

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



Příprava derivátů cytokininů s fenolickými látkami

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Ing. Bc. Magdaléna Zvonková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ing. Bc. Magdaléna Zvonková
Název práce	Příprava derivátů cytokininů s fenolickými látkami
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Diplomová práce se věnuje syntéze konjugátů cytokininů a hydroxyskořicových kyselin. Teoretická část shrnuje základní informace o cytokininech a hydroxyskořicových kyselinách a přibližuje jejich využití v různých oborech. Experimentální část popisuje přípravu konjugátů hydroxyskořicových kyselin a <i>para</i> -topolinu, které byly následně podrobeny testování <i>in vitro</i> na normálních lidských kožních fibroblastech. U připravených látek byla testována jejich cytotoxicita, fototoxicita a schopnost chránit buňky před UVA zářením. Připravené látky nejevily při 24hodinové inkubaci cytotoxické působení. Testované látky nevykazovaly ani fototoxické působení, avšak nepodařilo se prokázat významný fotoprotektivní efekt nově připravených konjugátů.
Klíčová slova	syntéza, cytokininy, hydroxyskořicové kyseliny
Počet stran	78
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ing. Bc. Magdaléna Zvonková
Title of thesis	Synthesis of cytokinin derivatives with phenolic compounds
Type of thesis	Master
Department	The Department of Chemical Biology
Supervisor	doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The master's thesis is focused on the synthesis of conjugates of cytokinins with hydroxycinnamic acids. The theoretical part summarizes general information about cytokinins and hydroxycinnamic acid and describes their application in different fields. The experimental part describes the synthesis of aforementioned conjugates and <i>in vitro</i> evaluation of their cytotoxicity, phototoxicity and UVA photoprotection on normal dermal human fibroblasts. It has been demonstrated that novel conjugates show no cytotoxic effect on human fibroblasts during the 24-hour-long incubation. The tested compounds also did not show phototoxic effect, however they were not able to show significant UVA photoprotective effect.</p>
Keywords	synthesis, cytokinins, hydroxycinnamic acids
Number of pages	78
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Magdaléna Zvonková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce, doc. Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D. za její rady a trpělivost při vypracování této práce. Poděkování však patří také lidem, kteří mi byli při práci neméně nápomocni a bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Jmenovitě se jedná o RNDr. Marka Zatloukala, Ph.D. a Ing. Janu Kočířovou, kteří mi byli nápomocni v laboratoři při syntéze látek. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Omámikové za všechna provedená HPLC-MS měření. Poděkování patří také Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za sdílení jeho znalostí o interpretaci NMR spekter a Bc. Vítu Guiglielmo Mišurcovi za pomoc při interpretaci NMR spekter. Za provedené biologické testování chci moc poděkovat doc. Ing. Aleně Rajnochové Svobodové, Ph.D. a doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D.

Obsah

Seznam zkratk.....	7
1 Úvod a cíle práce	12
2 Teoretická část	13
2.1 Fenolické látky	13
2.1.1 Klasifikace a vlastnosti fenolických látek	13
2.1.2 Antioxidační působení fenolických látek	17
2.1.3 Potenciální benefity a využití HCA	18
2.1.4 Deriváty a konjugáty HCA	20
2.2 Cytokininy	21
2.2.1 Potenciální využití CK a jejich přirozených i syntetických derivátů.....	24
3 Materiál a metody	27
3.1 Chemikálie.....	27
3.2 Přístroje a metody.....	28
3.3 Syntéza	29
3.3.1 Pokus o přípravu kyseliny (<i>R,E</i>)-3-(2,2-dimethylbenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-yl)-2-((3-(2,2-dimethylbenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-yl)akryloyl)oxy)propanové (látka 1).	30
3.3.2 Pokus o přípravu kyseliny (<i>R,E</i>)-3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 2)	31
3.3.3 Příprava kyseliny (<i>R,E</i>)-3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 3).....	32
3.3.4 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové (látka 4)	33
3.3.5 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(3-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové (látka 5)....	34
3.3.6 Příprava kyseliny (<i>R,E</i>)-3-(3,4-diacetoxyfenyl)-2-((3-(3,4-diacetoxyfenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 6).....	35
3.3.7 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylové (látka 7) ...	36
3.3.8 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(3-acetoxyfenyl)akrylové (látka 8)	37
3.3.9 Pokus o přípravu kyseliny (<i>R,E</i>)-3-(3,4-bis((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 9)	38
3.3.10 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(4-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxyfenyl)akrylové (látka 10)	39
3.3.11 Příprava kyseliny <i>E</i> -3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylové (látka 11).....	40
3.3.12 Příprava 4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenolu (látka 12)	42

3.3.13	Příprava <i>E</i> -4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu (látka 13)	43
3.3.14	Příprava <i>E</i> -4-(((7 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu (látka 14)	44
3.3.15	Příprava <i>E</i> -4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu (látka 15)	45
3.3.16	Příprava <i>E</i> -4-(((9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu (látka 16)	46
3.3.17	Příprava <i>E</i> -4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu (látka 17)	47
3.3.18	Příprava <i>E</i> -4-(((9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu (látka 18)	49
3.4	Biologické testování	50
3.4.1	Buněčné linie	50
3.4.2	Chemikálie	51
3.4.3	Přístroje	51
3.4.4	Příprava vzorků	51
3.4.5	Toxicita látek	51
3.4.6	Fototoxicita látek	52
3.4.7	UVA-fotoprotekce látek	52
3.4.8	Inkorporace neutrální červeně (NČ)	53
4	Výsledky	54
4.1	Přehled úspěšnosti syntéz	54
4.2	Biologické testování	56
5	Diskuse	62
6	Závěr	67
7	Seznam použité literatury	68

Seznam zkratek

acetonid-RA	kyselina (<i>R,E</i>)-3-(2,2-dimethylbenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-yl)-2-(((2,2-dimethylbenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-yl)akryloyl)oxy)propanová
acetyl-FA	kyselina <i>E</i> -3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylová
acetyl-FA- <i>p</i> T	<i>E</i> -4-(((9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylát
acetyl-FA- <i>p</i> T-THP	<i>E</i> -4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylát
acetyl- <i>m</i> CA	kyselina <i>E</i> -3-(3-acetoxyfenyl)akrylová
acetyl-RA	kyselina (<i>R,E</i>)-3-(3,4-diacetoxyfenyl)-2-(((3,4-diacetoxyfenyl)akryloyl)oxy)propanová
benzylether-RA	(<i>R,E</i>)-3-(3,4-diacetoxyfenyl)-2-(((3,4-diacetoxyfenyl)akryloyl)oxy)propanová
CK	cytokinin
CPZ	chlorpromazin
DCC	N,N-dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles médium
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina

EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI ⁻	ionizace elektrosprejem v záporném módu
ESI ⁺	ionizace elektrosprejem v kladném módu
FBS	fetální hovězí sérum
HaCaT	buněčná linie spontánně transformovaných lidských keratinocytů
HAT	přenos vodíkového atomu
HBA	hydroxybenzoové kyseliny
HCA	hydroxyskořicové kyseliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV/VIS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí v UV/VIS
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
<i>mCA-pT</i>	<i>E-4-(((9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylát</i>
<i>mCA-pT-THP</i>	<i>E-4-(((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylát</i>
MMP-1	matrixová metaloproteinasa 1
MOM-Cl	methoxymethyl chlorid
MOM-FA	kyselina <i>E-3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)fenyl)akrylová</i>
MOM- <i>mCA</i>	kyselina <i>E-3-(3-(methoxymethoxy)fenyl)akrylová</i>
MOM-RA	kyselina <i>(R,E)-3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanová</i>
MS	hmotnostní spektrometrie

NČ	neutrální červeň
NHDF	normální lidské kožní fibroblasty
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	fosfátový pufr
<i>p</i> T-THP	4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenol
RPM	otáčky za minutu
RVO	rotační vakuová odparka
SE	standardní chyba
SET	přenos elektronu
SD	směrodatná odchylka
SPLET	sequential proton loss electron transfer
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylamonium fluorid
TBDMSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl chlorid
TBDMS-FA	kyselina <i>E</i> -3-(4-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxyfenyl)akrylová
TBDMS- <i>m</i> CA	kyselina <i>E</i> -3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylové
TBDMS- <i>m</i> CA- <i>p</i> T	<i>E</i> -4-(((7 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylát
TBDMS- <i>m</i> CA- <i>p</i> T-THP	<i>E</i> -4-(((9-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylát
TBDMS-RA	kyselina (<i>R,E</i>)-3-(3,4-bis((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis((<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanová

THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
VIS	oblast viditelného záření
UVA	UV záření A ($\lambda = 320-400$ nm)
UVB	UV záření B ($\lambda = 280-315$ nm)

1 Úvod a cíle práce

Cytokininy jsou skupinou rostlinných hormonů, které zastávají v rostlinných organismech mnoho důležitých funkcí (Davies, 2010). Po objevení cytokininů s purinovým skeletem v roce 1955 (Miller et al., 1955) se podařilo syntetizovat mnoho derivátů odvozených od těchto cytokininů a bylo zjištěno, že mohou být využity v mnoha odvětvích (Doležal a Strnad, 2017). V 90. letech 20. století bylo zjištěno, že cytokininy jsou významnými molekulami nejen pro rostlinné organismy, ale mohou mít také vliv na lidské kožní buňky (Rattan a Clark, 1994). Mnoho z těchto látek bylo připraveno akademiky Laboratoře růstových regulátorů a dalšími pracovišti PřF UPOL. Předložená práce se tak snaží navázat na jimi získané výsledky a přinést nové molekuly odvozené od těchto cytokininů, které by mohly mít zajímavou biologickou aktivitu. Vývoj a syntéza nových bioaktivních molekul s účinky na lidskou kůži, které by se v kosmetickém průmyslu či dermatologii mohly stát součástí dermálně aplikovaných přípravků, je tak důležitým rozvíjením cytokininové chemie. Druhým tématem, kterému se tato práce věnuje, jsou fenolické látky, resp. jejich konkrétní skupina hydroxyskořicových kyselin. Tyto molekuly jsou pro využití v dermatologii a kosmetice také perspektivní, protože vykazují široké spektrum biologických účinků na lidskou kůži – jedná se zejména o antioxidační, antimikrobiální či UV protektivní účinky (Taofiq et al., 2017). Konjugáty hydroxyskořicových kyselin a cytokininů tedy mohou představovat perspektivní spojení.

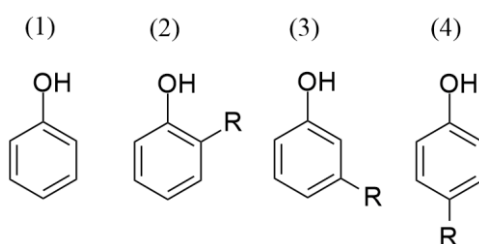
Cílem teoretické části bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na fenolické látky, resp. jejich podskupinu hydroxyskořicových kyselin, a rostlinné hormony cytokininy. Cílem experimentální části práce bylo připravit konjugáty hydroxyskořicových kyselin s vybraným, na kožní buňky aktivním, cytokininem *paratopolinem*, připravené molekuly charakterizovat pomocí fyzikálně-chemických metod a podrobit je *in vitro* biologickému testování cytotoxicity, fototoxicity a UVA protekce na lidských nenádorových liniích.

2 Teoretická část

2.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou definovány jako látky, které mají jednu či více hydroxylových skupin navázaných přímo na aromatickém kruhu. Aromatický kruh jim poskytuje odlišné chemické vlastnosti oproti jejich analogům, které obsahují alifatický řetězec (alkoholy). Jsou charakteristickými metabolity rostlin a zastávají důležité funkce např. v jejich vývoji či obranných mechanismech (Vermerris a Nicholson, 2006).

Základní stavební jednotkou fenolických sloučenin je fenol. Dle polohy dalšího substituentu na struktuře benzenu, například hydroxylové skupiny, rozlišujeme u disubstituovaných fenolických látek polohové izomery *ortho*-, *meta*- a *para*- (Obrázek 1).



Obrázek 1 Chemická struktura fenolu (1) a hydroxy- izomerů (R) v polohách *ortho*- (2), *meta*- (3) a *para*- (4) (upraveno dle Vermerris a Nicholson, 2006)

2.1.1 Klasifikace a vlastnosti fenolických látek

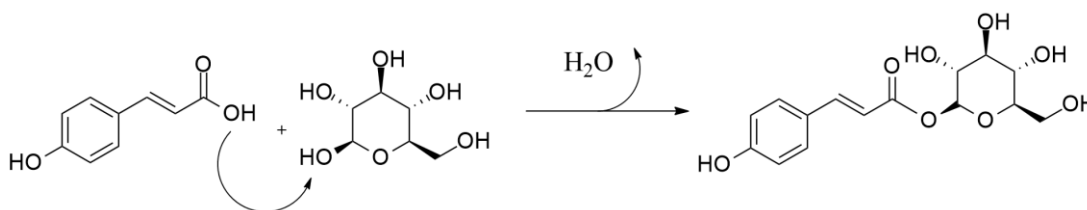
Vzhledem k vysoké diverzitě jednotlivých skupin přirozeně se vyskytujících fenolických látek není jejich klasifikace jednoznačná. Obecně se ale pro jejich klasifikaci používají dva způsoby, první se odvíjí od jejich chemické struktury a druhý od četnosti jejich výskytu (Zeb, 2021). Nejpoužívanější je klasifikace Harborna a Simmondse (Tabulka 1) dle chemické struktury. Autoři fenolické sloučeniny rozdělují do skupin dle počtu uhlíků v jejich struktuře (Harborne a Simmonds, 1964).

Tabulka 1 Klasifikace fenolických sloučenin (upraveno dle Zeb, 2021)

SKUPINA	STRUKTURA
JEDNODUCHÉ FENOLY	C6
DERIVÁTY KYSELINY BENZOOVÉ FENOLICKÉ ALDEHYDY	C6–C1
ACETOFENONY A FENYLOCTOVÉ KYSELINY FENYLETHANOIDY	C6–C2
DERIVÁTY KYSELINY SKOŘICOVÉ KUMARINY A CHROMONY	C6–C3
BENZOFENONY A XANTHONY STILBENY	C6–C1–C6 C6–C2–C6
ANTHRACHINONY CHALKONY AURONY	C6–C3–C6
FLAVONOIDY ANTOKYANY	C15
BIFLAVONYLY	C30
BETAKYANY	C18
LIGNANY A NEOLIGNANY	DIMERY
LIGNINY	POLYMERY
TANINY	OLIGOMERY A POLYMERY
FLOBAFENY	POLYMERY

Fenolické sloučeniny se v rostlinných organismech vyskytují spíše ve formě esterů a glykosidů než jako volné látky (Vermerris a Nicholson, 2006). Glykosylace a deglykosylace je důležitým regulačním bodem homeostázy fenolických látek, navázáním sacharidů totiž dochází ke změně rozpustnosti, stability a biologické aktivity původních molekul fenolických látek (Le Roy et al., 2016). Ve svých volných formách jsou obecně molekuly fenolických látek nestabilní a připojením sacharidů dochází ke zlepšení jejich stability (Jones a Vogt, 2001). V molekulách glykosidů fenolických látek může být jako cukerná složka vázána glukóza, ale také jiné monosacharidy, disacharidy či oligosacharidy. Sacharidové zbytky jsou navázány nejčastěji pomocí *O*- nebo *C*-glykosidické vazby, u některých glykosylovaných fenolických látek lze však nalézt také *N*- a *S*-glykosidické vazby (Zeb, 2021). Obecný

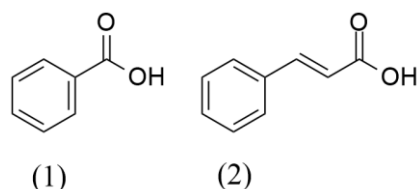
mechanismus glykosylace je uveden na příkladu navázání molekuly glukózy na kyselinu (*E*)-3-(4-hydroxyfenyl)prop-2-enovou (*para*-kumarovou; Obrázek 2).



Obrázek 2 Schéma glykosylace kyseliny *para*-kumarové (převzato ze Zeb, 2021)

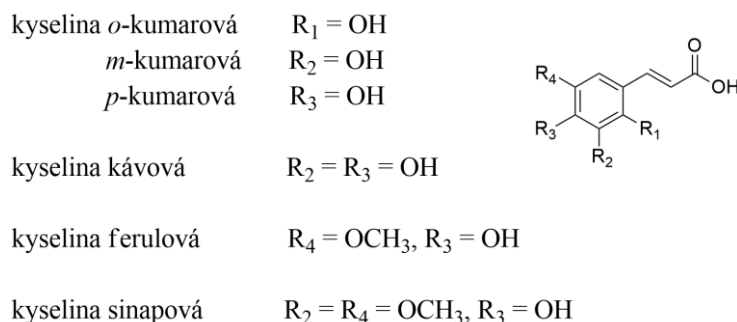
Častou reakcí fenolických látek je také formace esterů reakcí karboxylové skupiny jedné látky s hydroxylovou skupinou látky druhé – díky nutné přítomnosti karboxylové skupiny tak esterifikační reakce velmi často probíhají mezi dvěma fenolickými kyselinami. Tyto reakce dávají možnost vzniku širokému spektru různých estericky vázaných fenolických kyselin s různou biologickou aktivitou (Zeb, 2021).

Chemické vlastnosti fenolických látek jsou obecně dány jak aromatickým kruhem v jejich základní struktuře, tak substituovanou funkční skupinou. Aromatický kruh díky delokalizovaným π elektronům určuje preferenci substitučních reakcí oproti reakcím adičním, které jsou typické u lineárních uhlovodíků s dvojnou vazbou. Hydroxylová skupina fenolu dává většině fenolických sloučenin celkový slabě kyselý charakter, který je ale ovlivněn také ostatními substituenty (Vermerris a Nicholson, 2006). Z důvodu obrovského počtu různorodých fenolických metabolitů jsou následující kapitoly věnovány zejména zástupcům z řad hydroxyskořicových kyselin a derivátům od nich odvozených, neboť ty jsou dále používány v praktické části práce. Fenolické kyseliny obsahují motiv typický pro fenolické látky, tj. fenol, na kterém jsou vázány další substituenty, zejména karboxylová funkční skupina. Početná skupina fenolických kyselin (někdy nazývané též fenolkarboxylové kyseliny) zahrnuje dvě podskupiny – hydroxyskořicové (HCA) a hydroxybenzoové kyseliny (HBA), které se vyčleňují na základě toho, zda jsou odvozené od kyseliny benzenkarboxylové (benzoové) či kyseliny (*E*)-3-fenylprop-2-enové (skořicové) (Obrázek 3). Pro fenolické kyseliny je tedy charakteristická přítomnost nejen fenolické hydroxylové skupiny, ale také karboxylové funkční skupiny vázané přímo na fenolu či v řetězci substituovaném na benzenovém jádře fenolu (Kumar a Goel, 2019).



Obrázek 3 Struktura kyseliny benzoové (1) a kyseliny skořicové (2), od nichž jsou odvozené HCA a HBA

Mezi HCA (Obrázek 4) jsou řazeny kyseliny (*E*)-3-(2-hydroxyfenyl)prop-2-enová (*ortho*-kumarová), (*E*)-3-(3-hydroxyfenyl)prop-2-enová (*meta*-kumarová), (*E*)-3-(4-hydroxyfenyl)prop-2-enová (*para*-kumarová), (*E*)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)prop-2-enová (kávová), (*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)prop-2-enová (ferulová) a (*E*)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)prop-2-enová (sinapová), ale lze k nim také formálně řadit kyselinu (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(*E*)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylovou (chlorogenovou) a kyselinu (2*R*)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-[(*E*)-3-(3,4-dihydroxyfenyl)prop-2-enoyl]oxypropanovou (rozmarýnovou), které jsou také odvozeny od kyseliny skořicové, mají však estericky vázané další složky – v případě kyseliny chlorogenové se jedná o kyselinu (3*R*,5*R*)-1,3,4,5-tetrahydroxycyklohexan-1-karboxylovou (chinovou), u kyseliny rozmarýnové jde o kyselinu 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-hydroxypropanovou (Vermerris a Nicholson, 2006).



Obrázek 4 Struktura HCA (upraveno dle El-Seedi et al., 2012)

HCA jsou hojně zastoupeny v různých druzích ovoce a zeleniny (Zeb, 2021). V rostlinných organismech jsou syntetizovány šikimátovou dráhou, která je zdrojem prekurzorů fenolických látek – fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Šikimátová dráha tak představuje velmi důležité propojení primárního a sekundárního metabolismu rostlin, kdy syntetizované aminokyseliny slouží nejen pro proteosyntézu, ale také pro syntézu sekundárních metabolitů (Santos-Sánchez et al., 2019). Bylo zjištěno,

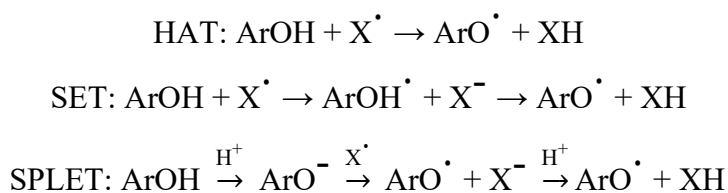
že v listové, kořenové a košťálové zelenině jsou fenolické kyseliny zastoupeny více než v jiných druzích zeleniny. Nejvíce abundantními byly v případě provedeného HPLC-MS screeningu kyseliny isoferulová, *p*-kumarová a ferulová (Zhang et al., 2019).

Přestože v mnohých druzích ovoce a zeleniny jsou HCA dominantními sloučeninami z řad fenolických látek, jsou tyto kyseliny zastoupeny i v obilovinách či kávě a čaji (Zeb, 2021). Právě káva je jedním z nejbohatších zdrojů kyseliny chlorogenové, kávová zrna však obsahují také kyselinu *p*-kumarovou, kávovou a další fenolické látky (Mehaya a Mohammad, 2020).

2.1.2 Antioxidační působení fenolických látek

Zcela zásadní význam má antioxidační působení fenolických látek vznikající spolupůsobením benzenového jádra, které stabilizuje molekuly antioxidantů po jejich reakci s volnými radikály, a hydroxylových skupin zodpovědných za samotný antioxidační účinek (Zeb, 2021), u nichž záleží nejen na počtu, ale také jejich poloze. *Para*- a *ortho*- substituované fenolické látky vykazují vyšší antioxidační působení než látky se substituenty v *meta*- poloze. V případě fenolických kyselin výsledný antioxidační potenciál ovlivňuje také délka řetězce nesoucí karboxylovou skupinu, který je substituován na fenolu. Čím delší řetězec je, tím lepšími antioxidanty dané kyseliny jsou – deriváty kyseliny skořicové jsou tak lepšími antioxidanty než deriváty kyseliny benzoové. Vliv na antioxidační vlastnosti HCA má také konfigurace dvojně vazby uhlovodíkového řetězce, kdy kyseliny v *E*- konfiguraci vykazují obecně vyšší reaktivitu než v *Z*- konfiguraci (Göçer a Gülçin, 2011; Szeląg, Urbaniak a Bluysen, 2015). Za nejsilnější antioxidant z řad HCA a jejich derivátů je považována kyselina rozmarýnová (Amoah et al., 2016). Samotný mechanismus antioxidační reakce zprostředkovaný fenolickou hydroxylovou skupinou pak může probíhat třemi různými cestami. První možností je přenos vodíkového atomu (hydrogen atom transfer, HAT), kdy dochází k přenosu atomu vodíku z hydroxylové skupiny fenolické látky na reaktivní radikály, čímž dochází ke vzniku fenolického radikálu a původní radikál se stabilizuje. Druhou cestou je přenos elektronu (single electron transfer, SET), při kterém je nejprve přenášen pouze elektron pocházející z fenolické sloučeniny na reaktivní radikál, z něž tímto mechanismem vzniká aniont. Následně dochází k přenosu protonu. Třetím mechanismem je sequential proton loss electron transfer

(SPLET), kdy fenolické látky ztrácejí proton v důsledku změn v acidobazické rovnováze za vzniku jejich aniontu, který předává elektron reaktivnímu radikálu. Vzniká tak radikál původní fenolické látky a aniont radikálu. Posledním krokem je, obdobně jako u předchozích mechanismů, přenos protonu (Obrázek 5; Pereira et al., 2009; Shang et al., 2015; Zeb, 2021). Bylo zjištěno, že antioxidační účinek HCA je zprostředkován preferenčně mechanismy HAT či SPLET, a to v závislosti na prostředí, ve kterém reakce probíhá a již zmíněné poloze a počtu hydroxylových skupin (Mansouri a Mekelleche, 2020; Shang et al., 2015).



Obrázek 5 Schémata antioxidačních mechanismů fenolických látek (upraveno dle Shang et al., 2015)

Antioxidační působení plní svou funkci nejen v rostlinných organismech jako přirozená ochrana před potenciálně škodlivými kyslíkovými radikály, ale dává fenolickým látkám také velmi širokou využitelnost např. v potravinářství, kosmetickém průmyslu či medicíně (Zeb, 2020). V potravinářském průmyslu by aplikace HCA a jejich derivátů s antioxidační aktivitou mohla nahradit používání syntetických antioxidantů, kterými je zajišťována údržnost a trvanlivost vyráběných produktů (Leonard et al., 2022).

Neopomenutelnou reakcí fenolických sloučenin je také jejich vlastní oxidace (také nazývána jako autooxidace), která dle mechanismu chemické reakce může být enzymatická či neenzymatická. Obecně oxidací fenolických látek dochází ke vzniku zbarvených produktů, proto jsou v potravinářství oxidační reakce často nazývané také jako hnědnutí a mohou být v této oblasti nežádoucí. Stupeň hnědnutí lze však zmírnit úpravou podmínek, např. snížením pH (Zhou et al., 2021).

2.1.3 Potenciální benefity a využití HCA

HCA jsou díky svým chemickým vlastnostem a biologickým účinkům intenzivně zkoumány již několik desítek let zejména pro jejich potenciální využití v prevenci i podpůrné léčbě mnoha onemocnění (Kumar a Goel, 2019). Je obecně známo, že

optimální výživa je velmi silně spjata s lidským zdravím, a tak je nutné zajistit dostatečný přísun potravin, které v nynějších jídelničkách mnohdy chybí – jedná se zejména o celozrnné potraviny, ovoce a zeleninu či ořechy (Coman a Vodnar, 2020). Přestože jsou HCA jednou z nejvýznamnějších skupin fenolických látek vyskytujících se v rostlinných organismech (a tedy také v potravinách), výzkum jejich biologické dostupnosti a potenciálního účinku na lidské zdraví může být limitován jejich vazbou na některé polysacharidy buněčné stěny, které mohou být pro člověka nestravitelné (Călinoiu a Vodnar, 2018). Volné formy HCA jsou lépe absorbovány než jejich estery se sacharidy, jinými organickými kyselinami nebo lipidy. Potenciální pozitivní účinek na lidské zdraví tedy závisí jak na jejich množství v potravě, tak na jejich biologické dostupnosti (El-Seedi et al., 2012). Na výsledné biologické aktivitě HCA přijímaných v potravě se podílí nejen trávicí enzymy tenkého střeva, ale podstatnou roli hrají také enzymy mikrobiomu tlustého střeva. Vznikající volné formy kyselin jsou krevním řečištěm transportovány do jater, kde jsou metabolizovány ve formy, které kolují krevním řečištěm do cílových orgánů (Heleno et al., 2015; Marín et al., 2015).

Z hlediska přínosu pro lidské zdraví hrají HCA díky svému antioxidačnímu potenciálu zásadní roli zejména v prevenci chorob spojených se stárnutím a oxidativním stresem (El-Seedi et al., 2012). Mezi onemocnění, na jejichž rozvoji se podílí reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály, patří např. kardiovaskulární onemocnění (zejména ateroskleróza a hypertenze), diabetes, onkologická onemocnění či neurodegenerativní stavy jako je Parkinsonova či Alzheimerova choroba (Valko et al., 2007; Liguori et al., 2018). Nadměrná produkce reaktivních kyslíkových radikálů indukovaná UV zářením je také jedním z hlavních mechanismů přispívajících ke stárnutí pokožky (Augustyniak et al., 2016). U mnoha zástupců z řad HCA bylo prokázáno, že vykazují UV protektivní schopnost – protektivní efekt byl prokázán např. u kyseliny *para*-kumarové při testování na buněčné linii odvozené z králičí rohovky po ozáření UVB zářením (Lodovici et al., 2003). Při testování *in vivo* na myších modelech vykazují kyseliny kávová a ferulová účinek proti kancerogenezi navozené UVB zářením (Balupillai et al., 2015; Ambothi, Prasad a Balupillai, 2015). Fotoprotektivní vliv kyseliny rozmarýnové byl prokázán při její aplikaci na buněčné kultury lidských fibroblastů a keratinocytů, které byly ozářeny UVB zářením (Gupta et al., 2022). Při topické aplikaci na pokožku předloktí bylo zjištěno, že kyselina *para*-kumarová dokáže zmírnit rozvoj kožního erytému po vystavení pokožky UV záření (Seo et al., 2011). Podobné výsledky byly získány také při aplikaci peelingu

s přidavkem kyseliny ferulové na pokožku dvaceti žen ve věku 45-60 let, jejichž kůže v oblasti obličeje již vykazovala známky stárnutí (Zduńska-Pęciak et al., 2022).

Díky kombinaci fotoprotektivního a antioxidačního účinku tedy mohou HCA najít potenciální aplikaci nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale mohou být také molekulami zájmu pro průmysl kosmetický. Nynější výzvou na poli využití HCA v kosmetice je však jejich nestabilita, náchylnost k oxidaci a slabá schopnost prostupovat buněčné membrány (Taofiq et al., 2017). Slibným přístupem by mohly být mikroenkapsulační techniky, které by tyto bioaktivní látky chránily před jejich degradací a také usnadnily jejich průchod kůží při topické aplikaci (Casanova a Santos, 2016). Nabízí se také spojení s jinými netoxickými organickými molekulami, které by mohly upravit jejich vlastnosti tak, aby např. usnadnily vstup kůží anebo synergicky zvýšily jejich účinek.

Nejen volné formy HCA však vykazují zmíněné bioaktivní účinky, např. přirozeně se vyskytující konjugáty tyraminu a HCA mohou také vykazovat protizánětlivý, antioxidační, antionkogenní, antidiabetický a neuroprotektivní účinek (Leonard et al., 2022).

2.1.4 Deriváty a konjugáty HCA

Potenciální benefity nejen pro lidské zdraví, ale také např. pro potravinářský průmysl by mohly přinášet také konjugáty fenolických kyselin s jinými látkami – vývoj těchto konjugátů se ubírá mnoha směry, z nichž některé budou přiblíženy v této kapitole.

Zajímavé využití by mohly najít konjugáty HCA s monoacylglyceroly. Monoacylglyceroly jsou v potravinářském průmyslu běžně používány jako emulgátory a v kombinaci s fenolickými látkami mohou zlepšit oxidativní stabilitu emulzí. Díky možnému propojení emulgátoru a antioxidantu v jedné molekule by tedy mohlo dojít k usnadnění některých technologických procesů (Anankanbil et al., 2018). Inhibiční účinek při oxidaci lipidů v emulzích vykazují také arabinoxylany a glukuronoxylany derivatizované kyselinou ferulovou a sinapovou (Wrigstedt et al., 2010). Perspektivní pro potravinářství mohou být také konjugáty HCA (jmenovitě deriváty kyselin *p*-kumarové, kávové a ferulové) vázané jako ester či amid s chitosanem. Tyto konjugáty po inkorporaci do obalových materiálů zlepšily jejich technologické vlastnosti jako např. teplotní stabilitu a odolnost vůči UV záření, ale

ovlivnily také jejich antioxidační a antimikrobiální aktivitu a přispěly k prodloužení trvanlivosti vepřového masa, na kterém tyto obaly byly testovány (Yong et al., 2021).

Konjugáty chitosanu a HCA jsou však zajímavými látkami také pro výzkum v oblasti medicíny, kde jejich potenciální přínos spočívá především ve využití při dermální aplikaci ve formě hydrogelů či filmů pro urychlení hojení a antimikrobiálnímu působení v místě poranění, ale také pro zlepšení vlastností transportérů terapeutických molekul založených na chitosanu (Ojeda-Hernández et al., 2022). Mimo antimikrobiální účinky však mohou deriváty některých HCA vykazovat také antiparazitické vlastnosti. Lopes et al. (2020) v rámci svého výzkumu připravili alkyl- a aryl- deriváty kyseliny *p*-kumarové, z nichž některé působily inhibičně na parazitické druhy *Leishmania braziliensis* a *Plasmodium falciparum*.

Deriváty HCA nachází široké uplatnění také v kosmetickém průmyslu. V kosmetických přípravcích plní tři hlavní funkce – jsou využívány jako chemické UV filtry, jako složky oddalující stárnutí pokožky a jako antimikrobiální ingredience (Gunia-Krzyżak et al., 2018). Mimo jmenované pozitivní účinky však mohou mít také přínos technologický – konjugací kyselin ferulové a kávové s aminokyselinami byly získány sloučeniny, u kterých byla mimo jejich UV protektivní schopnosti prokázána také schopnost stabilizovat emulze (Centini et al., 2012). Pro stabilizaci emulzí v kosmetice však mohou být použity také již zmíněné amfipatické monoacylglyceroly konjugované s fenolickými kyselinami (Gandhi et al., 2021). Pro kosmetický průmysl by mohly být velmi perspektivní také konjugáty kyseliny *p*-kumarové a kyseliny *L*-askorbové. Jejich spojením byly zachovány oba mechanismy ovlivnění metabolismu kolagenu, které mají původní molekuly, čímž by tyto konjugáty mohly najít využití v produktech s protistárnoucím efektem (Kwak et al., 2015).

2.2 Cytokininy

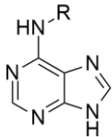

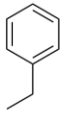
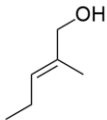
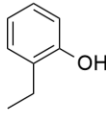
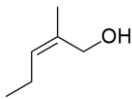
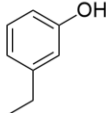
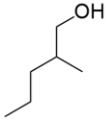
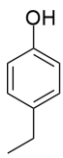

Pravděpodobně první zmínkou v literatuře hovořící o chemických látkách, které ovlivňují dělení buněk, je publikace *Zur physiologie der zellteilung*, kde byl popsán experiment rakouského vědce Gottlieba Haberlandta. Ten prokázal, že parenchymatické buňky brambory se v přítomnosti směsi látek, které prochází floémem, mohou měnit na meristematické pletivo a aktivně se dělit. V souladu s tím, že živočišné hormony byly popisovány jako chemické signály, které ovlivňují růst

různých částí organismu, Haberlandt předpokládal, že tyto látky budou mít podobnou povahu (Haberlandt, 1913; Kamínek, 2015).

Ve 40. letech 20. století byly hledány látky či jejich směsi, které by indukovaly dělení rostlinných buněk. Bylo zjištěno, že přidavkem kokosového mléka do média, které již obsahuje auxiny, docházelo k indukci nárustu kalusu na explantátových kulturách různých rostlin, např. u embryí durmanu (van Overbeek, Conklin a Blakeslee, 1941), či kulturách z kořene mrkve (Caplin a Steward, 1947). Hledání a studiu látek, které by podporovaly buněčné dělení, se dále věnovali F. K. Skoog a C. O. Miller, kteří našli látky podporující buněčné dělení nejen v kokosovém mléce, ale také v kvasničném extraktu či autoklávované sledí DNA, což se stalo zásadním milníkem historie cytokininů – roku 1954 byl izolován *N6*-furfurylaminopurin, který byl díky své schopnosti indukovat cytokinezi, pojmenován jako kinetin. Nejednalo se však o přirozeně se vyskytující cytokinin, ale pravděpodobně o produkt degradace DNA (Miller et al., 1955; Miller et al., 1956). Tato vědecká skupina také v roce 1965 navrhla používat název cytokininy (CK) pro všechny látky, které vykazují účinky podobné kinetinu (Skoog, Strong a Miller, 1965). Prvním CK získaným z rostlinného materiálu byl tedy až *trans*-zeatin izolovaný z kukuřice (Letham, 1963).

CK zastávají v rostlinných organismech mnoho důležitých funkcí. Stimulují buněčné dělení, čímž se podílí na regeneraci a morfogenezi rostlinných orgánů, jsou ale zodpovědné také za růst laterálních pupenů a regulují velikost semen. Mezi další funkce CK patří např. oddálení senescence. Zásadní úlohu CK plní také při působení stresových faktorů jako je např. sucho či zasolení půdy nebo nedostatek nutrientů. Na výsledném účinku v rostlinném organismu se však podílí nejen CK, ale účastní se také ostatní rostlinné hormony jako jsou např. auxiny, gibereliny, kyselina abscisová a jasmonová či ethylen (Davies, 2010; Taiz et al., 2015). Zajímavý je především dvojitý typ interakce CK s auxiny – v různých fyziologických procesech mohou mít synergistický či antagonistický účinek (Schaller, Bishopp a Kieber, 2015).

Z hlediska chemického představují CK skupinu derivátů adeninu s navázaným aromatickým nebo isoprenoidním řetězcem v poloze *N6*- (Obrázek 6). Mimo isoprenoidní a aromatické CK je vyčleňována také zvláštní skupina syntetických derivátů močoviny, které vykazují podobnou biologickou aktivitu jako CK (Spíchal, 2012).

	ISOPRENOIDNÍ		AROMATICKÉ	
	R	CK	R	CK
		<i>N6</i> -isopentenyladenin		<i>N6</i> -benzyladenin
		<i>trans</i> -zeatin		<i>ortho</i> -topolin
		<i>cis</i> -zeatin		<i>meta</i> -topolin
		dihydrozeatin		<i>para</i> -topolin
				kinetin

Obrázek 6 Přehled cytokininovýchází (upraveno dle Svačinová et al., 2012)

Biosyntéza isoprenoidních CK probíhá nejen v rostlinách, ale také v mikroorganismech (Frébortová a Frébort, 2021) dvěma mechanismy – *de novo* syntéza spočívá v přenosu daného isoprenoidního zbytku do *N6*-pozice adeninové kostry pomocí enzymu isopentenyltransferázy. Druhou cestou biosyntézy CK je degradace tRNA (Sakakibara, 2010). Na rozdíl od již poměrně rozkrytého mechanismu biosyntézy isoprenoidních CK zůstává však syntéza aromatických CK stále nepopsaná (Oslovsky et al., 2020). Výsledná biologická aktivita CK se odvíjí od mnoha faktorů a neurčuje ji pouze druh substituentu v *N6*-poloze, ale také další substituenty navázané na adeninovém skeletu, např. glukóza v polohách *N3*-, *N7*- a *N9*- (Mok a Mok, 2001). CK glukosylované v *N7*- a *N9*-poloze byly díky své velmi nízké či nulové biologické aktivitě považovány za inaktivní formy bez zásadního přínosu pro rostlinné organismy. Na základě provedených experimentů však Pokorná et al. (2021) vybízí k jejich důkladnějšímu studiu, neboť se podařilo prokázat, že existují rozdíly v hladinách *N7*- a *N9*-glukosidů detekovaných u různě evolučně

vyspělých rostlinných organismů, ale ke změnám v koncentraci těchto metabolitů dochází také na úrovni ontogeneze modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Ve vybraných CK biotestech se také podařila prokázat biologická aktivita některých glukosylovaných CK (Pokorná et al., 2021). Zásadní vliv na aktivitu CK metabolitů mají však také změny na isoprenoidním či aromatickém zbytku substituovaném v *N6*-poloze, např. *O*-glykosylací vznikají zásobní *O*-glukosidy a *O*-xylosidy příslušných CK, které jsou reverzibilně deaktivovány a mohou být převáděny dle potřeby zpět na CK volné báze vykazující nejvyšší biologickou aktivitu (Spíchal, 2012). Důležitou roli v rostlinných organismech hrají tedy nejen volné báze, ale také zmíněné metabolity CK (Taiz et al., 2015).

2.2.1 Potenciální využití CK a jejich přirozených i syntetických derivátů

CK a jejich deriváty nachází díky svým vlastnostem uplatnění nejen v biotechnologiích (Plíhalová et al., 2016) a potažmo zemědělství (Koprna et al., 2016), mají ale také značný potenciál pro využití v humánní medicíně a kosmetickém průmyslu (Hönig et al., 2018). Záměrem této kapitoly je tedy shrnout základní poznatky ve zmíněných směrech.

Přestože v rostlinných explantátových kulturách vede přidavek CK jakožto regulátorů růstu k požadovanému efektu, a to již ve velmi nízkých koncentracích, využití CK v zemědělství bylo v minulosti problematické a jejich použití ovlivňovala nízká rozpustnost ve vodě. Byly připraveny mesyláty CK (*N6*-benzyladeninu, *o*-topolinu, *m*-topolinu a *m*-methoxytopolinu), které díky zvýšení rozpustnosti oproti původním molekulám mohou být použity v polních experimentech na obilovinách. Jejich aplikací bylo dosaženo zvýšení počtu produktivních odnoží, a tedy také zvýšení výnosu ječmene (Klos et al., 2022). Podobných výsledků bylo dosaženo také u derivátů aromatických CK s halogeny substituovanými v různých polohách na purinové kostře (Koprna et al., 2021). Významný potenciál pro podpoření růstu plodin však nepředstavují pouze nově syntetizované deriváty CK, ale také syntetické inhibitory cytokininových oxidas/dehydrogenas, které CK v rostlinách degradují a regulují tak uměle jejich působení *in situ* (Nisler et al., 2021).

CK a jejich nové deriváty však mohou mít mimo zemědělského a biotechnologického použití také potenciální terapeutický význam. U některých přirozeně se vyskytujících ribosidů CK byla prokázána cytotoxická aktivita jak *in vitro*

na lidských nádorových buněčných liniích, tak *in vivo*. Zároveň bylo zjištěno, že mechanismus účinku *o*-topolin ribosidu je odlišný od běžně používaných chemoterapeutik (Voller et al., 2010). Právě ribosidy CK byly zkoumány jako potenciální terapeutika pro léčbu onkologických onemocnění – *in vitro* na různých nádorových buněčných liniích dokážou inhibovat růst buněk, zapříčinit apoptózu či mohou mít antiangiogenní účinek (Voller et al., 2019). Pro terapii onkologických onemocnění byly také úspěšně testovány syntetické *C2*-, *N9*-deriváty CK, např. 2-[[6-(benzylamino)-9-methylpurin-2-yl]amino]ethanol (olomoucín), 2-[[[2-[[[(2*R*)-1-hydroxybutan-2-yl]amino]-9-propan-2-yl]purin-6-yl]amino]methyl]fenol (olomoucín II) či (2*R*)-2-[[6-(benzylamino)-9-propan-2-yl]purin-2-yl]amino]butan-1-ol (R roscovitin), jejichž mechanismem účinku je inhibice cyklin-dependentních kinas, čímž dokážou regulovat buněčný cyklus (Doležal a Strnad, 2017).

Mimo aplikaci v medicíně mají CK a jejich deriváty využití v kosmetickém průmyslu. Již v 90. letech 20. století bylo na buněčné linii lidských fibroblastů zjištěno, že kinetin dokáže snižovat intenzitu projevu procesů spojených se stárnutím buněk, jako je např. změna rychlosti růstu a velikosti buněk či změny v organizaci cytoskeletu a kinetin se tak stal molekulou zájmu pro využití v kosmetice (Rattan a Clark, 1994; Rattan, 2002). Po tomto významném objevu bylo pochopitelně usilováno o možnost využívat kinetin v kosmetice jako bioaktivní substanci, která je schopná chránit lidské kožní buňky a zamezit jejich stárnutí. Potenciální aplikace CK pro terapeutické účely v dermatologii, ale také pro estetické benefity v kosmetice, tkví v jejich schopnosti UV protekce, zlepšení hojení ran, schopnosti modulovat syntézu melaninu a diferenciaci keratinocytů (Voller et al., 2017). Bylo zjištěno, že schopnost kinetinu ovlivnit stárnutí lidských kožních buněk lze zvýšit navázáním substituentu v pozici *N9*- (Szüčová et al., 2009; Szüčová et al., 2011; Doležal a Strnad, 2017). Látka 6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)-purin je v kosmetice užívána pod komerčním názvem pyratin. V klinických studiích bylo prokázáno, že její přídavek do krému dokáže nejen snížit výskyt vrásek a dokáže zamezit vysychání pokožky (McCullough, Garcia a Reece, 2008), ale také již ve velmi nízkých přídavicích ($\approx 0,1\%$) ulevit pacientům s různými kožními onemocněními, jako je např. růžovka (Tremaine et al., 2010). Ke stejnému závěru došla výzkumná skupina Wu et al. (2007) také při aplikaci krému obsahující 0,1 % kinetinu. Mimo zmíněné pozitivní účinky na lidské kožní buňky bylo také prokázáno, že deriváty kinetinu s různými substituenty na furfurylovém zbytku

a substituentem v *N9*-pozici mohou chránit lidské fibroblasty i keratinocyty před UVA a UVB zářením (Hönig et al., 2018).

Kinetin a jeho deriváty však nejsou jedinými molekulami z řad CK, které mají vliv na lidské kožní buňky. Bylo zjištěno, že také zeatin může pozitivně ovlivňovat znaky provázející stárnutí buněk – aplikací *trans*-zeatinu se podařilo předejít zvětšení buněk a zachovat schopnost buněk rozkládat peroxid vodíku či vyrovnat se s oxidativním stresem (Rattan a Sodagam, 2005). Také bylo naznačeno, že přídavek *trans*-zeatinu může hrát roli v protekci fibroblastů inhibicí UVB-indukované exprese matrixových metaloproteinas (Yang et al., 2009). Dalším CK s potenciálním využitím v kosmetických přípravcích je *para*-topolin, jehož 0,1% přídavek byl hodnocen v klinické studii autorů Garcia et al. (2018). Výsledkem studie bylo zlepšení hydratace kůže, snížení zarudnutí a omezení četnosti lézí akné u testovaných subjektů. Zároveň došlo také ke snížení výskytu vrásek a hrubosti kůže v oblasti obličeje.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

- 4-dimethylaminopyridin (DMAP; Acros Organics),
- 4-hydroxybenzylamin (Sigma-Aldrich),
- 6-chlorpurin (OlChemIm, s.r.o.),
- acetanhydrid (HoneyWell Fluka),
- aceton (VWR Chemicals),
- benzylbromid (VWR Chemicals),
- chlorid amonný (Penta, s.r.o.)
- chlorid sodný (Lach-ner, s.r.o.)
- chloroform (VWR Chemicals),
- chloroform-*d* (VWR Chemicals),
- destilovaná voda (Katedra chemické biologie, PřF UPOL),
- dichlormethan (DCM; VWR Chemicals),
- diethylether (Lach-Ner, s.r.o.)
- dimethylformamid (DMF; Penta, s.r.o.),
- dimethylsulfoxid-*d*₆ (DMSO; VWR Chemicals),
- dioxan (Lach-Ner, s.r.o.),
- ethanol (Lach-Ner, s.r.o.),
- ethylacetát (VWR Chemicals),
- hydrogenuhlíčitan sodný (Lach-Ner, s.r.o.),
- imidazol (Sigma-Aldrich),
- kyselina chlorovodíková v ethanolu (1,25M roztok, Sigma-Aldrich),
- kyselina chlorovodíková v dioxanu (4M roztok; Sigma-Aldrich),
- kyselina citronová (Lach-Ner, s.r.o.),
- kyselina ferulová (Sigma-Aldrich),
- kyselina *m*-kumarová (Sigma-Aldrich),
- kyselina octová (Penta, s.r.o.)
- kyselina *p*-toluensulfonová (Sigma-Aldrich),
- kyselina rozmarýnová (Sigma-Aldrich),
- methanol (VWR Chemicals),

- methoxymethyl chlorid (MOM-Cl; Sigma-Aldrich),
- N,N-dicyklohexylkarbodiimid (DCC; HoneyWell Fluka),
- N,N-diisopropylethylamin (DIPEA; Sigma-Aldrich),
- n-propanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- petrolether (VWR Chemicals),
- pyridin (Lach-Ner, s.r.o.),
- síran hořečnatý (Lach-Ner, s.r.o.),
- síran sodný (Lach-Ner, s.r.o.),
- toluen (Lach-Ner, s.r.o.),
- *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (TBDMSCl; Sigma-Aldrich),
- tetrahydrofuran (THF; Acros Organics),
- tetra-*n*-butylamonium fluorid (TBAF; 1M roztok; Sigma-Aldrich),
- uhličitan draselný (Lach-Ner, s.r.o.).

3.2 Přístroje a metody

- analytické váhy Pioneer PX224 (OHAUS),
- magnetická míchačka MR Hei-Tec 135mm (Heidolph),
- rotační vakuová odparka Hei-VAP (Heidolph),
- sušárna Memmert UF 55 (Memmert GmbH.),
- ultrazvuková lázeň Elmasonic S100 (Elma),
- TLC destičky Silica F254 (VWR Chemicals).

Ke stanovení bodu tání připravených látek byl použit přístroj Büchi Melting Point B-540 (BÜCHI Labortechnik AG). Samotné stanovení probíhalo ve skleněné kapiláře, jako počáteční teplota bylo nastaveno 40 °C a jako maximální teplota bylo nastaveno 400 °C. Teplotní gradient byl nastaven na 5 °C/min. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Janou Kočířovou.

Stanovení čistoty a molekulové hmotnosti připravených látek probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV/VIS (HPLC-UV/VIS; ACQUITY UPLC H-class System; Waters) v zapojení s hmotnostní spektrometrií (MS; Qda; Waters). Vzorky byly rozpuštěny v methanolu a separovány na koloně Symetry C18 (délka 150 mm; průměr 2,1 mm; pórovitost 5 μm) v gradientu methanolu a 15mM mravenčanu amonného (0-90 %; 45 min). Absorbance analytů

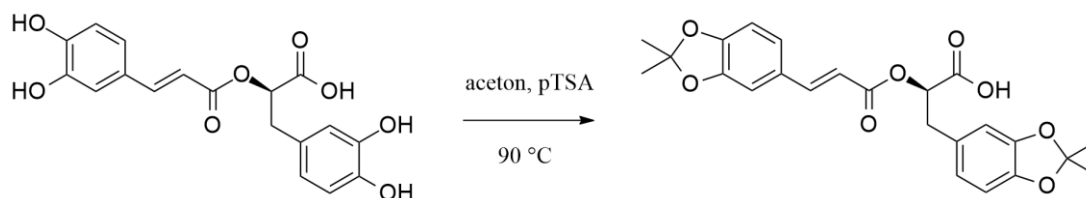
byla detekována při vlnových délkách 210-400 nm. Následně byl eluát použit pro stanovení molekulové hmotnosti a byl veden do iontového zdroje, kde byly molekuly ionizovány pomocí ionizace elektrosprejem v kladném i záporném módu (ESI⁺ a ESI⁻). Ionty byly analyzovány v kvadrupólovém analyzátoru. Měření probíhalo ve FULLSCAN módu, rozsah m/z byl 50-1000. U látek přečištěných pomocí preparativní HPLC byla purifikace provedena na chromatografu Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) s hmotnostním detektorem Agilent Infinity Lab LC/MAD (Agilent Technologies). Vzorky určené k purifikaci byly rozpuštěny v methanolu a vedeny na kolonu Agilent 5Prep-C18 (délka 50 mm; průměr 21,2 mm; pórovitost 5 μm), kde byly separovány v gradientu vody a methanolu (10-90 %). Spektra HRMS (high-resolution mass spectrometry) byla získána měřením na hmotnostním spektrometru Agilent 6230 Time-of-Flight (Agilent Technologies). Molekuly byly ionizovány elektrosprejem v kladném módu v ionizátoru Dual AJS ESI. Měření bylo provedeno ve FULLSCAN módu v rozsahu m/z odpovídajícím 100-1700. Všechna HPLC-MS a HRMS měření, preparativní HPLC purifikace látek byla provedena Mgr. Hanou Omámikovou.

Pro změření spekter nukleární magnetické rezonance (NMR) byl použit NMR spektrometr JEOL 500-ECA. Použité frekvence odpovídaly 500 MHz pro ¹H a 126 MHz pro ¹³C. Základní principy interpretace NMR spekter byly konzultovány s Mgr. Václavem Mikem, Ph.D. a samotná spektra byla poté vyhodnocena ve spolupráci s Bc. Vítem Guiglielmo Mišurcem.

3.3 Syntéza

V následujících kapitolách jsou uvedeny reakční postupy spolu s reakčními schémata (Obrázek 7 – Obrázek 24) experimentů provedených v rámci praktické části diplomové práce. Cílem reakcí popsaných v následujících kapitolách bylo připravit konjugáty HCA kyselin s *para*-topolinem. Prvním krokem bylo ochránění volných hydroxylových skupin na molekulách kyselin, aby následná konjugace proběhla mezi karboxylovou funkční skupinou kyseliny a hydroxylovou skupinou *para*-topolinu. Druhým krokem byla samotná konjugační reakce ochráněné kyseliny s derivátem *para*-topolinu, který byl v pozici *N9*- chráněn pomocí THP skupiny. Posledním krokem pak byla deprotektace chráněných skupin na připravených konjugátech. Syntéza molekul popsána níže byla provedena ve spolupráci s RNDr. Markem Zatloukalem, Ph.D.

3.3.1 Pokus o přípravu kyseliny (*R,E*)-3-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-((3-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)akryloyl)oxy)propanové (látka 1)



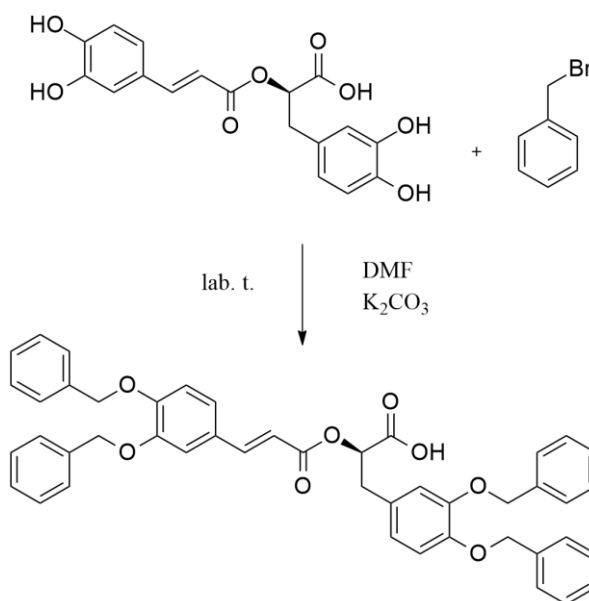
Obrázek 7 Reakční schéma přípravy (*R,E*)-3-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-((3-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)akryloyl)oxy)propanové

Do varné baňky bylo předloženo 100 mg kyseliny rozmarýnové (1 eq), které bylo rozpuštěno ve 160 ml acetonu (nutno použít velký nadbytek rozpouštědla pro jeho adekvátní kondenzaci přes molekulové síto v Soxhletově extraktoru). Do reakční směsi byla přidána v katalytickém množství kyselina *p*-toluensulfonová (2,6 mg; 0,05 eq). Byla sestavena reakční aparatura skládající se ze Soxhletova extraktoru s patronou naplněnou molekulovým sítem a chladiče. Takto sestavená reakční aparatura byla inertizována dusíkem a varná baňka byla umístěna na olejovou lázeň o teplotě 90 °C, kde byla reakční směs za míchání (600 RPM) ponechána po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze byla složená z ethylacetátu, ethanolu a kyseliny octové v poměru 4:1:0,5). Reakční směs byla zpracována extrakcí destilovanou vodou (3 x 30 ml), organická fáze byla vysušena pomocí Na₂SO₄, zfiltrována přes fritu a filtrát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce (RVO) při 40 °C, 10 mbar a 150 RPM. Odpařením byl získán tmavě hnědý olejovitý produkt.

Uvedený reakční postup byl také modifikován pro syntézu pouze za laboratorní teploty bez využití Soxhletova extraktoru a chladiče. Množství kyseliny rozmarýnové bylo totožné (100 mg; 1 eq), bylo však navýšeno množství kyseliny *p*-toluensulfonové (5 mg; 0,095 eq) a bylo upraveno množství acetonu na 10 ml. Reakční směs byla inertizována dusíkem a byla ponechána po dobu 24 hodin za stálého míchání. Následně bylo postupováno stejně jako v předchozím případě.

Látka **1** nebyla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz ani jedním z uvedených reakčních postupů.

3.3.2 Pokus o přípravu kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka **2**)



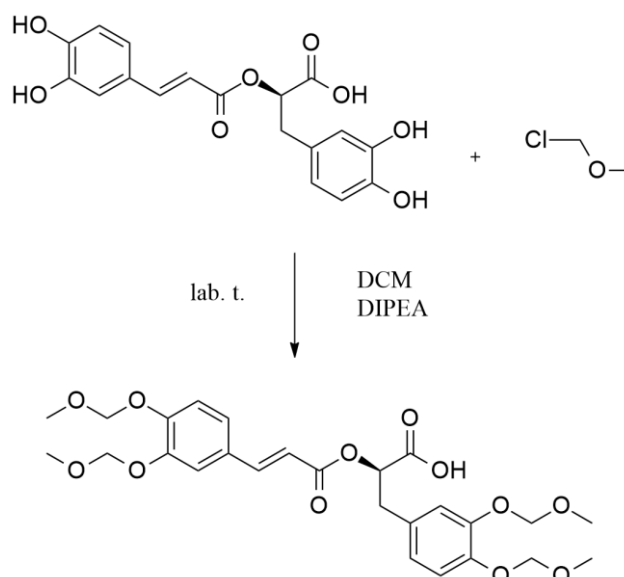
Obrázek 8 Reakční schéma přípravy kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(benzyloxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové

Ve varné baňce byla rozpuštěna kyselina rozmarýnová (300 mg; 1 eq) a K₂CO₃ (690,4 mg; 6 eq) ve 1,66 ml DMF. Reakční směs byla inertizována dusíkem a míchána (600 RPM) a po 1 hodině byl přidáván po kapkách benzylbromid (495 μ l; 5 eq) za externího chlazení ledovou tříští. Poté byla reakční směs temperována na laboratorní teplotu a míchána po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze ethylacetát – petrolether – kyselina octová; 3:1:0,5). Reakční směs byla zpracována výtřepem ve směsi destilované vody a toluenu v poměru 1:1 (2 x 10 ml). Organická fáze byla třepána se solankou (2 x 10 ml) a dále byla vysušena pomocí Na₂SO₄, následně byla zfiltrována přes fritu a zahuštěna na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odparek byl rekrystalizován v petroletheru, kdy byl k odparku umístěného v olejové lázni ohříván na 70 °C postupně přidáván petrolether do rozpuštění produktu po malých dávkách (250 μ l) v průběhu přibližně 30 minut. Varná baňka byla poté zchlazena na laboratorní teplotu a byla ponechána

v lednici (4 °C) do druhého dne k rekrystalizaci. Následně byla směs odpařena do sucha na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM) a bylo k ní přidáno 10 ml diethyletheru, směs byla promíchána a odpařena na RVO. Přídavek diethyletheru a následné zahuštění na RVO bylo provedeno celkem 3x. Odpařením byl získán žlutohnědý olejovitý produkt.

Látka **2** nebyla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz ani po modifikaci reakčních postupů.

3.3.3 Příprava kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 3)



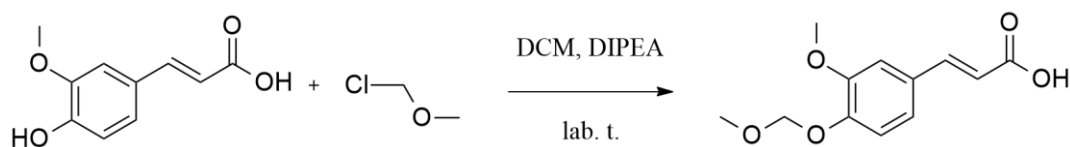
Obrázek 9 Reakční schéma přípravy kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(methoxymethoxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové

Kyselina rozmarýnová (200 mg; 1 eq) byla navážena do varné baňky a byla rozpuštěna v 5 ml DCM. Reakční směs byla inertizována dusíkem a za externího chlazení ledovou tříští byla přidávána DIPEA (580 μ l; 6 eq) a následně byl přidán MOM-Cl (255 μ l; 6 eq) ve 3 ml DCM. Reakční směs byla temperována na laboratorní teplotu a průběh reakce byl po 1 hodině zkontrolován na TLC (mobilní fáze hexan – ethylacetát; 7:3). Na TLC byla stále detekována přítomnost výchozí látky, bylo tedy přidáno 85 μ l MOM-Cl v 1 ml DCM a reakční směs byla ponechána za míchání do druhého dne při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zpracována výtřepem s nasyceným roztokem

NH₄Cl (3 x 5 ml) a organická fáze byla oddělena a uschována. Vodná fáze byla následně extrahována etherem (3 x 10 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny přidávkem Na₂SO₄, následně byly zfiltrány přes fritu a filtrát byl zahuštěn na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán hnědý olejovitý produkt.

Látka **3** (C₂₆H₃₂O₁₂; M_r = 536,56) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **3** v odparku odpovídalo 14,2 % (R_T = 21,72), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odvozený z naměřené HPLC-MS čistoty a hmotnosti odparku zpracované reakční směsi vztažený k vypočtenému teoretickému výtěžku odpovídal 8 %, tato hodnota však nezahrnuje ztráty, které by případná purifikace přinesla.

3.3.4 Příprava kyseliny *E*-3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové (látka 4)

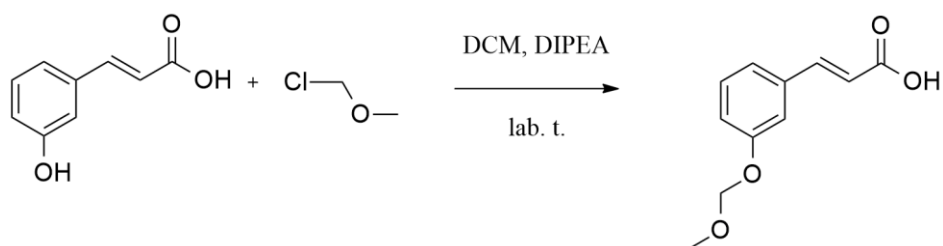


Obrázek 10 Reakční schéma přípravy kyseliny *E*-3-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové

Kyselina ferulová (100 mg; 1 eq) byla navážena do varné baňky a rozpuštěna ve 2 ml DCM. Analogicky dle výše uvedeného reakčního postupu (kapitola 3.3.3) byla dále přidána DIPEA (179 μ l; 2 eq) a MOM-Cl (59 μ l) ve 3 ml DCM a po 1 hodině bylo přidáno 20 μ l MOM-Cl v 1 ml DCM a reakční směs byla ponechána do druhého dne za míchání při laboratorní teplotě. Reakční směs byla dále zpracována totožně jako v předchozím případě. Odpařením byl získán nažloutlý olejovitý produkt.

Látka **4** (C₁₂H₁₄O₅; M_r = 238,24) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **4** v odparku odpovídalo 29,7 % (R_T = 16,79), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 22 %.

3.3.5 Příprava kyseliny *E*-3-(3-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové (látka 5)

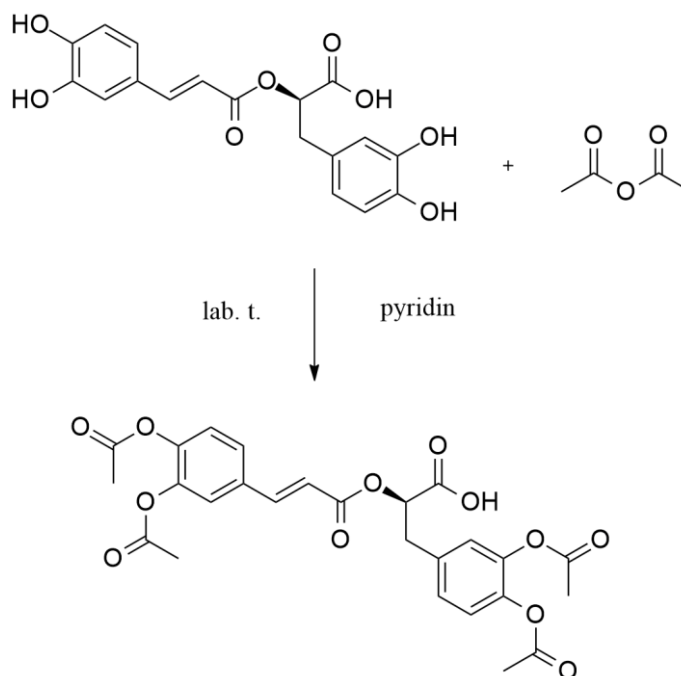


Obrázek 11 Reakční schéma přípravy kyseliny *E*-3-(3-(methoxymethoxy)fenyl)akrylové

Kyselina *m*-kumarová (100 mg; 1 eq) byla navážena do varné baňky a byla rozpuštěna ve 2 ml DCM. Analogicky dle výše uvedeného reakčního postupu (kapitoly 3.3.3 a 3.3.4) byla dále přidána DIPEA (212 μ l; 2 eq) a MOM-Cl (69 μ l) ve 3 ml DCM a po 1 hodině bylo přidáno 23 μ l MOM-Cl v 1 ml DCM a reakční směs byla ponechána do druhého dne za míchání při laboratorní teplotě. Reakční směs byla dále zpracována totožně jako v předchozím případě. Odpařením byl získán žlutohnědý olejovitý produkt.

Látka **5** (C₁₁H₁₂O₄; M_r = 208,21) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **5** v odparku odpovídalo 48,2 % (R_T = 17,24), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 25 %.

3.3.6 Příprava kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-diacetoxyfenyl)-2-((3-(3,4-diacetoxyfenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 6)

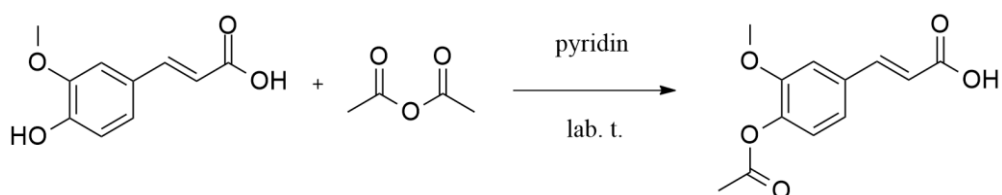


Obrázek 12 Reakční schéma přípravy kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-diacetoxyfenyl)-2-((3-(3,4-diacetoxyfenyl)akryloyl)oxy)propanové

Do varné baňky bylo naváženo 250 mg kyseliny rozmarýnové (1 eq), která byla následně rozpuštěna v pyridinu (670 μ l; 15 eq) a reakční směs byla inertizována dusíkem. Reakční směs byla za míchání chlazená na ledové lázni a byl přikapáván acetanhydrid (525 μ l; 10 eq). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze chloroform – methanol 19:1). Poté byla reakční směs temperována na laboratorní teplotu a ponechána za míchání do druhého dne, kdy byla zpracována přidávkem směsi ethylacetátu a destilované vody v poměru 1:1 (5 ml). Organická fáze byla separována a dále třepána se solankou a následně vysušena pomocí Na_2SO_4 . Vysušená organická fáze byla zfiltrována přes fritu a filtrát byl zahuštěn na RVO (40 $^\circ\text{C}$, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán nahnědlý krystalický produkt.

Látka 6 ($\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$; $M_r = 528,46$) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky 6 v odparku odpovídalo 88,3 % ($R_T = 18,00$), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtežek odpovídal 27 %.

3.3.7 Příprava kyseliny *E*-3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylové (látka 7)



Obrázek 13 Reakční schéma přípravy kyseliny *E*-3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylové

Kyselina ferulová (250 mg; 1 eq) byla navážena do varné baňky, rozpuštěna v 1,55 ml pyridinu (15 eq) a reakční směs byla inertizována dusíkem. Dále bylo (analogicky dle kapitoly 3.3.6) pokračováno přidáním 10 eq acetanhydridu (1,22 ml) za míchání a chlazení na ledové lázni. Reakční směs byla temperována na laboratorní teplotu a ponechána za míchání do druhého dne. Zpracování reakční směsi bylo totožné jako v předchozí kapitole (**postup I**). Odpařením byl získán nažloutlý krystalický produkt. Pro zpracování reakčních směsí acetylovaných kyselin ferulové a *m*-kumarové (kapitola 3.3.8) byl také navržen alternativní postup II.

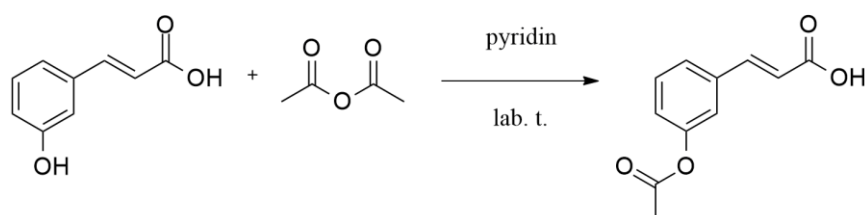
V případě **postupu II** bylo zvoleno odlišné zpracování reakční směsi. Reakční směs byla po 24 hodinách zahuštěna na RVO a následně bylo k malému množství zahuštěné reakční směsi přidáno 20 ml destilované vody. Takto připravená směs byla ponechána za míchání při laboratorní teplotě po dobu 30 minut pro převedení přebytečného acetanhydridu na kyselinu octovou. Směs byla každých 10 minut přenesena do ultrazvukové lázně, kde byla krátce ponechána. Po 30 minutách byla směs na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM) odpařena do sucha. K odparku bylo přidáno 20 ml diethyletheru a směs byla ponechána za míchání na ledové lázni po dobu 1 hodiny. Vzniklé bílé krystaly byly zfiltrány přes fritu a byly ponechány k sušení při 50 °C po dobu 8 hodin.

Látka 7 (C₁₂H₁₂O₅; M_r = 236,22) byla získána jako bílá pevná látka. Výtěžek reakcí odpovídal 77 % pro postup I a 88 % pro postup II. Bod tání látky 7 byl stanoven na 193-194 °C. HPLC-MS: čistota = 99+ %; R_T = 15,92 min; ESI⁻ [M-H]⁻ 235,15 (100 %), 235,89 (12,3 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.43 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168.47, 167.67, 151.18, 143.41, 140.82, 133.30, 123.24, 121.42, 119.56, 111.83, 56.01, 20.45.

3.3.8 Příprava kyseliny *E*-3-(3-acetoxyfenyl)akrylové (látka 8)

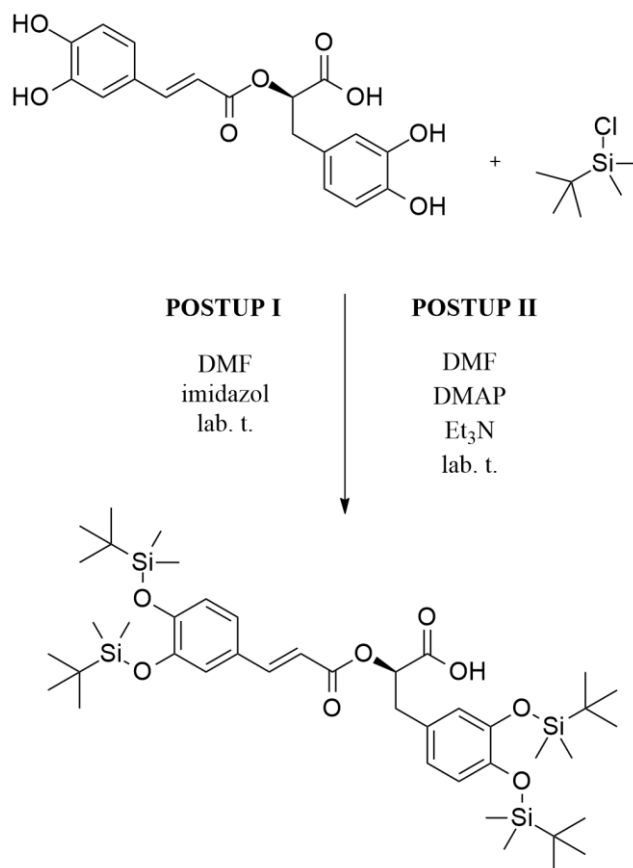


Obrázek 14 Reakční schéma přípravy kyseliny *E*-3-(3-acetoxyfenyl)akrylové

Kyselina *m*-kumarová (250 mg; 1 eq) byla navážena do varné baňky a rozpuštěna v 1,84 ml pyridinu (15 eq). Za míchání a chlazení na ledové lázni bylo přidáno 1,43 ml (10 eq) acetanhydridu. Reakční směs byla temperována na laboratorní teplotu a byla ponechána za míchání do druhého dne. Následující kroky pro zpracování reakční směsi jsou popsány v předchozích kapitolách (**postup I** – 3.3.6; **postup II** – 3.3.7). V případě postupu I byl odpařením získán nažloutlý olejovitý produkt. V případě postupu II byl krystalizací v diethyletheru a následnou filtrací získán sytě žlutý krystalický produkt, který byl ponechán k sušení při 50 °C po dobu 8 hodin.

Látka **8** ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$; $M_r = 206,19$) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **8** v odparku odpovídalo 87,4 % pro postup I a 83,2 % pro postup II ($R_T = 13,69$), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 75 % pro postup I a 58 % pro postup II.

3.3.9 Pokus o přípravu kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové (látka 9)



Obrázek 15 Reakční schéma (*R,E*)-3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové

Pro přípravu kyseliny (*R,E*)-3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)-2-((3-(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akryloyl)oxy)propanové byly použity dva přístupy – nejprve byl zkoušen první postup s imidazolem, jako druhý byl zkoušen postup využívající katalytické množství DMAP a triethylamin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC, v obou případech byla použita mobilní fáze hexan – ethylacetát – kyselina octová; 7:1:0,5.

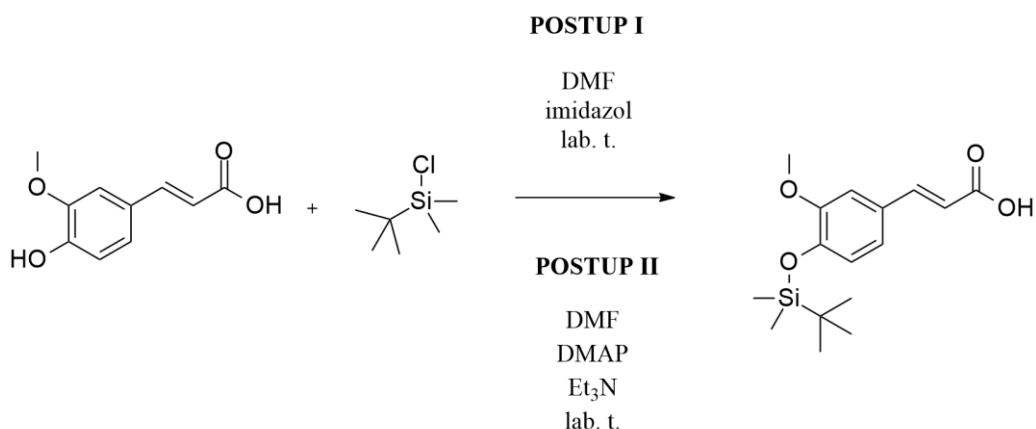
Postup I: Do varné baňky byla předložena kyselina rozmarýnová (200 mg; 1 eq), imidazol (302,3 mg; 8 eq) a DMF (2 ml). Reakční směs byla inertizována dusíkem, chlazená externě ledovou tříští a za stálého míchání byl během 30 minut

přidán po malých množstvích TBDMSCl. Následně byla reakční směs temperována na laboratorní teplotu a byla ponechána za míchání po dobu 24 hodin. Surová reakční směs byla zpracována výtřepem s nasyceným roztokem NaHCO₃, organická fáze byla oddělena a uschována, vodná fáze byla extrahována diethyletherem. Spojené organické fáze byly vysušeny pomocí Na₂SO₄, zfiltrány přes fritu a zahuštěny na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán hnědý olejovitý produkt.

Postup II: Bylo naváženo 500 mg kyseliny rozmarýnové (1 eq) spolu s 920,27 mg TBDMSCl (4,4 eq) a 20,34 mg DMAP (0,12 eq). Navážené látky byly předloženy do varné baňky, bylo přidáno 5 ml DMF, reakční směs byla inertizována dusíkem a míchána. Za laboratorní teploty bylo po kapkách přidáno 1,45 ml triethylaminu (7,5 eq). Reakce byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Následně byla reakční směs zpracována výtřepem s destilovanou vodou (3 x 5 ml) a solankou (3 x 5 ml). Organická fáze byla oddělena a uschována, vodná fáze byla extrahována ethylacetátem. Spojené organické fáze byly vysušeny pomocí Na₂SO₄, zfiltrány přes fritu a filtrát byl zahuštěn na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán tmavě hnědý olejovitý produkt.

Látka **9** nebyla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz ani jedním z uvedených reakčních postupů.

3.3.10 Příprava kyseliny *E*-3-(4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxyfenyl)akrylové (látka **10**)



Obrázek 16 Reakční schéma přípravy *E*-3-(4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-methoxyfenyl)akrylové

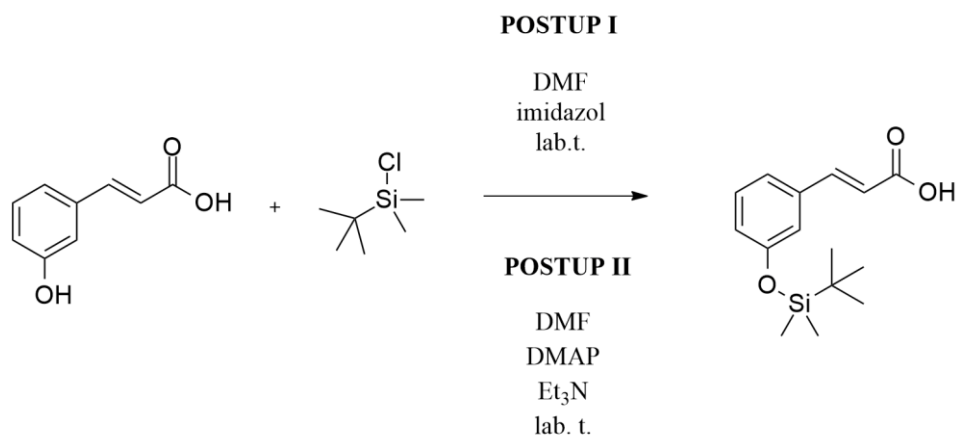
V obou provedených experimentech bylo postupováno analogicky jako v předchozím případě (kapitola 3.3.9), pouze byl následovně upraven poměr reaktantů:

- **postup I:** bylo naváženo 200 mg kyseliny ferulové (1 eq), 140,20 mg imidazolu (2 eq) a reaktanty byly za míchání rozpuštěny v 2,1 ml DMF → následně bylo za externího chlazení ledovou lázní přidáno dle postupu uvedeného výše po malých množstvích 186,27 mg TBDMSCl (1,2 eq),
- **postup II:** bylo naváženo 500 mg kyseliny ferulové (1 eq), 426,8 mg TBDMSCl (1,1 eq), 9,43 mg DMAP (0,03 eq) a reaktanty byly za míchání rozpuštěny v 5 ml DMF → následně bylo dle postupu uvedeného výše přidáváno po kapkách 0,9 ml triethylaminu (2,5 eq).

Odpařením byl v případě postupu I získán velmi světle nažloutlý olejovitý produkt. V případě postupu II byl odpařením získán žlutý olejovitý produkt.

Látka **10** ($C_{16}H_{24}O_4Si$; $M_r = 308,44$) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz pouze při použití postupu II, procentuální zastoupení látky **10** v odparku odpovídalo 27,7 % ($R_T = 27,93$), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtežek odpovídal 1 %.

3.3.11 Příprava kyseliny *E*-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylové (látka 11)



Obrázek 17 Reakční schéma přípravy *E*-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylové

Při přípravě kyseliny *E*-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylové bylo postupováno analogicky jako v kapitole 3.3.9 s dodrženími poměry reaktantů odpovídajícími kapitole 3.3.10, tedy:

- **postup I:** bylo naváženo 200 mg kyseliny *m*-kumarové (1 eq), 168,88 mg imidazolu (2 eq), které byly rozpuštěny v 2,5 ml DMF → následně bylo za externího chlazení ledovou lázní přidáno 150,72 mg TBDMSCl (1,2 eq),
- **postup II:** bylo naváženo 200 mg kyseliny *m*-kumarové (1 eq), 202 mg TBDMSCl (1,1 eq) a 4,4 mg DMAP (0,03 eq), které byly rozpuštěny v 2 ml DMF → následně bylo po kapkách přidáváno 0,43 ml triethylaminu (2,5 eq).

První reakční postup byl také modifikován použitím 3 eq imidazolu (248,8 mg) při opakování experimentu. Odpařením byl v případě postupu I získán žlutohnědý olejovitý produkt. V případě postupu II byly odpařením získány světle žluté krystalky obklopené sytě žlutým olejem – tento produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií. Stacionární fází tvořil silikagel, na který byl nanesen získaný produkt rozpuštěný v chloroformu. Samotná separace probíhala v gradientu chloroformu a methanolu (100:0, 99:1, 49:1, 32:1, 24:1, 19:1, 16:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1). Jednotlivé frakce byly sledovány pomocí TLC (mobilní fáze chloroform – methanol; 9:1) proti surovému produktu, skvrny byly detekovány pod UV zářením a frakce odpovídající produktu byly sbírány a odpařeny na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM).

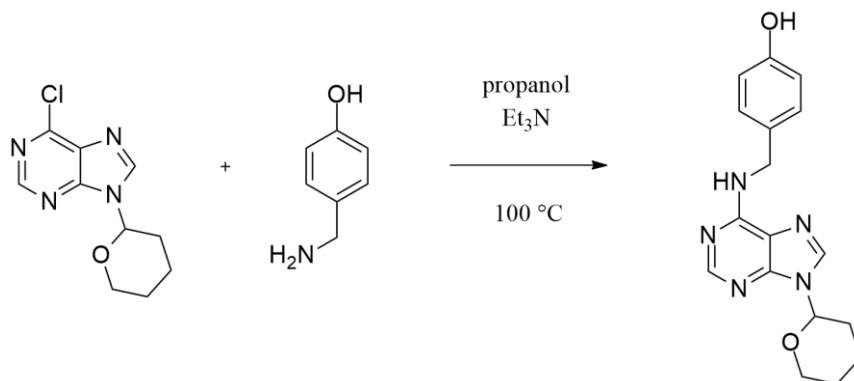
Látka **11** (C₁₅H₂₂O₃Si; M_r = 278,42) byla získána jako nažloutlá pevná látka. Výtěžek reakcí odpovídal 63 a 68 % pro postup II. V případě postupu I nebyla zpracovaná reakční směs purifikována kvůli nízkému očekávanému výtěžku (7 %). Bod tání látky **11** byl stanoven na 111-114 °C. HPLC-MS: čistota = 96,2 % (purifikováno sloupcovou chromatografií); R_T = 27,36 min; ESI⁺ [M-H]⁺ 277,19 (100 %), 278,07 (21,3 %), 279,15 (6,7 %).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ (ppm): 7.74 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7.16 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.89 (ddd, *J* = 8.1, 2.5, 1.0 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.22 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ (ppm): 172.36, 156.26, 147.16, 135.58, 130.09, 122.79, 121.83, 119.75, 117.48, 25.78, 18.34, -4.26.

3.3.12 Příprava

4-(((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenolu (látka 12)



Obrázek 18 Reakční schéma přípravy 4-(((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenolu

Do tlakové ampule bylo předloženo 200 mg 6-chlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin (1 eq) a 105 mg 4-hydroxybenzylaminu (1 eq), které byly rozpuštěny za míchání ve 3 ml n-propanolu. Reakční směs byla inertizována dusíkem a byla zahřívána při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze ethylacetát – toluen; 1:1). Reakční směs byla zahuštěna na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM) a odparek byl rekrystalizován v methanolu při 80 °C – v průběhu 30 minut byl postupně přidáván methanol po 250 μ l do rozpuštění odparku. Reakční směs byla poté ponechána ke krystalizaci v lednici (4 °C) po dobu 24 hodin. Vzniklé bílé krystaly byly zfiltrány přes fritu a promyty vychlazeným methanolem. Krystaly byly ponechány k sušení při 50 °C po dobu 8 hodin.

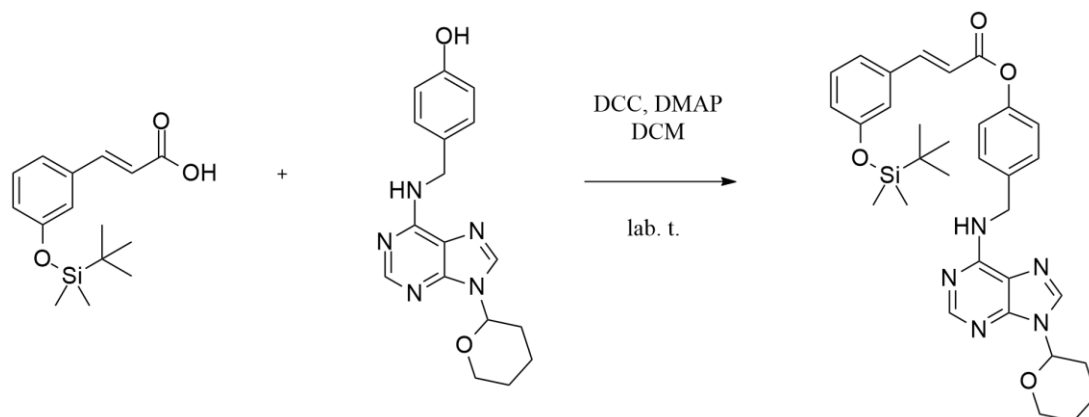
Látka **12** (C₁₇H₁₉N₅O₂; M_r = 325,37) byla získána jako bílá pevná látka. Výtěžek reakce odpovídal 84 %. Bod tání látky **12** byl stanoven na 186-187 °C. HPLC-MS: čistota = 96,6 %; R_T = 11,51 min; ESI⁺ [M+H]⁺ 326,16 (100 %); 327,17 (20,6 %); 328,17 (2,4 %); 329,18 (0,1 %).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ (ppm): 8.43 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.07 – 6.91 (m, 2H), 6.66 – 6.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 5.73 (dd, *J* = 10.7, 2.4 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.22 – 4.10 (m, 1H), 3.77 (td, *J* = 11.7, 2.7 Hz, 1H), 2.16 – 1.95 (m, 3H), 1.82 – 1.68 (m, 2H), 1.66 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, chloroform-*d*) δ (ppm): 156.10, 154.17, 153.62, 148.29, 137.58, 129.34, 118.84, 115.79, 82.18, 69.02, 44.28, 32.11, 24.96, 22.86.

3.3.13 Příprava

E-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu (látka 13)



Obrázek 19 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu

Ve varné baňce byl rozpuštěn 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (350,7 mg; 1 eq) v 17 ml DCM. Byly naváženy ostatní reaktanty a byly přidány do reakční směsi v tomto pořadí – kyselina *E*-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylová (300 mg; 1 eq), DCC (222,4 mg; 1 eq) a DMAP (13,1 mg; 0,1 eq). Reakční směs byla inertizována a za míchání byla ponechána po dobu 24 h. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze chloroform – methanol; 19:1). Po vyloučení dicyklohexylmočoviny byla reakční směs zfiltrována a filtrát byl zahuštěn na RVO. Následně byl odparek rozpuštěn ve 20 ml ethylacetátu a takto připravená organická fáze byla extrahována 2% roztokem NaHCO₃ (3 x 10 ml) a 1% roztokem kyseliny citronové (3 x 10 ml). Organická fáze byla dále vytřepána se solankou (2 x 10 ml) a byla vysušena pomocí MgSO₄. Po filtraci přes fritu byl filtrát zahuštěn na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán nažloutlý olejovitý produkt. Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie v gradientu chloroformu a methanolu. Stacionární fázi tvořil silikagel, na který byl nanesen získaný produkt rozpuštěný v chloroformu. Samotná separace probíhala v gradientu chloroformu a methanolu (100:0, 99:1, 98:1, 97:1, 96:1, 95:1, 94:1, 93:1, 92:1, 90:1, 88:1, 86:1, 84:1, 82:1, 80:1, 78:1, 76:1, 72:1, 68:1, 64:1, 60:1). Jednotlivé frakce byly sledovány pomocí TLC (mobilní fáze chloroform – methanol; 19:1) proti surovému

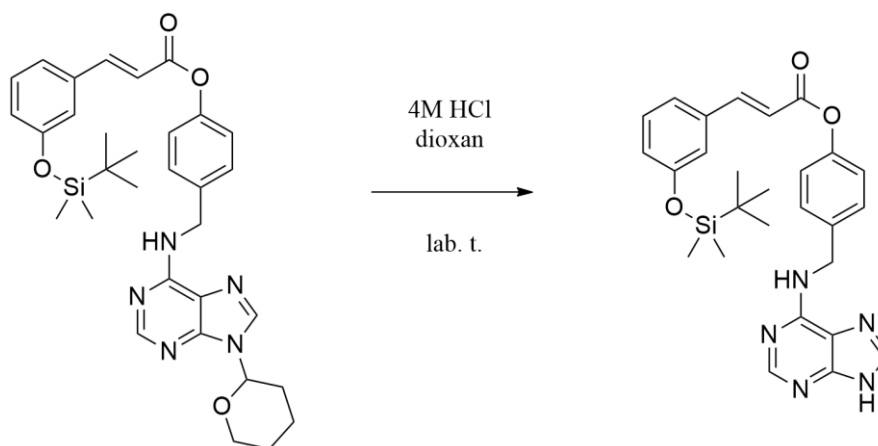
produktu, skvrny byly detekovány pod UV zářením a frakce odpovídající produktu byly sbírány a odpařeny na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM).

Látka **13** (C₃₂H₃₉N₅O₄Si; M_r = 585,77) byla získána jako bílá pevná látka. Výtěžek reakce odpovídal 57 %. Bod tání látky **13** byl stanoven na 64 °C. HPLC-MS: čistota = 98,0 % (purifikováno sloupcovou chromatografií); R_T = 31,36 min; ESI⁺ [M+H]⁺ 586,28 (100 %); 587,29 (40,5 %); 588,29 (12,1 %); 589,29 (2,7 %); 590,29 (0,5 %).

¹H NMR (500 MHz, chloroform-*d*) δ (ppm): 8.40 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.44 – 7.43 (m, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 7.15 – 7.09 (m, 2H), 7.04 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.28 (bs, 1H), 5.71 (dd, *J* = 10.7, 2.4 Hz, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.19 – 4.14 (m, 1H), 3.83 – 3.73 (m, 1H), 2.17 – 1.94 (m, 4H), 1.82 – 1.59 (m, 2H), 0.99 (s, 9H), 0.21 (s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 165.07, 155.57, 152.65, 149.17, 146.19, 138.94, 135.50, 130.20, 128.24, 122.46, 121.95, 121.62, 119.87, 117.59, 80.87, 67.70, 42.39, 30.05, 25.59, 24.57, 22.53, 18.01, -4.56.

3.3.14 Příprava *E*-4-(((7*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu (látka 14)



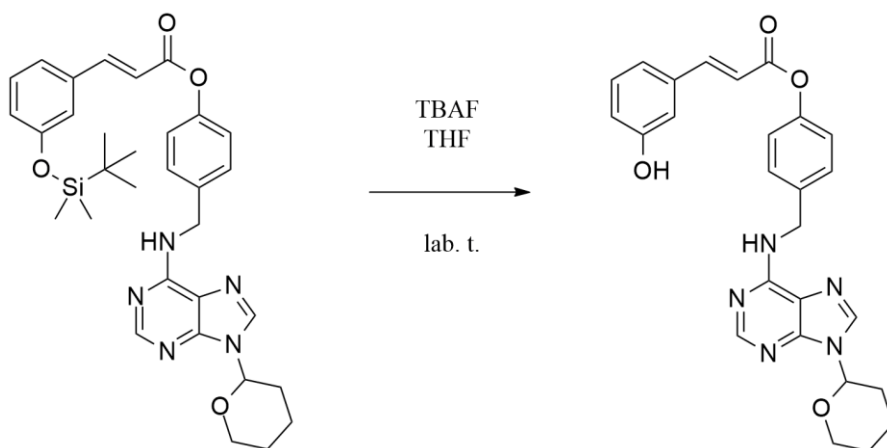
Obrázek 20 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((7*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu

Do varné baňky bylo předloženo 50 mg (1 eq) *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu. Dále bylo přidáno 1,7 ml dioxanu a takto připravená reakční směs byla chlazená

externě studenou vodou o teplotě $\approx 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs byla inertizována dusíkem a za stálého míchání a chlazení bylo přikapáno 340 μl 4M kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Takto připravená reakční směs byla za míchání ponechána 3 hodiny. Průběh reakce byl sledován na TLC (mobilní fázi složené z chloroformu, methanolu a hydroxidu amonného v poměru 19:1:0,05). Reakční směs byla zahuštěna na RVO (30 $^{\circ}\text{C}$, 10 mbar, 150 RPM) a k odparku bylo přidáno 6 ml diethyletheru, kterými byl odparek za míchání rozpuštěn a poté byl ponechán ke krystalizaci v lednici (4 $^{\circ}\text{C}$) po dobu 24 hodin. Z důvodu neúspěšné filtrace (příliš malá velikost vznikajících krystalů) byl filtrát obsahující jemné krystaly kvantitativně přenesen do baňky, jejíž obsah byl znovu zahuštěn na RVO (30 $^{\circ}\text{C}$, 10 mbar, 150 RPM). Odparek byl za míchání rozpuštěn v 5 ml acetonu a po jeho dokonalém rozpuštění byl ponechán ke krystalizaci v lednici (4 $^{\circ}\text{C}$) po dobu 24 hodin. Vzniklé bílé krystaly produktu byly zfiltrvány a byly dále ponechány k sušení při 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 8 hodin.

Látka **14** ($\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3\text{Si}$; $M_r = 501,65$) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **14** v odparku odpovídalo 94,1 % ($R_T = 29,30$), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 92 %.

3.3.15 Příprava *E*-4-(((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu (látka 15)

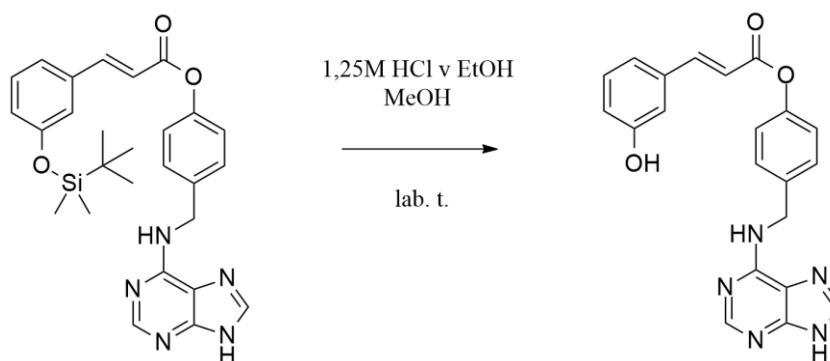


Obrázek 21 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu

Do varné baňky bylo naváženo 100 mg (1 eq) *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu, který byl rozpuštěn v 6 ml THF. Reakční směs byla inertizována dusíkem a byla externě chlazená ledovou tříští. Po vychlazení reakční směsi byl přikapán TBAF a následně byla reakční směs temperována na laboratorní teplotu. Průběh reakce byl kontrolován na TLC s mobilní fází chloroform – methanol; 19:1. K reakční směsi bylo přidáno 6 ml DCM a reakční směs byla zpracována výtřepem s destilovanou vodou (4 x 5 ml) a solankou (3 x 5 ml). Organická fáze byla vysušena pomocí Na₂SO₄, dále byla filtrována přes fritu a filtrát byl zahuštěn na RVO (30 °C, 10 mbar, 150 RPM). Odpařením byl získán mléčný krystalický produkt obklopený nažloutlým olejem.

Látka **15** (C₂₆H₂₅N₅O₄; M_r = 471,51) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **14** v odparku odpovídalo 67,8 % (R_T = 22,80), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 52 %.

3.3.16 Příprava *E*-4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu (látka 16)



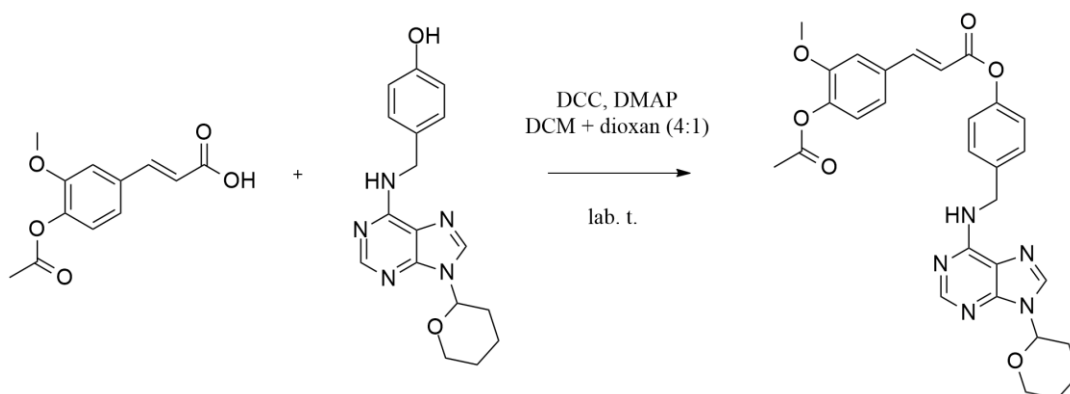
Obrázek 22 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(3-hydroxyfenyl)akrylátu

Do varné baňky bylo naváženo 50 mg *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl-3-(3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)fenyl)akrylátu. Ten byl následně rozpuštěn v 2,5 ml methanolu, reakční směs byla inertizována a externě chlazená ledovou tříští. Po vychlazení reakční směsi bylo po kapkách přidáváno 1,25 ml 1,25M kyseliny chlorovodíkové v ethanolu. Poté byla reakční směs temperována na laboratorní teplotu a byla ponechána za míchání po dobu 24 hodin.

Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze chlorform – methanol; 19:1). Poté byla reakční směs zahuštěna na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM) a následně bylo přidáno 5 ml destilované vody. Reakční směs byla pomocí NH₄OH alkalizována přibližně na pH ≈ 10-11 a po alkalizaci byla baňka s reakční směsí ponechána po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Následně byla reakční směs ponechána ke krystalizaci v lednici (4 °C), odkud byla po 30 minutách vytažena a vzniklé nahnědlé krystaly byly zfiltrány přes fritu. Následně byly sušeny při 50 °C po dobu 8 hodin.

Látka **16** (C₂₇H₁₇N₅O₃; M_r = 387,39) byla ve zpracované reakční směsi detekována pomocí HPLC-MS analýz, procentuální zastoupení látky **16** v odparku odpovídalo 20,7 % (R_T = 19,77), látka však nebyla dále purifikována. Očekávaný výtěžek odpovídal 11 %

3.3.17 Příprava *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu (látka 17)



Obrázek 23 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu

Ve varné baňce byl rozpuštěn 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (551,3 mg; 1 eq) v 40 ml DCM a 10 ml dioxanu. Byly naváženy ostatní reaktanty a byly přidány do reakční směsi – kyselina *E*-3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylová (400 mg; 1 eq), DCC (349,5 mg; 1 eq) a DMAP (20,7 mg; 0,1 eq). Dále bylo postupováno analogicky jako v kapitole 3.3.13. Odpařením byl získán nažloutlý olejovitý produkt, který byl dále přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Stacionární fázi tvořil silikagel, na který byl nanesen získaný produkt

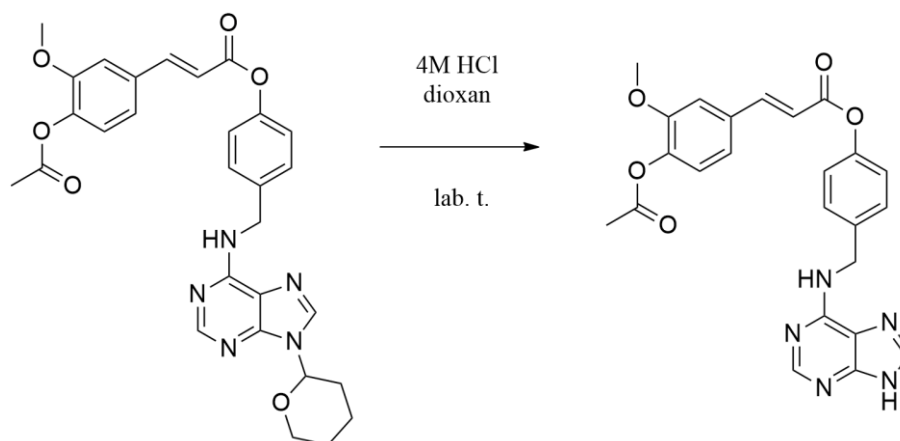
rozpuštěný v chloroformu. Samotná separace probíhala v gradientu chloroformu a methanolu (100:0, 99:1, 98:1, 96:1, 92:1, 88:1, 84:1, 80:1, 76:1, 72:1, 70:1, 68:1, 66:1, 62:1, 56:1, 50:1, 45:1, 40:1). Jednotlivé frakce byly sledovány pomocí TLC (mobilní fáze chloroform – methanol; 19:1) proti surovému produktu, skvrny byly detekovány pod UV zářením a frakce odpovídající produktu byly sbírány a odpařeny na RVO (40 °C, 10 mbar, 150 RPM). Takto byl získán mléčný krystalický produkt, který byl následně přečištěn také pomocí preparativní HPLC.

Látka **17** (C₂₉H₂₉N₅O₆; M_r = 543,57) byla získána jako bílá pevná látka. Výtěžek reakcí ve dvou opakováních odpovídal 27 a 33 %. Bod tání látky **17** byl stanoven na 197-198 °C. HPLC-MS: čistota = 99+ % (purifikováno sloupcovou chromatografií a následně pomocí preparativní HPLC); R_T = 24,61 min; ESI⁺ [M+H]⁺ 544,22 (100 %); 545,22 (32,7 %); 546,23 (6,7 %); 547,23 (1,1 %).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.46 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.40 – 7.39 (m, 2H), 7.37 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz 1H), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.15 – 7.11 (m, 2H), 6.95 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.63 (dd, *J* = 10.8, 2.1 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.08 – 3.94 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.67 (td, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.01 – 1.89 (m, 2H), 1.81 – 1.66 (m, 1H), 1.57 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 168.45, 165.12, 152.66, 151.24, 149.17, 145.84, 141.33, 138.95, 137.73, 132.93, 128.26, 123.35, 122.03, 121.63, 117.52, 112.20, 80.88, 67.71, 56.07, 42.42, 30.04, 24.57, 22.53, 20.45.

3.3.18 Příprava *E*-4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu (látka 18)



Obrázek 24 Reakční schéma přípravy *E*-4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu

Do varné baňky bylo předloženo 110 mg (1 eq) *E*-4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 3-(4-acetoxy-3-methoxyfenyl)akrylátu. Dále bylo přidáno 4,04 ml dioxanu a takto připravená reakční směs byla chlazená externě studenou vodou o teplotě $\approx 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakční směs byla inertizována dusíkem a za stálého míchání a chlazení bylo přikapáno 808 μl 4M kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Dále bylo postupováno analogicky jako v kapitole 3.3.14 (pouze v případě ponechání ke krystalizaci v acetonu bylo použito 8 ml acetonu). Bílé krystaly získané filtrací byly ponechány k sušení při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po dobu 8 hodin.

Látka **18** ($\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$; $M_r = 459,45$) byla získána jako bílá pevná látka. Výtěžek reakce odpovídal 93 %. Bod tání látky **18** byl stanoven na $225\text{--}228\text{ }^{\circ}\text{C}$ (při $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ změna barvy vzorku na žlutou). HPLC-MS: čistota = 99+ %; $R_T = 20,97\text{ min}$; ESI⁺ [M+H]⁺ 460,16 (100 %); 461,17 (26,7 %); 462,17 (4,9 %).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.22 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 15.9\text{ Hz}$, 1H), 7.62 (d, $J = 1.9\text{ Hz}$, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.38 (dd, $J = 8.2, 1.9\text{ Hz}$, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 7.16 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1H), 6.96 (d, $J = 16.,1\text{ Hz}$, 1H), 4.89 (d, $J = 6.1\text{ Hz}$, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168.46, 165.08, 151.25, 149.76, 145.97, 141.36, 135.23, 132.91, 128.77, 123.37, 122.06, 122.01, 117.45, 112.22, 56.09, 43.51, 20.46.

3.4 Biologické testování

Připravené látky (viz níže) byly testovány na jejich cytotoxicitu, fototoxicitu a schopnost chránit buňky před UVA zářením. Všechny experimenty zmíněné v podkapitolách spadající pod kapitolu 3.4 (podkapitoly 3.4.1 až 3.4.8) byly provedeny na Ústavu lékařské chemie a biochemie doc. Ing. Alenou Rajnochovou Svobodovou, Ph.D. a doc. RNDr. Jitkou Vostálovou, Ph.D.

3.4.1 Buněčné linie

Normální lidské kožní fibroblasty (NHDF) byly izolovány z fragmentů kůže od zdravých dospělých dárců, které podstoupily chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc. Odběr tkáně a izolace buněk proběhla podle postupu a podmínek schválených Etickou komisí FN Olomouc a Lékařské fakulty UP Olomouc (ze dne: 6. 4. 2009, čj. 41/09). Všechny dárcyně podepsaly informovaný souhlas s odběrem tkáně. Kožní tkáň byla odebrána a transportována ve fosfátovém pufru (PBS, pH 7,4) s antibiotiky (penicilin 500 mg/ml, streptomycin 500 U/ml, amphotericin B 1,25 mg/ml). Poté byla tkáň třikrát promyta PBS a nastříhána na kousky (asi 1 cm²), vložena na Petriho misky a kultivována ve směsi médií (DMEM a Ham F12, 1:3) obohacené o fetální hovězí sérum (FBS, 10 %), penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml), amphotericin B (0,125 mg/ml), hydrokortison (0,8 µg/ml), adenin (24 µg/ml), insulin (0,12 U/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml) 3,3',5-trijod-L-tyronin (0,136 µg/ml). Tkáň byly inkubovány při 37 °C v inkubátoru syceném vodními parami v řízené atmosféře CO₂ (5 %). Médium bylo měněno dvakrát týdně, než fibroblasty dosáhly monovrstvy (2-3 týdny). Poté byly buňky opláchnuty PBS, uvolněny inkubací s roztokem trypsinu s EDTA a přeneseny do 75cm² kultivační láhve. Fibroblasty byly kultivovány v růstovém médiu (DMEM s FBS (10 %), penicilinem (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml)). Pro experimenty byly buňky použity mezi 2. a 4. pasáží. Buňky byly vysety na 96jamkové desky v koncentraci 0,8·10⁵ buněk/ml kultivačního média v množství 0,2 ml na jamku.

3.4.2 Chemikálie

Všechny níže zmíněné chemikálie použité při testování toxicity, fototoxicity a UVA protekce testovaných látek byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich. Bylo použito: 3,3',5-trijod-L-tyronin, adenin, amphotericin B, dihydrogenfosforečnan draselný, DMSO, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Dulbecco's Modified Eagles médium (DMEM), epidermální růstový faktor, fetální hovězí sérum, formaldehyd, Ham's F12 Nutrient Mixture, hydrokortison, chlorid draselný, chlorid sodný, chlorid vápenatý, chlorpromazin, insulin, kyselina octová, methanol, neutrální červeň, Nutrient Mixture F-12 Ham, penicilin, streptomycin, trypsin-EDTA (0,25% roztok).

3.4.3 Přístroje

- inkubátor Forma Direct Heat (Thermo Fisher Scientific Inc.),
- laminární box Jouan MSC 9 Standard (Jouan),
- mikroskop Olympus CK2 (Olympus Corporation),
- odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson),
- solární simulátor SOL 500 (Dr. Hönle Technology),
- spektrofotometr Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd.),
- UVA metr (Dr. Hönle Technology).

3.4.4 Příprava vzorků

Pro biologické testování byly použity látky **7** (acetyl-FA), **12** (*p*T-THP), **17** (acetyl-FA-*p*T-THP) a **18** (acetyl-FA-*p*T) spolu s kyselinou ferulovou a *para*-topolinem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny v DMSO v koncentračním rozmezí 0,78-100,0 mmol/l. Zásobní roztoky byly poté ředěny do média bez séra (DMEM s penicilinem (100 mg/ml) a streptomycinem (100 U/ml)) tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,1 % (v/v). Kontrolní médium obsahovalo příslušný objem DMSO v médiu bez séra.

3.4.5 Toxicita látek

Buňky byly vysety na 96jamkové desky a po 24h inkubaci bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky v koncentračním rozmezí 0,78-100 μ mol/l a DMSO (0,1%, v/v; negativní kontrola). Po 24 h inkubaci (37 °C,

5 % CO₂) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace neutrální červeně (NČ) do buněk. Z naměřených hodnot absorbance byla pro jednotlivé koncentrace testovaných látek vypočtena % kontroly.

3.4.6 Fototoxicita látek

Možné fototoxické účinky látek byly zjišťovány podle modifikovaného *in vitro* testu validovaného pro stanovení fototoxicity látek (Spielmann et al., 1998). Buňky byly vysety na 96jamkové desky a po 24h inkubaci bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky v koncentračním rozmezí 0,78-100 μmol/l a DMSO (0,1%, v/v; negativní kontrola). Jako pozitivní kontrola byl použit chlorpromazin (CPZ), známá fototoxická látka (0,78-100 μmol/l). Roztoky testovaných látek a CPZ (včetně DMSO) byly paralelně aplikovány na dvě 96jamkové desky s NHDF. Po 1h preinkubaci bylo médium odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a poté bylo aplikováno PBS s glukosou (1 mg/ml). Následně byla jedna deska ozářena netoxickou dávkou (5 J/cm²) UVA záření. Druhá deska byla po dobu ozařování inkubována v temnu. K ozáření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H1 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320-400 nm. Intenzita UVA záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA-metru. Po UVA expozici bylo PBS s glukosou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno bezsérové médium. Po 24h inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace NČ do buněk.

3.4.7 UVA-fotoprotekce látek

Buňky byly vysety na 96jamkové desky a po 24h inkubaci bylo růstové médium vyměněno za médium bez séra obsahující testované látky v koncentračním rozmezí (0,78-100 μmol/l) a DMSO (0,1 %, v/v; negativní kontrola). Po 1h preinkubaci bylo médium odstraněno, buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a poté bylo aplikováno PBS s glukosou (1 mg/ml). Následně byly buňky ozářeny cytotoxickou dávkou (7,5 J/cm² pro NHDF) UVA záření. Kontrolní buňky byly po dobu ozařování inkubovány v temnu. K ozáření byl použit solární simulátor SOL 500 vybavený H1 filtrem, který propouští záření v rozsahu vlnových délek 320-400 nm. Intenzita UVA záření byla při každém ozařování stanovena pomocí UVA-metru. Po UVA expozici bylo PBS s glukosou odstraněno a k buňkám bylo aplikováno médium bez

séra. Po 24h inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) bylo sledováno buněčné poškození stanovením inkorporace NČ do buněk. Z naměřených hodnot absorbance byla pro jednotlivé koncentrace testovaných látek vypočtena % protekce.

3.4.8 Inkorporace neutrální červeně (NČ)

Živé (nepoškozené) buňky přijímají a ukládají NČ do lysozomů. Koncentrace zadrženého barviva je měřena po rozpuštění v organickém rozpouštědle spektrofotometricky při 540 nm (Maines et al., 1998). Buňky byly opláchnuty sterilním PBS a následně bylo aplikováno 50 µl roztoku NČ (0,03 %; PBS). Po 1h inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) byl roztok s NČ odsát, buňky byly fixovány směsí formaldehydu (0,5 %, v/v) a chloridu vápenatého (1 %, m/v) v poměru 1:1 a lyzovány extrakčním roztokem (methanol (50 %, v/v), kyselina octová (1 %, v/v)). Po 5 minutách intenzivního třepání byla změřena absorbance při 540 nm.

4 Výsledky

4.1 Přehled úspěšnosti syntéz

U látek **3**, **4**, **5**, **6**, **8**, **10**, **14**, **15** a **16**, jejichž příprava nebyla zhodnocena jako perspektivní, např. z důvodu nízké konverze, ztížené deprotektce výsledného konjugátu od toxických protektivních skupin či nemožnosti deprotektovat chránicí skupiny pomocí postupů, které by neohrožovaly esterovou vazbu mezi kyselinou a CK, jsou v Tabulkách 2-6 shrnuty alespoň procentuální zastoupení a retenční časy analytů ve zpracovaných a analyzovaných reakčních směsích. Přestože se tyto látky podařilo detekovat pomocí HPLC-MS analýz, nebyly dále purifikovány a důraz byl kladen na nalezení lépe vyhovujících postupů. Látky **1**, **2** a **9** nebyly ve zpracovaných reakčních směsích detekovány pomocí HPLC-MS ani v jednom z použitých postupů či jejich modifikaci.

Látky **7**, **11**, **12**, **13**, **17** a **18**, které byly úspěšně připraveny, byly v případě potřeby přečištěny sloupcovou chromatografií či preparativní HPLC a byly charakterizovány pomocí výše zmíněných metod.

Tabulka 2 Přehled výsledků analýz HPLC-MS pro experimenty týkající se protektce OH skupin kyseliny rozmarýnové; ND = nedetekováno; RS = reakční směs

LÁTKA	M _r	HPLC-MS ZPRAC. RS		VÝTĚŽEK [%]
		[min]	[%]	
1 (acetonid-RA)	440,44	ND ^a		-
2 (benzylether-RA)	720,80	ND ^a		-
3 (MOM-RA)	536,56	21,72	14,2	8*
6 (acetyl-RA)	528,46	18,00	88,3	27*
9 (TBDMS-RA)	817,36	ND ^a		-

* U reakcí, kde nebyla reakční směs po zpracování dále purifikována sloupcovou chromatografií, popř. pomocí preparativní HPLC do získání čistého produktu, je hodnota výtěžku reakce vypočtena jako procentuální zastoupení produktu (HPLC-MS čistota reakční směsi po jejím zpracování) násobena váhou analyzovaného odparku. Tato hodnota je následně podělena vypočteným teoretickým výtěžkem. Jedná se tedy o očekávaný výtěžek po případném přečištění daného odparku a tato teoretická hodnota nezahrnuje ztráty, které by purifikace přinesla.

^a Produkt o dané molekulové hmotnosti nedetekován ani v jednom z uvedených reakčních postupů a jejich modifikacích (viz kapitola Syntéza).

Tabulka 3 Přehled výsledků analýz HPLC-MS pro experimenty týkající se protekce OH skupin kyseliny ferulové;
ND = nedetekováno; RS = reakční směs

LÁTKA	M _r	HPLC-MS ZPRAC. RS		VÝTĚŽEK [%]
		[min]	[%]	
4 (MOM-FA)	238,24	16,79	29,7	22*
7 (acetyl-FA)	236,22	15,92	93,9 ^a	77
			99,2 ^b	88
10 (TBDMS-FA)	308,44	27,93	ND ^c	-
			27,7 ^d	1*

* U reakcí, kde nebyla reakční směs po zpracování dále purifikována sloupcovou chromatografií, popř. pomocí preparativní HPLC do získání čistého produktu, je hodnota výtěžku reakce vypočtena jako procentuální zastoupení produktu (HPLC-MS čistota reakční směsi po jejím zpracování) násobena váhou analyzovaného odparku. Tato hodnota je následně podělena vypočteným teoretickým výtěžkem. Jedná se tedy o očekávaný výtěžek po případném přečištění daného odparku a tato teoretická hodnota nezahrnuje ztráty, které by purifikace přinesla.

^a postup I (zpracování pouze výtřepem; viz kapitola Syntéza); ^b postup II (zpracování krystalizací s diethyletherem; viz kapitola Syntéza); ^c postup I (imidazol; viz kapitola Syntéza); ^d postup II (DMAP; viz kapitola Syntéza)

Tabulka 4 Přehled výsledků analýz HPLC-MS pro experimenty týkající se protekce OH skupin kyseliny *m*-kumarové; RS = reakční směs

LÁTKA	M _r	HPLC-MS ZPRAC. RS		VÝTĚŽEK [%]
		[min]	[%]	
5 (MOM- <i>m</i> CA)	208,21	17,24	48,2	25*
8 (acetyl- <i>m</i> CA)	206,19	13,69	87,4 ^a	75*
			83,2 ^b	58*
			17,9 ^c	7*
11 (TBDMS- <i>m</i> CA)	278,42	27,36	83,1 ^d	68
			64,4 ^d	63

* U reakcí, kde nebyla reakční směs po zpracování dále purifikována sloupcovou chromatografií, popř. pomocí preparativní HPLC do získání čistého produktu, je hodnota výtěžku reakce vypočtena jako procentuální zastoupení produktu (HPLC-MS čistota reakční směsi po jejím zpracování) násobena váhou analyzovaného odparku. Tato hodnota je následně podělena vypočteným teoretickým výtěžkem. Jedná se tedy o očekávaný výtěžek po případném přečištění daného odparku a tato teoretická hodnota nezahrnuje ztráty, které by purifikace přinesla.

^a postup I (zpracování pouze výtřepem; viz kapitola Syntéza); ^b postup II (zpracování krystalizací s diethyletherem; viz kapitola Syntéza); ^c postup I (imidazol; viz kapitola Syntéza); ^d postup II (DMAP; viz kapitola Syntéza), následně přečištění sloupcovou chromatografií

Tabulka 5 Přehled výsledků analýz HPLC-MS pro syntézu *pT-THP*; RS = reakční směs

LÁTKA	M _r	HPLC-MS ZPRAC. RS		VÝTĚŽEK [%]
		[min]	[%]	
12 (<i>pT-THP</i>)	325,37	11,51	96,6	84

Tabulka 6 Přehled výsledků analýz HPLC-MS pro syntézu konjugátů HCA a *para-topolinu*; RS = reakční směs

LÁTKA	M _r	HPLC-MS ZPRAC. RS		VÝTĚŽEK [%]
		[min]	[%]	
13 (TBDMS- <i>mCA-pT-THP</i>)	585,77	31,36	67,8	57
14 (TBDMS- <i>mCA-pT</i>)	501,65	29,30	94,1	92*
15 (<i>mCA-pT-THP</i>)	471,51	22,80	67,8	52*
16 (<i>mCA-pT</i>)	387,39	19,77	20,7	11*
17 (acetyl-FA- <i>pT-THP</i>)	543,57	24,61	49,6	33
			40,3	27
18 (acetyl-FA- <i>pT</i>)	459,45	20,97	99,9	93

* U reakcí, kde nebyla reakční směs po zpracování dále purifikována sloupcovou chromatografií, popř. pomocí preparativní HPLC do získání čistého produktu, je hodnota výtěžku reakce vypočtena jako procentuální zastoupení produktu (HPLC-MS čistota reakční směsi po jejím zpracování) násobena vahou analyzovaného odparku. Tato hodnota je následně podělena vypočteným teoretickým výtěžkem. Jedná se tedy o očekávaný výtěžek po případném přečištění daného odparku a tato teoretická hodnota nezahrnuje ztráty, které by purifikace přinesla.

Acetylovaná kyselina ferulová (látka **7**), *para-topolin* chráněný v pozici *N9*- pomocí THP (látka **12**), jejich konjugát (látka **17**) a konjugát deprotektovaný od THP (látka **18**) byly podrobeny biologickému testování na Ústavu lékařské chemie a biochemie doc. Ing. Alenou Rajnochovou Svobodovou, Ph.D. a doc. RNDr. Jitkou Vostálovou, Ph.D.

4.2 Biologické testování

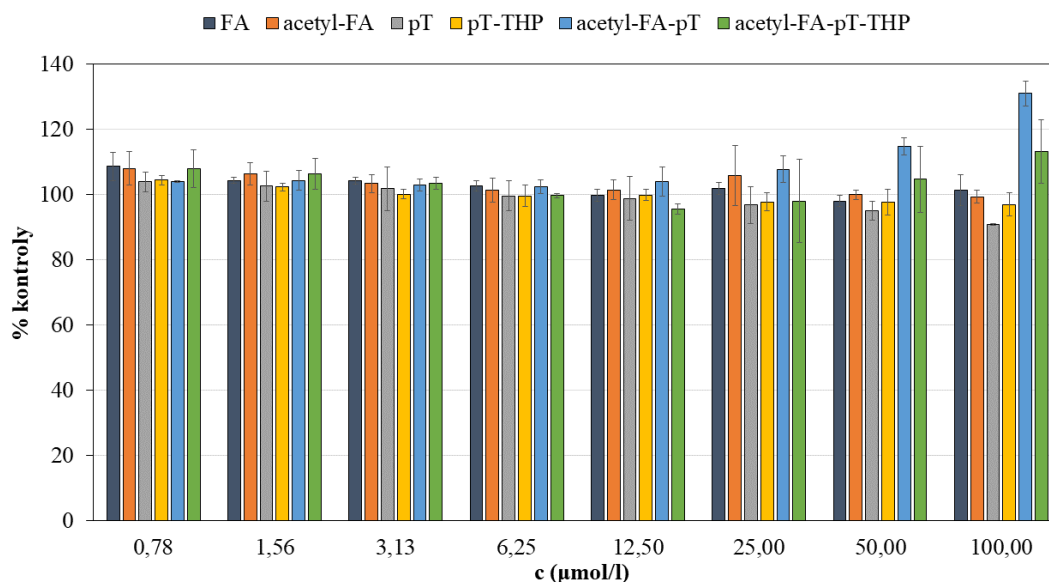
Cytotoxicita látek byla vypočítána ze získaných experimentálních dat (absorbancí) podle následujícího vztahu:

$$\% \text{ kontroly} = \frac{A_V}{A_K} \cdot 100$$

kde A_V = absorbance vzorku (buňky inkubované s médiem bez séra s testovanými látkami) po odečtení absorbance pozadí (extrakční roztok); A_K = absorbance kontroly (buňky inkubované v médiu bez séra s DMSO) po odečtení absorbance pozadí (extrakční roztok)

K hodnocení možného cytotoxického působení látek (Obrázek 25) byla použita standardní metoda inkorporace NČ do buněk. Mikroskopické hodnocení účinků látek na NHDF neprokázalo morfologické změny buněk, nicméně byla pozorována tvorba krystalů u látek **17** (acetyl-FA-*p*T-THP) a **18** (acetyl-FA-*p*T) v koncentracích 25-100 $\mu\text{mol/l}$, což značí, že tyto látky jsou špatně rozpustné v kulturačním médiu.

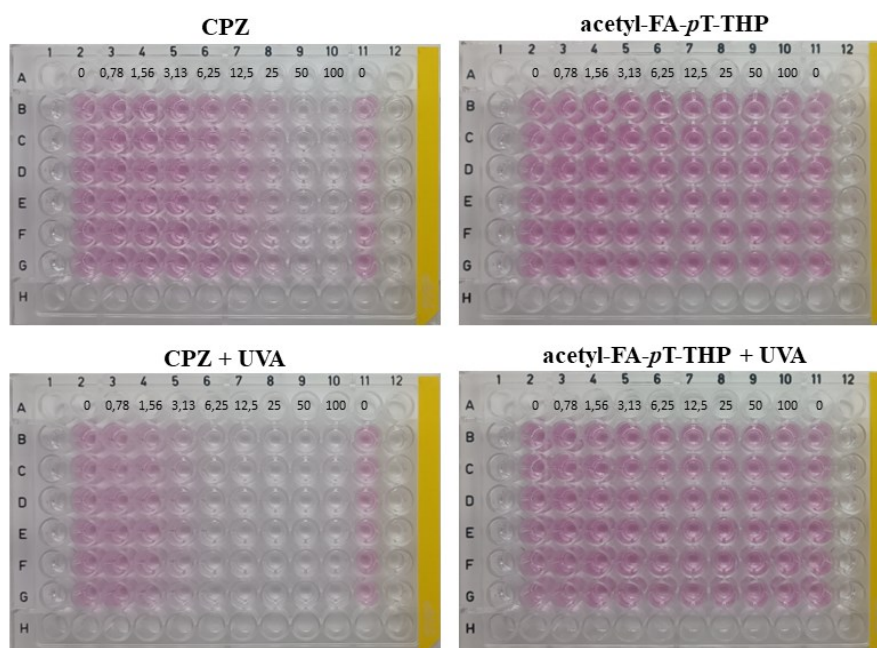
Výsledky inkorporace NČ ukázaly, že po 24h inkubaci látky v použitém koncentračním rozmezí 0,78-100 $\mu\text{mol/l}$ významně nesnižovaly viabilitu buněk kromě *para*-topolinu, který vyvolal snížení viability asi o 10 %. Nárůst viability (% kontroly) u látek **17** a **18** (50 a/nebo 100 $\mu\text{mol/l}$) je pravděpodobně způsoben adsorpcí krystalů testovaných látek na buňky při 24h inkubaci. Vznik krystalů byl pozorován mikroskopicky v koncentracích 25-100 $\mu\text{mol/l}$. Pro budoucí využití syntetizovaných konjugátů pro biologické testování by tedy bylo vhodné provést studium rozpustnosti připravených látek a také zvážit případné modifikace těchto molekul pro zvýšení jejich rozpustnosti, neboť krystalizace látky z roztoku mohla způsobit zmíněné zkreslení výsledků, které se v získaných datech mohlo projevit nárůstem viability buněk při testování látek **17** a **18**.



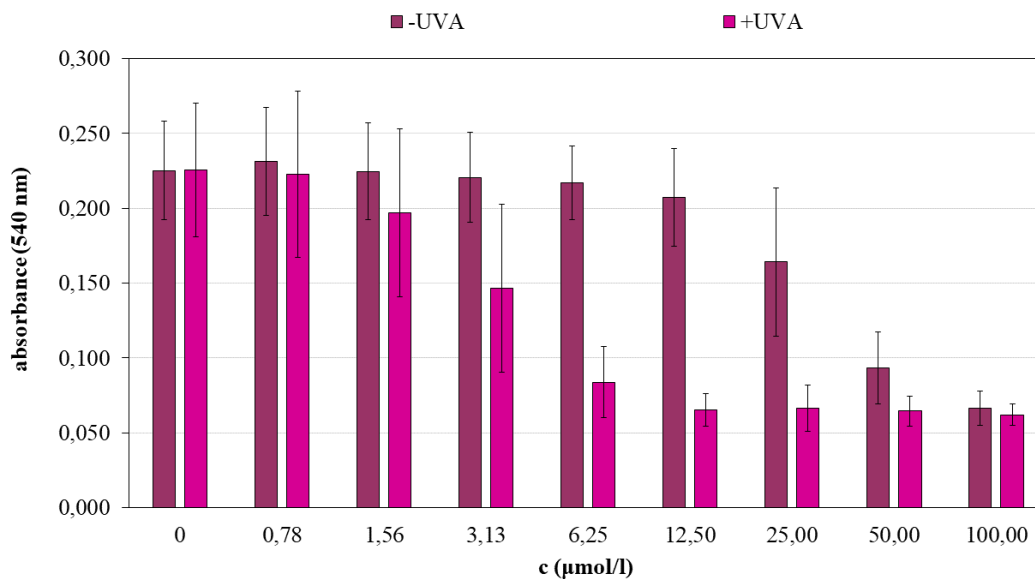
Obrázek 25 Vliv testovaných látek na viabilitu NHDF. Výsledky reprezentují průměr ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů \pm SD.

U buněk preinkubovaných s testovanými látkami v koncentračním rozmezí 0,78-100 $\mu\text{mol/l}$ a ozářenými netoxickou dávkou UVA záření (5 J/cm^2) nedošlo

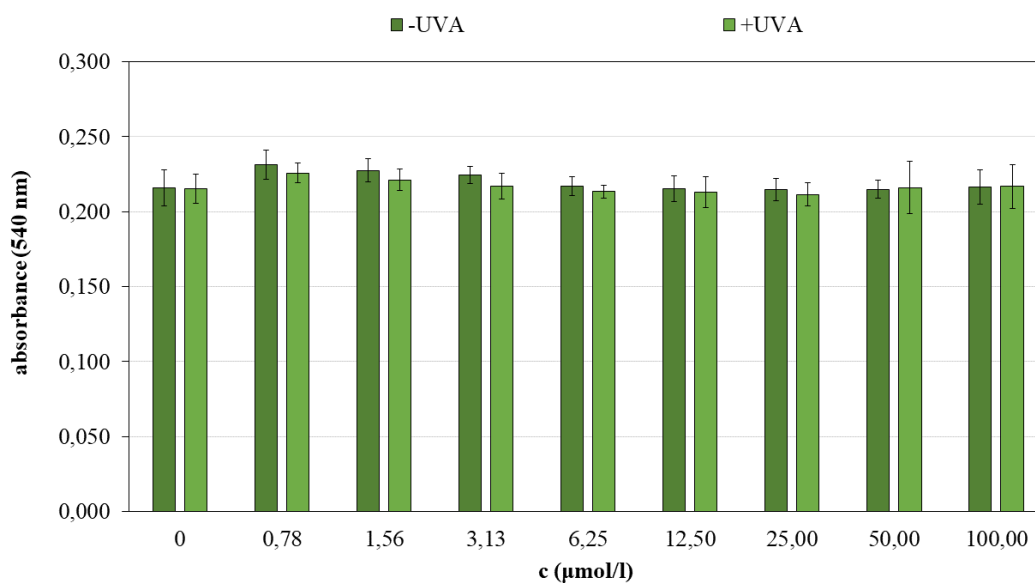
k významnému snížení viability ve srovnání s buňkami, které nebyly ozářeny. Testované látky lze označit za nefototoxické. Nepřítomnost fototoxického působení je znázorněna na příkladu syntetizovaných konjugátů, tj. látek **17** a **18** (Obrázky 28 a 29); ostatní látky působily obdobně (Příloha I). Funkčnost modelu (použité podmínky) byla ověřena paralelním stanovením účinků CPZ (známé fototoxické látky), který prokazatelně jevil fototoxické působení (Obrázek 27). Srovnání působení fototoxické a nefototoxické látky je znázorněno na Obrázku 26.



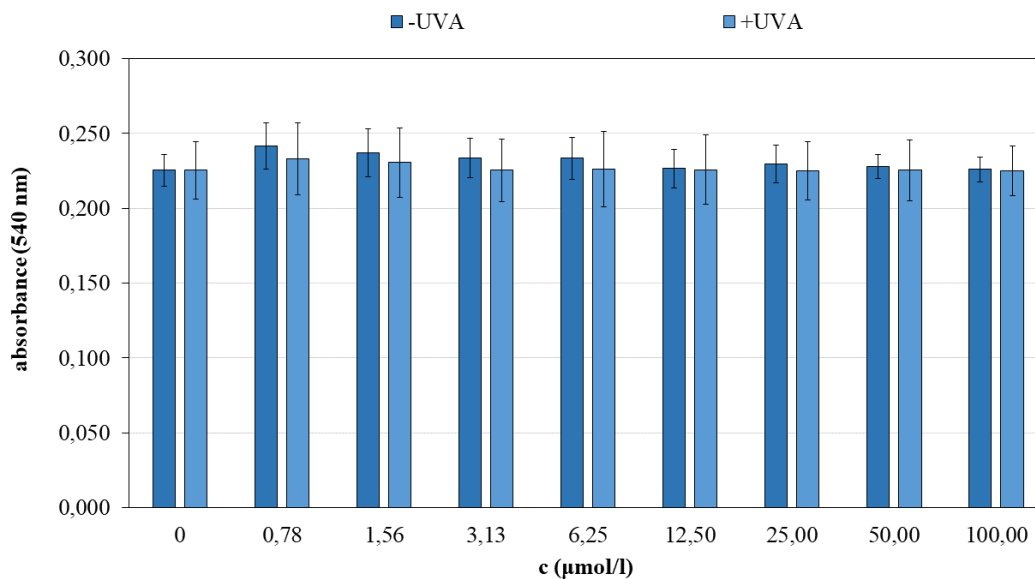
Obrázek 26 Porovnání účinků fototoxické a nefototoxické látky. Fotografie zobrazují reprezentativní výsledky (jednoho ze 3 experimentů) provedených na NHDF. CPZ představuje pozitivní kontrolu. Acetyl-FA-pT-THP reprezentuje jednu z testovaných látek.



Obrázek 27 Stanovení fototoxických účinků CPZ (pozitivní kontrola). Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.



Obrázek 28 Stanovení fototoxických účinků acetyl-FA-pT-THP. Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.



Obrázek 29 Stanovení fototoxických účinků acetyl-FA-pT. Výsledky reprezentují průměr ± SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.

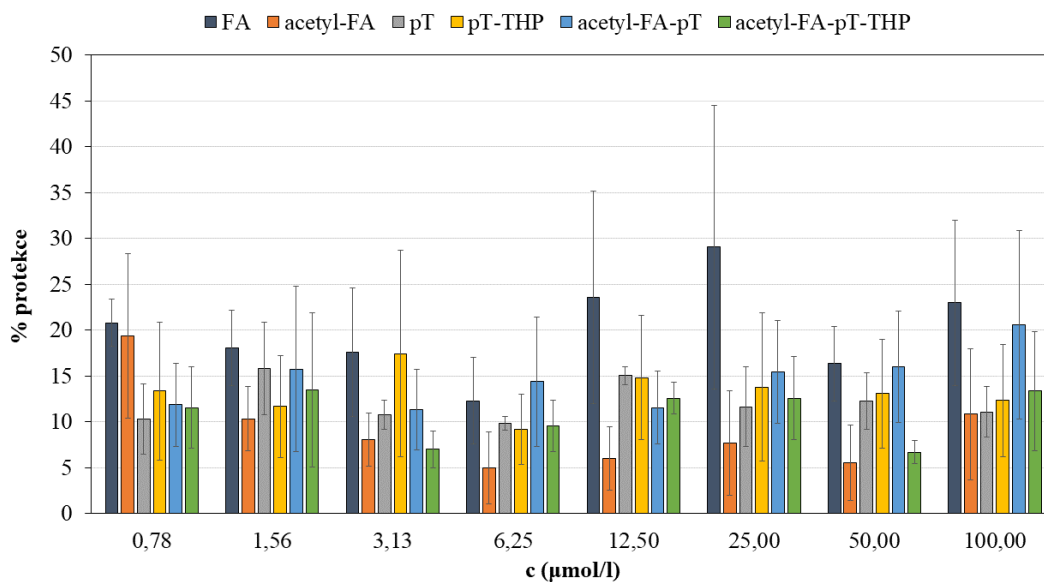
Ochranný účinek látek na poškození vyvolané UVA zářením byl vyhodnocen porovnáním experimentálních dat (absorbancí) testovaných látek s pozitivní kontrolou (ozářené buňky preinkubované s DMSO) a negativní kontrolou (neozářené buňky preinkubované s DMSO). Protekce látek byla vypočítána z experimentálních dat podle následujícího vztahu:

$$\% \text{ protekce} = \left(1 - \frac{(A_V - A_K)}{(A_{UVA} - A_K)} \right) \cdot 100$$

kde A_V = absorbance vzorku (buňky preinkubované s testovanými látkami a vystavené UVA záření) po odečtení absorbance pozadí (extrakční roztok); A_K = absorbance negativní kontroly (buňky preinkubované s DMSO bez vystavení UVA záření) po odečtení absorbance pozadí (extrakční roztok); A_{UVA} = absorbance pozitivní kontroly (buňky preinkubované s DMSO a vystavené UVA záření) po odečtení absorbance pozadí (extrakční roztok)

Testované látky byly schopny mírně potlačovat pokles viability vyvolaný UVA zářením (Obrázek 30). Největší protektivní efekt byl obecně pozorován u kyseliny ferulové a její acetylaci nebylo dosaženo vyšší ochrany buněk před UVA zářením oproti původní molekule, zmíněnou modifikací kyseliny ferulové se tedy pravděpodobně nepovedlo připravit účinnější látku. Ani u ostatních testovaných látek (*para*-topolinu chráněného v *N9*-pozici pomocí THP a připravených konjugátů) nebylo prokázáno vyšší % protekce než u samotné kyseliny ferulové. Při práci

s primárními fibroblasty je však nutné zmínit také vysokou interindividuální variabilitu v citlivosti buněk na UVA záření a díky tomu by bylo vhodné tento pilotní experiment opakovat na NHDF získaných od většího počtu pacientů. V úvahu je nutné také brát horší rozpustnost připravených konjugátů – velkou roli hraje také jejich biodostupnost.



Obrázek 30 Vliv testovaných látek na viabilitu NHDF. Výsledky reprezentují průměr ze 3 experimentů \pm SE provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů. Pozitivní a negativní kontrola jsou zahrnuty ve výpočtu hodnot prezentovaných v grafu dle vzorce pro výpočet % protekce uvedeného výše.

5 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo připravit konjugáty fenolických látek a CK. Z řad fenolických látek byly pro syntézu konjugátů zvoleny vybrané HCA, které vykazují zajímavé bioaktivní účinky, zejména pak mají vysoký antioxidační potenciál (Razzaghi-Asl et al., 2013). Jako zástupce CK byl zvolen *para*-topolin, u kterého byl prokázán pozitivní vliv prodloužení životaschopnosti modelového organismu *Caenorhabditis elegans* (Kadlecová et al., 2018). Důvodem, proč byl zvolen právě *para*-topolin, je zejména jeho antioxidační aktivita (Brizzolari et al., 2016), ale také pozitivní výsledky klinické studie zabývající se aplikací *para*-topolinu na pokožku (Garcia et al., 2018). Výslednými produkty navržených reakcí jsou tedy estery použitých kyselin a *para*-topolinu, které by své potenciální využití mohly najít např. v kosmetických přípravcích či dermatologii.

Prvním krokem byla protekce volných hydroxylových skupin v molekulách HCA. Pro prvotní experimenty byla vždy volena pouze kyselina rozmarýnová, neboť ta byla díky své unikátní antioxidační schopnosti původní molekulou zájmu a jedná se o přirozeně se vyskytující UV protektivní látku. Chemická struktura, která jí dává tyto vlastnosti, však byla pravděpodobně příčinou neúspěchu v chránících postupech. Je pravděpodobné, že díky bezprostřední blízkosti hydroxylových skupin určených k protekci a velikosti některých použitých protektivních skupin nemohlo dojít k adekvátnímu ochránění původní molekuly.

Jako první přístup byla zvolena protekce obou vedle sebe ležících hydroxylových skupin pomocí jejich převedení na acetonidovou funkční skupinu. Experiment byl veden nejprve s využitím Soxhletova extraktoru s patronou naplněnou molekulovým sítem pro odvod vody vznikající při reakci. Vzhledem k časové náročnosti experimentu byl tento postup modifikován použitím vyššího množství katalytické kyseliny *p*-toluensulfonové tak, aby mohla reakce proběhnout za laboratorní teploty do druhého dne. V obou aplikovaných postupech se však podařilo pouze parciálně protekovat molekulu kyseliny rozmarýnové. Produkt odpovídající molekulové hmotnosti zcela ochráněné kyselině rozmarýnové však detekován nebyl. Alternativním reakčním postupem byla zvolena benzylace, kdy byl jako protektivní činidlo zvolen benzylbromid. Reakce byla provedena ve třech opakováních s dvěma modifikacemi oproti uvedeným reakčním podmínkám. V prvním případě byl benzylbromid přidán po 1 hodině jako v původním postupu

reakce, reakční směs ale byla externě chlazena ledovou tříští již od začátku po rozpuštění kyseliny rozmarýnové. V případě druhé modifikace byl benzylbromid po kapkách přidán ihned na začátku reakce (nikoliv až po 1 hodině) za externího chlazení a následně bylo pokračováno dle výše uvedeného postupu. Ani jeden z postupů však nevedl k detekci produktu ve směsi získaných produktů.

Z důvodu neúspěšných postupů pro protekci hydroxylových skupin kyseliny rozmarýnové byly pro následující experimenty využity také kyseliny *meta*-kumarová a ferulová, které byly zvoleny jako nové molekuly zájmu pro případ, že by kyselinu rozmarýnovou nešlo vhodně chránit pro další syntézu. Jako první protektivní činidlo byl použit methoxymethyl chlorid. Přestože se ve zpracované organické fázi podařilo produkty o dané molekulové hmotnosti při HPLC-MS analýze detekovat, tvořily pouze velmi malou část analyzované zpracované reakční směsi. Dalším reakčním postupem byla acetylace, která dle HPLC-MS analýzy zpracované organické fáze sice vedla k zisku produktů o dané molekulové hmotnosti, původně však nebyla postupem první volby díky poměrně stabilní vazbě acetylové protektivní skupiny na fenolickou hydroxylovou skupinu.

Žádný z výše uvedených postupů protekce nevedl k získání daného produktu či neposkytoval dostatečný výtěžek produktu nebo se jednalo o postup, kdy by následná deprotekce probíhala za nepříliš vhodných podmínek, a byla by tedy ohrožena také esterová vazba mezi molekulou kyseliny a CK. Z toho důvodu bylo přistoupeno k využití různých silylačních činidel, pro které existují selektivní deprotektivní postupy při mírných podmínkách. Protektivním činidlem první volby byl *tert*-butyldimethylsilyl chlorid, který však nejprve neposkytoval uspokojivé výsledky ani u jedné z kyselin určených k protekci. Při změně reakčního postupu a použití katalytického množství DMAP místo imidazolu však došlo k úspěchu a hydroxylovou skupinu kyseliny *m*-kumarové se podařilo ochránit, v případě kyseliny ferulové a rozmarýnové však daný postup úspěšný nebyl. Pro tyto kyseliny by však mohl být perspektivní postup s využitím trimethylsilyl chránicí skupiny, která je oproti *tert*-butyldimethylsilylu méně objemnou chránicí skupinou – u kyseliny rozmarýnové je totiž třeba ochránit dvě proximální hydroxylové skupiny, u kyseliny ferulové vedle hydroxylové skupiny zase pravděpodobně stericky nevyhovuje přítomnost methoxy skupiny. Velkou nevýhodou je však nízká stabilita TMSCl derivovaných sloučenin,

a tedy jejich velmi ztížená analýza, která je omezena *de facto* pouze na využití NMR pro charakterizaci syntetizovaných látek.

Ochráněná kyselina *m*-kumarová byla dále úspěšně podrobena konjugační reakci s *para*-topolinem chráněným v *N9*-pozici pomocí THP. Pro získání finálního produktu bylo nutné konjugát deprotekovat od chránicích skupin. Původní myšlenkou bylo pokusit se deprotekovat chránicí skupiny jak na kyselině, tak na CK v jednom kroku pomocí kyseliny chlorovodíkové v dioxanu, což ale nebylo úspěšné, a to ani při následném prodloužení reakčního času, kdy opět došlo pouze k deprotekcí THP. Dalším navrhovaným jednokrokovým řešením bylo použití kyseliny chlorovodíkové v ethanolu, kdy ale bohužel dle HPLC-MS analýzy došlo k rozpadu molekuly v místě esterové vazby mezi původními molekulami. Pro deprotekcí konjugátu kyseliny *m*-kumarové a *para*-topolinu byl tedy navržen postup skládající se ze dvou po sobě jdoucích kroků, kdy nejprve je vhodné zařadit deprotekcí *terc*-butyldimethylsilylové funkční skupiny pomocí TBAF, která je následována deprotekcí THP pomocí kyseliny chlorovodíkové v dioxanu.

Díky nepřilíš vysokým výtěžkům a nereprodukovatelnosti reakcí bylo upuštěno od dalších snah o syntézu konjugátů se silylovanými kyselinami. Problémy při syntézách mohou způsobit také nežádoucí reakce na fenolických hydroxylových skupinách kyselin, např. jejich oxidace. Na uvedené výsledky by tedy v rámci dalších prováděných experimentů šlo navázat např. optimalizací silylačních protektivních postupů pro všechny testované kyseliny. Ztížená deprotekcí konjugátu na kyselině *m*-kumarové od toxické *terc*-butyldimethylsilylové funkční skupiny vyústila v návrat ke dříve použitému postupu – acetylaci. Přestože acetylace nejprve nebyla preferovaným postupem, další její výhodou je také to, že acetylová protektivní skupina není na rozdíl od *terc*-butyldimethylsilylové skupiny toxická, a navíc by takto připravený acetylderivát mohl fungovat jako „prodrug“. Tato varianta tedy poskytla možnost otestovat biologickou aktivitu takto připravených konjugátů.

Jako vhodný kandidát pro konjugaci s *para*-topolinem byla díky úspěšnosti reakce a vysokému výtěžku zvolena acetylovaná kyselina ferulová. Druhým pozitivním aspektem bylo její získání v čistotě dostačující pro následnou syntézu (93,9 %) a po modifikaci zpracování a zařazení alternativního postupu při zpracování, tj. krystalizace v diethyletheru namísto výtřepu také ve velmi vysoké čistotě (99,2 %). Acetylovaná kyselina ferulová byla konjugována s *p*-topolinem chráněným

v *N9*-pozici pomocí THP. Přestože výtěžek konjugační reakce ve dvou opakováních odpovídal pouze 33 a 27 %, přečištěním chromatografickými metodami byl získán velmi čistý produkt (99+ %). Díky vysoké čistotě konjugátu, který byl následně deprotekován od THP, pak deprotektce vedla k získání velmi čisté látky (99+ %) a výtěžek reakce odpovídal 93 %. Stěžejní z hlediska budoucích experimentů bude optimalizovat konjugační reakci tak, aby poskytovala vyšší výtěžky. Dalším cílem bude také hledání postupu pro deprotektaci acetylové skupiny chránící fenolickou hydroxylovou skupinu kyseliny.

Připravené konjugáty acetylované kyseliny ferulové a *para*-topolinu byly testovány na cytotoxicitu, fototoxicitu a UVA protektci. Bylo prokázáno, že nově připravené látky (**7**, **12**, **17** a **18**) nevykazují cytotoxické účinky v použitém koncentračním rozmezí (0,78-100 $\mu\text{mol/l}$) při inkubaci po dobu 24 hodin. Testované látky také nevykazují fototoxické účinky. U zmíněných látek byla také testována jejich schopnost chránit buňky před UVA zářením. V provedeném pilotním experimentu bylo zjištěno, že všechny testované látky vykazují mírný fotoprotektivní efekt. Žádná z látek však nevykazuje vyšší schopnost protekce proti UVA záření než samotná kyselina ferulová, u níž byla prokázána schopnost chránit před UVA zářením lidské fibroblasty (Hahn et al., 2016). Při testování na buněčné linii HaCaT byl přídavek kyseliny ferulové také schopen zabránit indukci matrixové metaloproteinázy MMP-1 zprostředkované UVA zářením, která svým negativním vlivem na kolagen přispívá ke stárnutí pokožky (Pluemsamran, Onkoksoong a Panich, 2012). Mimo protekce před UVA zářením bylo také prokázáno, že topická aplikace kyseliny ferulové před vystavením pokožky záření měla statisticky významný efekt na rozvoj kožního erytému indukovaného UVB zářením u testovaných subjektů (Saija et al., 2000). Lze tedy usuzovat, že konjugáty kyseliny ferulové a *para*-topolinu by po vhodných úpravách, např. deprotektaci acetylované hydroxylové skupiny, mohly vykazovat vyšší UVA protektivní efekt. Pro budoucí testování nově připravených látek bude také zcela zásadní provést studium jejich rozpustnosti – u nově připravených konjugátů acetylované kyseliny ferulové s *para*-topolinem (jak chráněným THP skupinou v *N9*-pozici, tak deprotekováným) byl při testování jejich toxicity pozorován mikroskopický růst krystalů v koncentracích 25-100 $\mu\text{mol/l}$, který pravděpodobně vedl ke zkreslení získaných dat, což se projevilo jako nárůst absorbance a tedy i nárůst výsledné prezentované hodnoty, tj. % kontroly. V případě testování fototoxicity a schopnosti protekce před UVA zářením byly buňky preinkubovány s látkami pouze po dobu

1 hodiny (v případě testování toxicity inkubace probíhala 24 hodin), z tohoto důvodu pravděpodobně nedošlo k tak výrazné krystalizaci látek z použitého média, a tudíž také ke stejnému zkreslení získaných dat.

Lze tedy říci, že přestože se podařilo připravit látky netoxické a nefototoxické, nebyla však zjištěná vysoká míra protekce proti UVA záření oproti původní molekule kyseliny ferulové. V získaných datech je také potřeba vzít do úvahy jejich vysokou variabilitu, což lze přisuzovat různé citlivosti primárních fibroblastů na UVA záření.

6 Závěr

Předložená diplomová práce pojednává ve své teoretické části o fenolických látkách, resp. jejich podskupině, hydroxyskořicových kyselinách. Shrnuje základní informace o těchto bioaktivních molekulách a důraz je kladen zejména na jejich pozitivní účinek na lidský organismus. Druhý tematický celek je věnován cytokininům. V teoretické části jsou zahrnuty také kapitoly o derivátech jak HCA, tak CK.

Praktická část se věnuje reakcím vedoucím k protekci hydroxylových skupin v molekulách HCA a jejich následné konjugaci s *para*-topolinem. Jako nejvhodnější postup pro ochránění hydroxylů HCA se jeví acetylace, ostatní testované postupy však mohou být v rámci dalších experimentů optimalizovány a mohou se též stát perspektivními přístupy. V rámci práce byly připraveny dva konjugáty acetylované kyseliny ferulové s *para*-topolinem-THP a *para*-topolinem, které byly spolu s molekulami, z kterých vychází, podrobeny testům cytotoxicity, fototoxicity a UVA protekce.

Testované látky nevykazují na použitém *in vitro* modelu toxické účinky při inkubaci po dobu 24 hodin. Testované látky také nevykazují fototoxické působení. Toto jsou základní parametry naznačující jejich bezpečnost při dermálním použití. Pilotní testování fotoprotektivních účinků látek v širokém koncentračním rozmezí ukázalo mírný ochranný efekt vůči UVA záření, ale díky vysoké interindividuální variabilitě v citlivosti primárních fibroblastů na UVA záření je však nutné experiment opakovat pro potvrzení.

Připravené konjugáty, tj. látky **17** a **18** se jeví jako hůře rozpustné a v budoucích experimentech by bylo vhodné ověřit jejich biodostupnost, případně zvážit modifikaci ke zvýšení jejich rozpustnosti. Na uvedené výsledky je také možno navázat použitím jiných buněčných linií pro vyloučení toxicity také v dalších *in vitro* modelech.

7 Seznam použité literatury.

Ambothi, K., Prasad, N. R., Balupillai, A. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **82**, 72-78.

Amoah, S. K. S., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., Biavatti, M. W. Rosmarinic Acid-Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Medica*. 2016, **82**(5), 388-406.

Anankanbil, S., Pérez, B., Fernandes, I., Widzisz, K. M., Wang, Z., Mateus, N., Guo, Z. A new group of synthetic phenolic-containing amphiphilic molecules for multipurpose applications: Physico-chemical characterization and cell-toxicity study. *Scientific Reports*. 2018, **8**, 832.

Augustyniak, A. M., Rotsztein, H., Bartnicka, E., Budzisz, E. Effects of reactive oxygen species on skin photoaging. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2016, **103**, 233-239.

Balupillai, A., Prasad, R. N., Ramasamy, K., Muthusamy, G., Shanmugham, M., Govindasamy, K., Gunaseelan, S. Caffeic Acid Inhibits UVB-induced Inflammation and Photocarcinogenesis Through Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in Mouse Skin. *Photochemistry and Photobiology*. 2015, **91**(6), 1458-1468.

Brizzolari, A., Marinello, C., Carini, M., Santaniello, E., Biondi, P. A. Evaluation of the antioxidant activity and capacity of some natural *N*6-substituted adenine derivatives (cytokinins) by fluorimetric and spectrophotometric assays. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016, **1019**, 164-168.

Călinoiu, L. F., Vodnar, D. C. Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients*. 2018, **10**(11), 1615.

Caplin S. M., Steward F. C. Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. *Science*. 1948, **108**(2815), 655-657.

Casanova, F., Santos, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application—a review. *Journal of Microencapsulation*. 2016, **33**(1), 1-17.

Centini, M., Sole Rossato, M., Segal, A., Buonocore, A., Stefanoni, S., Anselmi, C. New Multifunctional Surfactants from Natural Phenolic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(1), 74-80.

Coman, V., Vodnar, D. C. Hydroxycinnamic acids and human health: recent advances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020, **100**(2), 483-499.

Davies, P. J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Function. In: *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Revised 3rd edition. Dordrecht: Springer, 2010, 1-15. ISBN 978-1-4020-2686-7.

Doležal, K., Strnad, M. Cytokininy – regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa*. 2017, **4**, 149-152.

El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., Verpoorte, R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(44), 10877-10895.

Frébortová, J., Frébort, I. Biochemical and Structural Aspects of Cytokinin Biosynthesis and Degradation in Bacteria. *Microorganisms*. 2021, **9**(6), 1314.

Gandhi, B., Juliya, J., Dileep, V., Rajeswari, B. U., Misra, S., Kaki, S. S. Antioxidant and Biological Activities of Novel Structured Monoacylglycerol Derivatives with Phenolic Acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2021, **123**(9), 2100055.

Garcia, R. L., McCullough, J. L., Reece, B., Massino, F. J. Novel Topical Cytokinin Improves Coarse Wrinkles and Skin Roughness Without Skin Irritation. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2018, **17**(7), 772-779.

Göçer, H., Gülçin, I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011, **62**(8), 821-825.

Gunia-Krzyżak, A., Słoczyńska, K., Popiół, J., Koczurkiewicz, P., Marona, H., Pekala, E. Cinnamic acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects. *International Journal of Cosmetic Science*. 2018, **40**(4), 356-366.

Gupta, D., Archoo, A., Hussain Naikoo, S., Abdullah, A. T. Rosmarinic Acid: A Naturally Occurring Plant Based Agent Prevents Impaired Mitochondrial Dynamics and Apoptosis in Ultraviolet-B-Irradiated Human Skin Cells. *Photochemistry and Photobiology*. 2022, **98**(4), 925-934.

Haberlandt, G. *Zur physiologie der zellteilung*. Sitzungsber Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Physikalisch-Mathematische Klasse. 1913, 318-345.

Hahn, H. J., Kim, K. B., Bae, S., Choi, B. G., Sungkwan, A. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. *Annals of Dermatology*. 2016, **28**(6), 740-748.

Harborne, J. B., Simmonds, N. W. *Biochemistry of Phenolic Compounds*. London: Academic Press, 1964.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*. 2015, **173**, 501-513.

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

Jones, P., Vogt, T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*. 2001, **213**(2), 164-174.

Kadlecová, A., Jirsa, T., Novák, O., Kammenga, J., Strnad, M., Voller, J. Natural plant hormones cytokinins increase stress resistance and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology*. 2018, **19**(2), 109-120.

Kamínek, M. Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2015, **34**(4), 723-739.

Klos, D., Dušek, M., Samol'ová, E., Zatloukal, M., Nožková, V., Nesnas, N., Plačková, L., Koprna, R., Špišek, Z., Vylíčilová, H., Plíhal, O., Doležal, K., Voller, J., Kadlecová, A., Strnad, M., Plíhalová, L. New Water-Soluble Cytokinin Derivatives and Their Beneficial Impact on Barley Yield and Photosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022, **70**(23), 7288-7301.

Koprna, R., De Diego, N., Dundálková, L., Spíchal, L. Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2016, **24**(3), 484-492.

Koprna, R., Humplík, J. F., Špišek, Z., Bryksová, M., Zatloukal, M., Mik, V., Novák, O., Nisler, J., Doležal, K. Improvement of Tillering and Grain Yield by Application of Cytokinin Derivatives in Wheat and Barley. *Agronomy*. 2021, **11**(1), 67.

Kumar, N., Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. 2019, **24**, e00370.

Kwak, J. Y., Park, S., Seok, J. K., Liu, K. H., Boo, Y. C. Ascorbyl coumarates as multifunctional cosmeceutical agents that inhibit melanogenesis and enhance collagen synthesis. *Archives of Dermatological Research*. 2015, **307**(7), 635-643.

Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., Neutelings, G. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science*. 2016, **7**, 735.

Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Fang, Z. Tyramine-derived hydroxycinnamic acid amides in plant foods: sources, synthesis, health effects and potential applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022, **62**(6), 1608-1625.

Letham, D. S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*. 1963, **8**, 569-573.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018, **13**, 757-772.

Lodovici, M., Raimondi, L., Guglielmi, F., Gemignani, S., Dolara, P. Protection against ultraviolet B-induced oxidative DNA damage in rabbit corneal-derived cells (SIRC) by 4-coumaric acid. *Toxicology*. 2003, **184**(2-3), 141-147.

Lopes, S. P., Yepes, L. M., Pérez-Castillo, Y., Robledo, S. M., de Sousa, D. P. Alkyl and Aryl Derivatives Based on p-Coumaric Acid Modification and Inhibitory Action against *Leishmania braziliensis* and *Plasmodium falciparum*. *Molecules*. 2020, **25**(14), 3178.

Maines, M. D., Costa, L. G., Reed, D. J., Sassa, S., Sipes, I. G.: *Current protocols in toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 9780471241065.

Mansouri, H., Mekelleche, S. M. Radical scavenging activity of hydroxycinnamic acids in polar and nonpolar solvents: A computational investigation. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*. 2020, **19**(8), 2050032.

Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F., Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*. 2015, **2015**, 905215.

McCullough, J. L., Garcia, R. L., Reece, B. A clinical study of topical Pyratine 6 for improving the appearance of photodamaged skin. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2008, **7**(2), 131-135.

Mehaya, F. M., Mohammad, A. A. Thermostability of bioactive compounds during roasting process of coffee beans. *Heliyon*. 2020, **6**(11), 05508.

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1955, **77**(5), 1392.

Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., Strong, F. M. Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *Journal of the American Chemical Society*. 1956, **78**(7), 1375-1380.

Mok, D. W. S., Mok, M. C. Cytokinin Metabolism And Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001, **52**, 89-118.

Nisler, J., Kopečný, D., Pěkná, Z., Končítíková, R., Koprna, R., Murvanidze, N., Werbrouck, S. P. O., Havlíček, L., De Diego, N., Kopečná, M., Wimmer, Z., Briozzo, P., Moréra, S., Zalabák, D., Spíchal, L., Strnad, M. Diphenylurea-derived cytokinin oxidase/dehydrogenase inhibitors for biotechnology and agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 2021, **72**(2), 355-370.

Ojeda-Hernández, D. D., Canales-Aguirre, A. A., Matias-Guiu, J. A., Matias-Guiu, J., Gómez-Pinedo, U., Mateos-Díaz, J. C. Chitosan–Hydroxycinnamic Acids Conjugates: Emerging Biomaterials with Rising Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(20), 12473.

Oslovsky, V. E., Savelieva, E. M., Drenichev, M. S., Romanov, G. A., Mikhailov, S. N. Distinct Peculiarities of *In Planta* Synthesis of Isoprenoid and Aromatic Cytokinins. *Biomolecules*. 2020, **10**(1), 86.

Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 2009, **14**(6), 2202-2211.

Plíhalová, L., Vylíčilová, H., Doležal, K., Zahajská, L., Zatloukal, M., Strnad, M. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*. 2016, **33**(5), 614-624.

Pluemsamran, T., Onkoksoong, T. a Panich, U. Caffeic acid and ferulic acid inhibit UVA-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant

defense system in keratinocyte HaCaT cells. *Photochemistry and Photobiology*. 2012, **88**(4), 961-968.

Pokorná, E., Hluska, T., Galuszka, P., Tucker Hallmark, H., Dobrev, P. I., Závěská Drábková, L., Filipi, T., Holubová, K., Plíhal, O., Rashotte, A. M., Filepová, R., Malbeck, J., Novák, O., Spíchal, L., Brzobohatý, B., Mazura, P., Zahajská, L., Motyka, V. Cytokinin N-glucosides: Occurrence, Metabolism and Biological Activities in Plants. *Biomolecules*. 2021, **11**(1), 24.

Rattan, S. I. S. *N*6-Furfuryladenine (Kinetin) as a Potential Anti-Aging Molecule. *Journal of Anti-Aging Medicine*. 2002, **5**(1), 113-117.

Rattan, S. I. S., Clark, B. F. C. Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, **201**(2), 665-672.

Rattan, S. I. S., Sodagam, L. Gerontomodulatory and Youth-Preserving Effects of Zeatin on Human Skin Fibroblasts Undergoing Aging *In Vitro*. *Rejuvenation Research*. 2005, **8**(1), 46-57.

Razzaghi-Asl, N., Khazraei, J. G. H., Borges, F., Firuzi, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, **20**(36), 4436-4450.

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., Bonina, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000, **199**(1), 39-47.

Sakakibara, H. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P. J. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Revised 3rd edition. Dordrecht: Springer, 2010, 95-114. ISBN 978-1-4020-2686-7.

Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., Villanueva-Cañongo, C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. In: Soto-Hernández M., García-Mateos, R., Palma-Tenango, M. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. 1st edition. London: IntechOpen, 2019. ISBN 978-1-78985-640-8.

Seo, Y. K., Kim, S. J., Boo, Y. C., Baek, J. H., Lee, S. H., Koh, J. S. Effects of p-coumaric acid on erythema and pigmentation of human skin exposed to ultraviolet radiation. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2011, **36**(3), 260-266.

Shang, Y. J., Liu, B. Y., Zhao, M. M. Details of the antioxidant mechanism of hydroxycinnamic acids. *Czech Journal of Food Sciences*. 2015, **33**(3), 210-216.

Schaller, G. E., Bishopp, A., Kieber, J. J. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *Plant Cell*. 2015, **27**(1), 44-63.

Skoog, F., Strong, F. M., Miller, C. O. Cytokinins. *Science*. 1965, **148**(3669), 532-533.

Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J., Pechovitch, G., de Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P. The International EU/COLIPA *In Vitro* Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicology In Vitro*. 1998, **12**(3), 305-327.

Spíchal, L. Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*. 2012, **39**(4), 267-284.

Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*. 2012, **8**, 17.

Szelağ, M., Urbaniak, A., Bluysen, H. A. R. A theoretical antioxidant pharmacophore for natural hydroxycinnamic acids. *Open Chemistry*. 2015, **13**, 17-31.

Szüčová, L., Spíchal, L., Doležal, K., Zatloukal, M., Greplová, J., Galuszka, P., Kryštof, V., Voller, J., Popa, I., Massino, F. J., Jørgensen, J. E., Strnad, M. Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2009, **17**(5), 1938-1947.

Szüčová, L., Zatloukal, M., Spíchal, L., Voller, J., Doležal, K., Strnad, M., Massino, F.J. 6,9-disubstituted purine derivatives and their use as cosmetic and cosmetic compositions. US 7960397. 2011.

Taiz, L., Zieger, E., Moller, I. M., Murphy, A. *Plant Physiology and Development*. 6th edition. Sunderland: Sinauer Associates, 2015. ISBN 978-1605353531.

Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules*. 2017, **22**(2), 281.

Tremaine, A. M., Ortiz, A., Elkeeb, L., Tran, M., Weinstein, G. Long-term efficacy and safety of topical PRK 124 (0.125%) lotion (Pyratine-XR) in the treatment of mild-to-moderate rosacea. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2010, **9**(6), 647-650.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007, **39**(1), 44-84.

van Overbeek J., Conklin M. E., Blakeslee A. F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young datura embryos. *Science*, 1941, **94**(2441), 350-351.

Vermeris, W., Nicholson, R. *Phenolic Compound Biochemistry*. 1st edition. Dordrecht: Springer, 2006. ISBN 978-1-4020-5164-7.

Voller, J., Zatloukal, M., Lenobel, R., Doležal, K., Béreš, T., Kryštof, V., Spíchal, L., Niemann, P., Džubák, P., Hajdúch, M., Strnad, M. Anticancer activity of natural cytokinins: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry*. 2010, **71**(11-12), 1350-1359.

Voller, J., Maková, B., Kadlecová, A., Gonzalez, G., Strnad, M. Plant Hormone Cytokinins for Modulating Human Aging and Age-Related Diseases. In: Rattan, S., Sharma, R. *Hormones in Ageing and Longevity*. 1st edition. Cham: Springer, 2017, 311-335. ISBN 978-3-319-63001-4.

Voller, J., Béres, T., Zatloukal, M., Džubák, P., Hajdúch, M., Doležal, K., Schmülling, T., Strnad, M. Anti-cancer activities of cytokinin ribosides. *Phytochemistry Reviews*. 2019, **18**(4), 1101-1113.

Wrigstedt, P., Kylli, P., Pitkänen, L., Nousiainen, P., Tenkanen, M., Sipilä, J. Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxycinnamic Acid Xylan Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, **58**(11), 6937-43.

Wu, J. J., Weinstein, G. D., Kricorian, G. J., Kormeli, T., McCullough, J. L. Topical kinetin 0.1% lotion for improving the signs and symptoms of rosacea. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2007, **32**(6), 693-695.

Yang, B., Ji, C., Kang, J., Chen, W., Bi, Z. Wan, Y. Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. 2009, **23**(4), 555-560.

Yong, H., Liu, Y., Yun, D., Zong, S., Jin, C., Liu, J. Chitosan Films Functionalized with Different Hydroxycinnamic Acids: Preparation, Characterization and Application for Pork Preservation. *Foods*. 2021, **10**(3), 536.

Zduńska-Pęciak, K., Dębowska, R., Kołodziejczak, A., Rotsztejn, H. Ferulic acid – A novel topical agent in reducing signs of photoaging. *Dermatologic Therapy*. 2022, **35**(7), e15543.

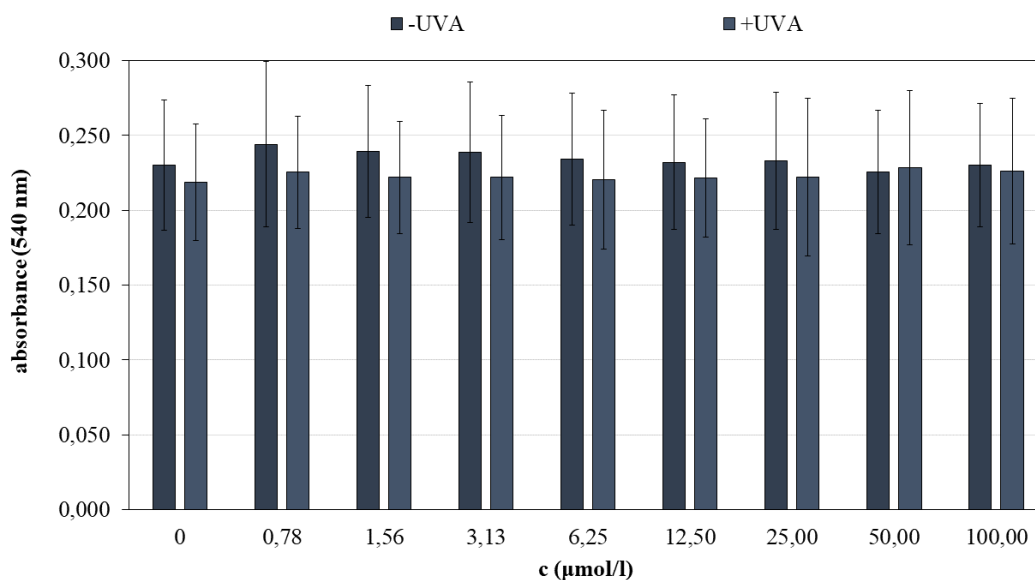
Zeb, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*. 2020, **44**(9), 13394.

Zeb, A. *Phenolic Antioxidants in Foods: Chemistry, Biochemistry and Analysis*. 1st edition. Cham: Springer, 2021. ISBN 978-3-030-74768-8.

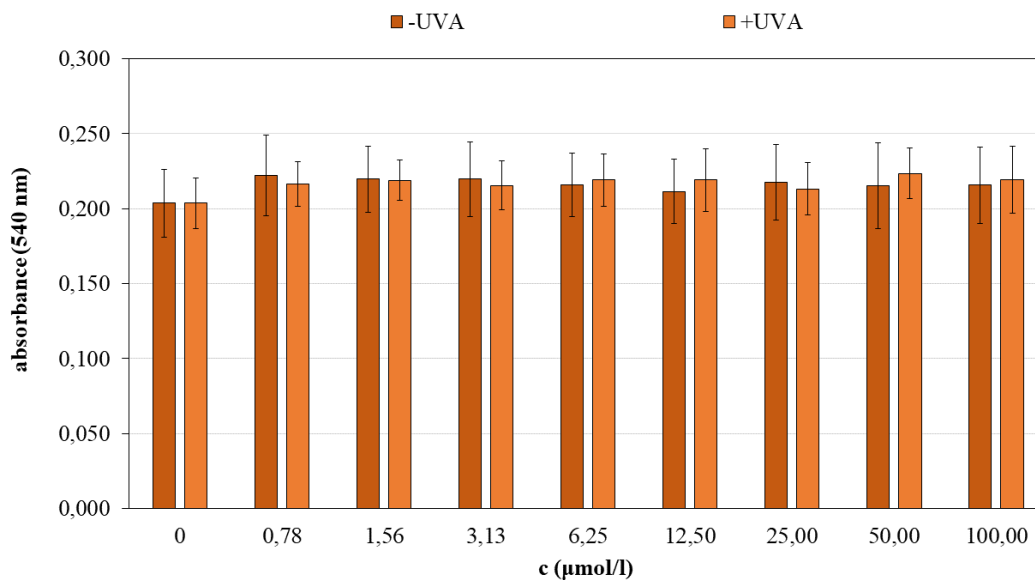
Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., Wang, M. Song, H., Liu, X., Lu, B. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*. 2019, **276**, 538-546.

Zhou, X., Iqbal, A., Li, J., Chang, L., Murtaza, A., Xu, X., Pan, S., Wanfeng, H. Changes in Browning Degree and Reducibility of Polyphenols during Autoxidation and Enzymatic Oxidation. *Antioxidants*. 2021, **10**(11), 1809.

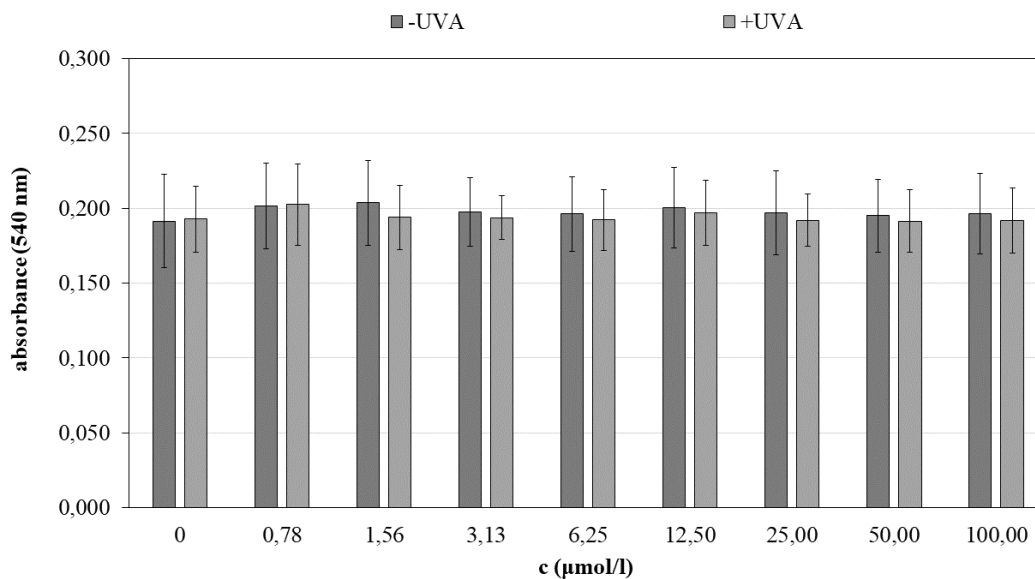
PŘÍLOHA I: Stanovení fototoxických účinků testovaných látek



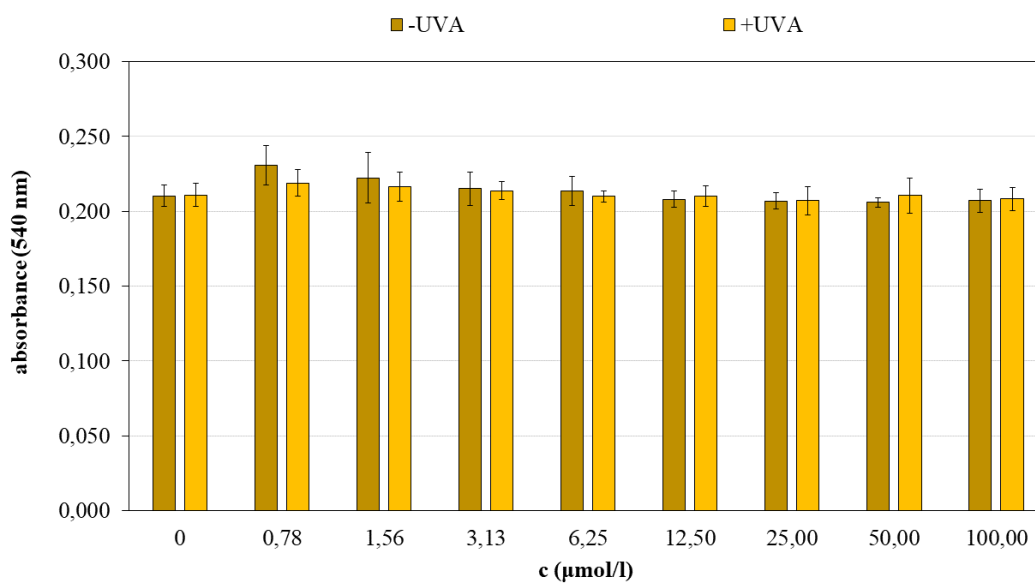
Stanovení fototoxických účinků kyseliny ferulové. Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.



Stanovení fototoxických účinků acetyl-FA (látka 7). Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.



Stanovení fototoxických účinků *para*-topolinu. Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.



Stanovení fototoxických účinků *pT*-THP (látka 12). Výsledky reprezentují průměr \pm SD ze 3 experimentů provedených na NHDF izolovaných od různých pacientů.