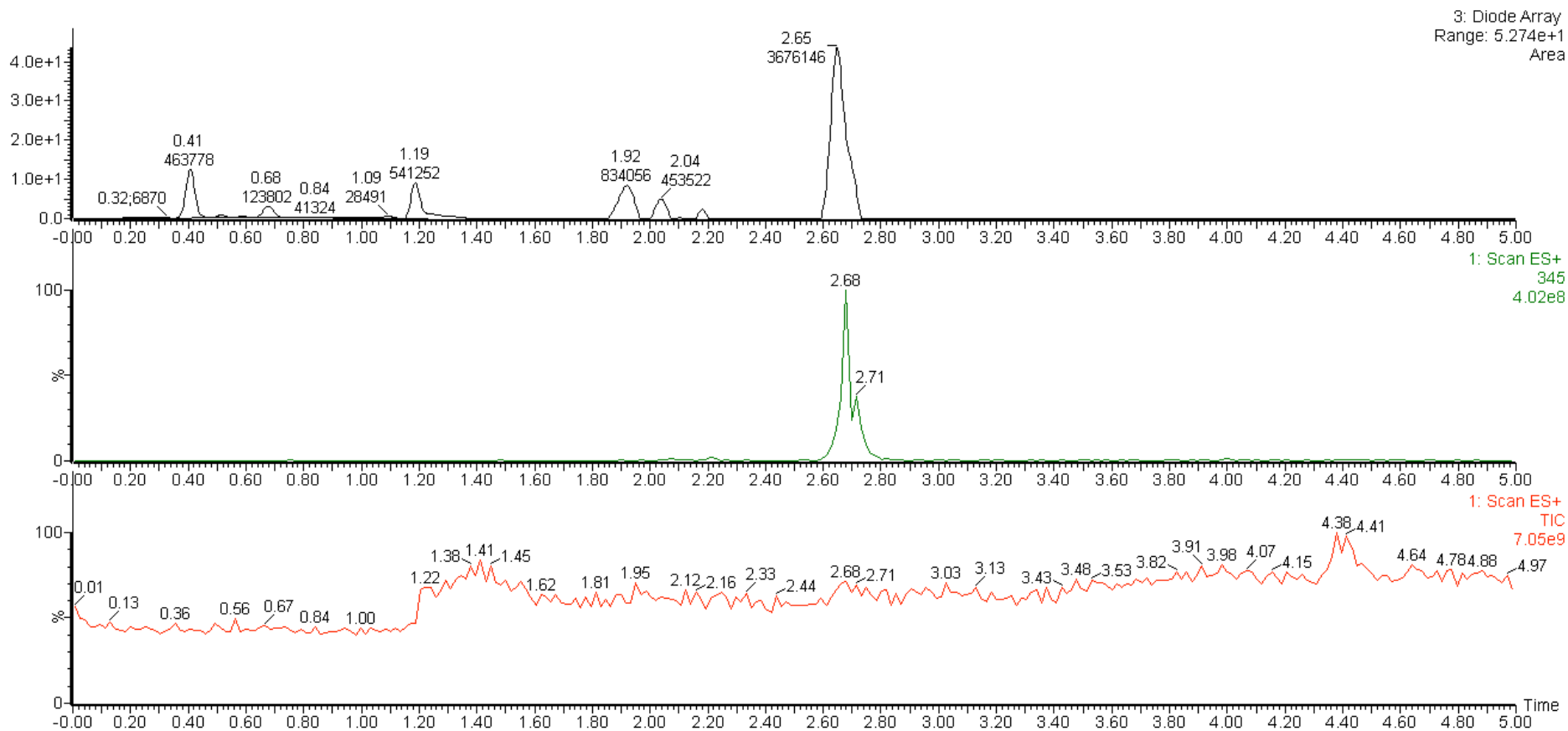
Obr. 9: Analýza produktu alkalické methanolýzy anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyrtinové (13) a následného okyselení HCl, namísto předpokládaného methylesteru (19) vznikla čistá kyselina 13-cis-12-karboxyretinová (14)



Obr. 10: Analýza surového produktu alkalické methanolýzy anhydridu kyseliny 13-cis-12-karboxyrtinové (13) a následného okyselení H_2SO_4 , na záznamu je zřejmá směs vzniklého ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20) ($t_R = 3,98$ min) a kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14) ($t_R = 2,70$ min)



Obr. 11: Analýza purifikovaného ethylesteru kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (20) po delším stání v čase za chladu a temna.



Obr. 12: Analýza přípravy kyseliny 13-cis-12-karboxyretinové (14) interpretované dle článku Lewin a kol., 1981