



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Biologická aktivita cyklopropyl laktonů: Vliv fenylsulfonového
fragmentu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Romana Hendrychová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Romana Hendrychová
Název práce	Biologická aktivita cyklopropyl laktanů: Vliv fenylsulfonového fragmentu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby	2021

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá přípravou a identifikací biologicky aktivních látek s antileishmaniálními vlastnostmi, které jsou založeny na rostlinných sekundárních metabolitech fenylylpropanoidového typu. Je zaměřena na modifikaci sulfonového fragmentu molekuly cyklopropyl fenylyl sulfonyl laktonu, která byla izolována ve výzkumném týmu vedeném doc. RNDr. Jiřím Pospíšilem, Ph.D. Teoretická část je orientována na rekapitulaci informací ohledně leishmanióz a zároveň jsou zde shrnuty poznatky o vybraných fenylylpropanoidech a vlivu strukturálních změn těchto látek na jejich biologickou aktivitu. V praktické části jsou popsány pokusy o syntézu derivátů výše zmíněného laktonu modifikovaného v rámci sulfonové skupiny. Z důvodu pandemie SARS-CoV-2 nebylo bohužel možné provést biologické testování přímo na *Leishmaniích* (testování probíhá ve spolupráci s Hebrejskou Univerzitou v Jeruzalémě). Z tohoto důvodu jsem provedla alespoň otestování vybraných připravených látek na *Ceanorhabditis elegans*.

Klíčová slova	fenylpropanoidy; cytotoxicita; SAR; strukturální modifikace; anthelmintika
Počet stran	66
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Romana Hendrychová
Title of thesis	Biological properties of cyclophenyl lactones: Influence of the phenylsulfone
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The Bachelor Thesis focus on the synthesis of novel biologically active substances with possibly antileishmanial properties. Investigated structural motives are inspired by plant secondary metabolites of the phenylpropanoid type. The work itself focus on the sulfone fragment modifications in the core structure of previously identified key intermediate – bicyclic cyclopropyl lactone. The theoretical part focus on the recapitulation of information about leishmaniasis and also it summarizes the knowledge about selected phenylpropanoids. The practical part describes attempts to synthesize derivatives that should differ in the sulfone group of the key molecule. Due to the SARS-CoV-2 pandemic, it was not possible to perform biological testing on *Leishmania* parasites (testing would be performed at Hebrew University). Thus, within the work, the biological activity of selected substances were carried out on *Ceanorhabditis elegans*.

Keywords	phenylpropanoids; cytotoxicity; SAR; structural modifications; anthelmintics
Number of pages	66
Number of appendices	1
Language	Czech

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

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas a cenné připomínky při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Danielu Chrenkovi a Mgr. Daniele Konrádové, Ph.D. za spoustu hodnotných rad, trpělivost a za asistenci při chemické syntéze. Mé poděkování patří i Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D. za pomoc a čas při testování připravených látek na *C. elegans*, Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za vedení buněčného testování a celému kolektivu katedry experimentální biologie (biologické testování) a hlavně katedry chemické biologie (hlavní část mé bakalářské práce) za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého (IGA_PrF_2021_011) za financování této závěrečné práce.

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod a cíle práce	9
2. Teoretická část	11
2.1 Leishmanióza	11
2.1.1 Historický kontext	14
2.1.2 Sociálně ekonomické dopady	14
2.1.3 Přenašeč	15
2.1.4 Leishmania	16
2.1.5 Klinické projevy	19
2.1.6 Současná léčba	22
2.2 Sekundární rostlinné metabolity šikimátové dráhy	23
2.2.1 Charakteristika a bioaktivita lignanů a neolignanů	27
3. Experimentální část	35
3.1 Chemikálie	35
3.1.1 Vizualizační roztoky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)	35
3.2 Pufry a média	35
3.3 Metody a materiál	36
3.4 Organická syntéza	37
3.4.1 Cílená syntéza cyklopropylfenylsulfonyl laktonu	37
3.4.2 Příprava alkyl sulfonů	39
3.5 Biologické testy	46
3.5.1 Životaschopnost lidských buněčných linií	46
3.5.2 Anthelmintická aktivita	46
4. Výsledky	48

4.1	Cílená modifikace sulfonové části cyklopropyl laktonu.....	48
4.1.1	Příprava dosud nepřipraveného enantiomeru látky 5	48
4.1.2	Modifikace sulfonové části u látky 5.....	48
4.1.3	Syntéza alkyl substituovaných bicyklolaktonů 11	48
4.1.4	Syntéza heteroaryl substrátů.....	50
4.2	Anthelmintická aktivita.....	52
5.	Diskuse	53
5.1	Organická syntéza	53
5.2	Biologické testování.....	56
6.	Závěr.....	57
7.	Použitá literatura.....	58
8.	Přílohy	67

Seznam zkratek

AcOH	Kyselina octová	NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid
AD	Alzheimerova choroba	NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
Ap	β -Amyloid	NGM	Médium pro růst hlístic (nematode growth medium)
b.t.	Bod tání	NMR	Nukleární magnetická rezonance
BT-SH	2-Merkaptobenzothiazol	MS	Hmotnostní spektrometrie
CL	Kožní leishmanióza	MSF	Lékaři bez hranic
d	Dublet	P.E.	Petrolether
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát	PKDL	Post-kala-azar
DCL	Difuzní kožní leishmanióza	ppm	Počet částic na milion (parts per milion)
dd	Dublet dubletu	RCL	Recidivující kožní leishmanióza
DIPEA	Diethylisopropylamin	RT	Laboratorní teplota
DMSO	Dimethylsulfoxid	RVO	Rotační vakuová odparka
DNDi	Iniciativa pro léky pro zanedbávané nemoci	s	Singlet
equiv	Ekvivalent	SA	(-)-Sanguinolignanem A
Et ₂ O	Diethylether	SAR	Vztah struktury a aktivity (structure activity relationship)
Et ₃ N	Triethylamin	t	Triplet
EtOAc	Ethylester kyseliny octové	tt	Triplet tripletu
EtOH	Ethanol	TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
HIV	Lidský imunodeficientní vir	VL	Viscerální leishmanióza
HRMS	Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením	WHO	Světová zdravotnická organizace
IC ₅₀	Polovina maximální inhibiční koncentrace	δ	Chemický posun
<i>J</i>	Štěpící konstanta		
LC	Kapalinová chromatografie		
m	Multiplet		
MeOH	Methanol		
MeONa	Methanolát sodný		
ML	Slizniční leishmanióza		

1. Úvod a cíle práce

Biologicky aktivní látky přírodního původu jsou hlavní inspirací při vývoji nových farmaceutických výzkumných látek. Typickým příkladem může být např. Aspirin[®]. Tento derivát kyseliny salicylové byl poprvé získán esterifikací kyseliny salicylové pomocí acetanhydridu v roce 1897 německým chemikem Felixem Hoffmanem (firma Bayer). Avšak dle záznamů z laboratorních deníků se v roce 2000 zjistilo, že na tento objev přišel Hoffmanův nadřízený, a to Arthur Eichengrün. Jeho autorství bylo vymazáno na počátku 30. let 20. století kvůli jeho židovskému původu.¹

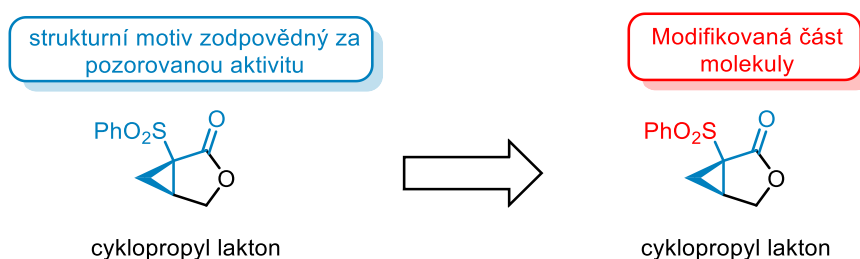
Zde se musí podotknout, že účinky kyseliny salicylové získané extrakcí vrbové kůry, byly známy již nejméně od 5. století př. n. l., kdy Hippokratés poznamenal, že tyto extrakty tiší horečku a pomáhají od bolesti. Postupem času se povedlo znovu izolovat účinnou látku kyselinu salicylovou (1838, italský chemik Raffaele Piria, Sorbona, Paříž), avšak její hořká chuť a vedlejší účinky (pálení žaludku, průjmy) způsobovaly problémy spojené s její administrací. Další nevýhodou byla náročná izolace z rostlin, přičemž čistota izolované látky nebyla nikterak vysoká. Takže rozmach Aspirinu[®] jako „úžasného léku na všechno“, tak jak jej známe dnes, musel počkat do příchodu dvou různých událostí. První z nich se udála roku 1859, kdy německý chemik Hermann Kolbe popsal výrobu kyseliny salicylové z fenolu.² Druhou příhodou byl již zmiňovaný objev acetylace kyseliny salicylové v roce 1897 (Hoffman/Eichengrün). Tyto dvě příčiny odstranily množství vedlejších účinků dané kyselinou díky vyšší nerozpustnosti Aspirinu[®] ve vodě, a tedy její lepší administraci. A to, co se stalo poté, je již historie...

Těmito sledy událostí jsem se snažila ukázat jakou cestou se v rámci mé bakalářské práce ubíráme. V naší skupině se inspirujeme přírodními látkami. Vybíráme si ty, které se nám pozdávají jako potenciálně biologicky aktivní a následně je strukturně upravujeme s cílem zajistit jakým způsobem ovlivňují biologickou aktivitu v rámci biotestů. Zároveň je modifikujeme tak, aby se biologická aktivita zvýšila.

V rámci mé práce se zabývám strukturními modifikacemi cyklopropyl laktonu vyvinutého v rámci doktorské práce Mgr. Daniely Konrádové, Ph.D.^{3,4} Ve své pilotní studii ukázala, že přírodní sekundární metabolit fenylypropanoidového typu (lignan, izolovaný z pepřovníku) nazvaný (-)-sanguinolignan A, jenž byl ve formě extraktu využíván šamany v Jižní Americe k léčbě kožních forem leishmaniózy, má biologickou aktivitu, která odpovídala publikované hodnotě. Následně se zaměřila na prozkoumání tohoto strukturního

motivu v kontextu vztahu struktury a aktivity (structure activity relationship – SAR) a zjistila, že jednoduchý cyklopropyl lakton (Obrázek 1), má mnohem vyšší aktivitu než původní (-)-sanguinolignan A.

Cílem mé bakalářské práce se stalo prozkoumání tohoto typu strukturního motivu se zřetelností na prozkoumání sulfonové části z pohledu jejího vlivu na biologickou aktivitu (Obrázek 1). V rámci teoretické části své práce se nejprve zabývám leishmaniózou jako takovou a následně antileishmaniotiky se vztahem mezi strukturou a aktivitou těchto látek. Poté se zabývám experimentálními přístupy k syntéze daných látek s modifikovanou sulfonovou částí a ohodnocení jejich biologických aktivit.



Obrázek 1. Chemická struktura cyklopropyl laktonu s antileishmaniální aktivitou.

2. Teoretická část

Ve své teoretické části se budu nejdříve zabývat leishmaniózou, parazitickou nemocí postihující zejména země tzv. třetího světa. Poté se budu věnovat přiblížení světa lignanů a neolignanů, rostlinných fenolických sekundárních metabolitů, a to z důvodu propojení obou „světů“ v jeden jediný, jehož výsledkem by měla být látka s antileishmaniálními vlastnostmi patřící do skupiny lignanů.

2.1 Leishmanióza

Leishmanióza je parazitární onemocnění lidí a zvířat způsobené různými druhy protozoa rodu *Leishmania*. Jedná se o třetí nejzanedbávanější tropickou chorobu na světě, která se vlivem změn klimatu neustále rozšiřuje. Endemické přenášení bylo potvrzeno v 98 zemích a 3 teritoriích (Obrázek 2).⁵ Rizikem nákazy trpí celkově 350 milionu lidí⁶ a nově infikováno je přibližně 0,7-1 milionu lidí ročně (Internetový zdroj 1).

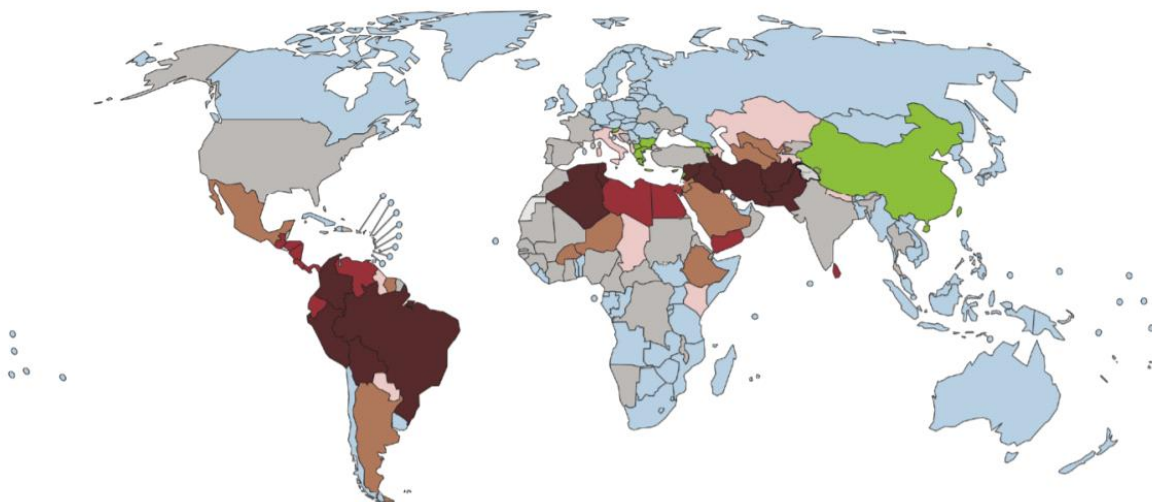
Přenos prvoka na hostitele je způsoben kousnutím samičích písečných mušek (phlebotomine sandflies) rodu *Phlebotomus* nebo *Lutzomyia*.^{7,8} Písečné mušky rodu *Phlebotomus* se nacházejí v oblasti Středoziemního moře, Středního východu, Afrického rohu a Indického subkontinentu, v tzv. Starém světě. Nový svět, tj. Střední a Jižní Amerika, je osídlen muškami rodu *Lutzomyia*.⁷

Životní cyklus parazitů vykazuje dvě stádia. V první řadě se jedná o bičíkem pohyblivé promastigoty vyskytující se ve střevech písečných mušek.^{8,9} Ty následně prochází různými morfologickými a fyziologickými změnami, jež jsou nezbytné pro vznik infekčních metacyklických promastigotů.^{8,10} Přenosem muškou do hostitele dochází po vpichu. V tom okamžiku se parazit přeměňuje ze stádia promastigota na nepohyblivého amastigota, jež parazituje ve fagocytech hostitele, zejména v makrofázích.⁸

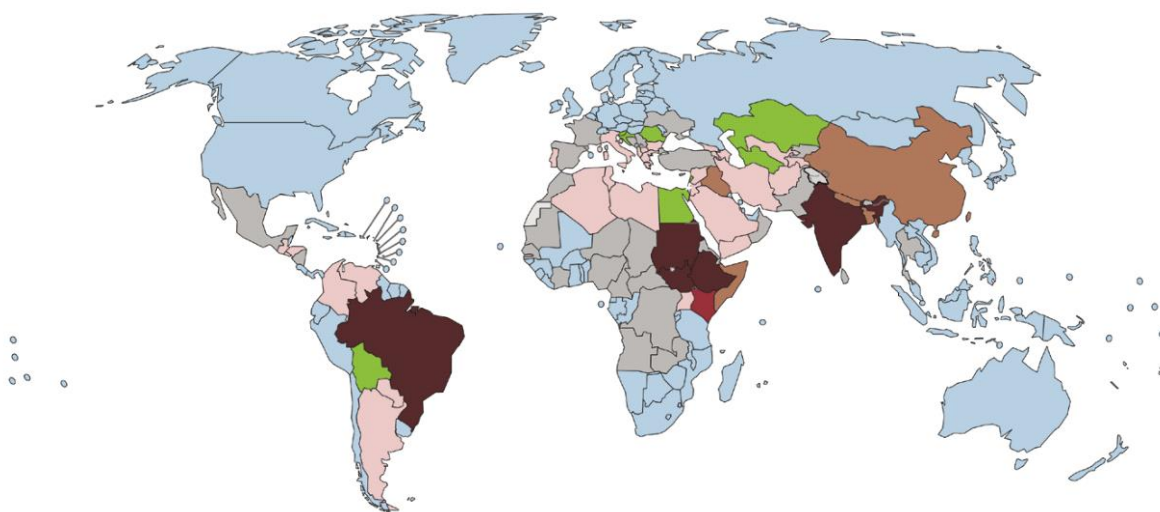
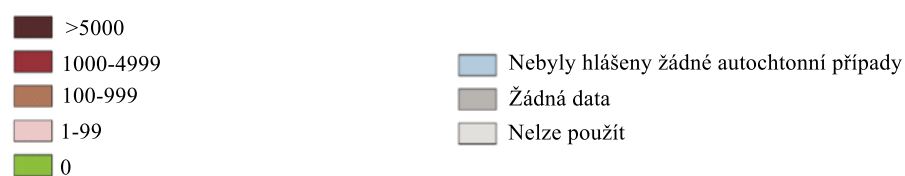
Existují dva hlavní klinické projevy infekce – kožní leishmanióza (CL) a viscerální leishmanióza (VL). Tyto nemoci se od sebe liší na základě parazitárních vlastností (typu leishmanióz), genetických aspektů a zejména pak zdraví hostitele.^{11,12} Dalšími formami, jež jsou podtypy těchto dvou výše zmíněných onemocnění je např. difúzní leishmanióza (DCL), mukokutánní leishmanióza (ML), post-kala-azar (PKDL) a recidivující leishmanióza (RCL).⁵ Nejčastěji se projevuje CL, jejímž důsledkem dochází ke vzniku kožních vředů či nevzhledných jizev. Ročně se CL nakazí okolo 0,6-1 milionu lidí (Internetový zdroj 1), z toho 75 % případů se připisuje zemím třetího světa, a to Afganistánu, Sýrii a Brazílii (Obrázek 2).¹³ Nejtěžší formou leishmaniózy je VL, pokud není léčena může být i

smrtelná.¹⁴ Ročně se jí nakazí 50-90 tisíc osob (Internetový zdroj 1), z nichž 90 % obývá Etiopii, Súdán, Indii, Bangladěš a Brazílii (Obrázek 2).¹³

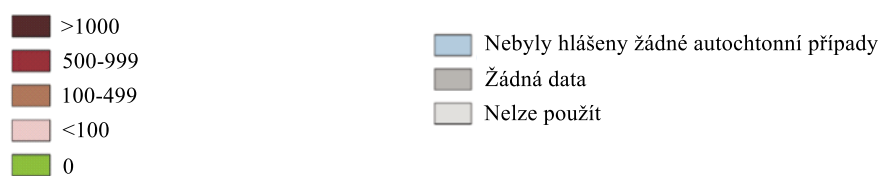
Pro léčbu VL se používají především následující léky s antileishmaniální aktivitou – amfotericin B, antimonialy, sitamaquin, pentamidin, paromomycin a miltefosin. V posledních letech se variace dostupných léků proti leishmanióze rozšířila, avšak jejich širší využití je limitováno nežádoucími účinky, které při nevhodném použití mohou vést až ke smrti pacienta, jež není spojitelná s vlivem parazita.⁹ V současnosti i přes zlepšování diagnostiky a léčby leishmanióz je úmrtnost velmi vysoká. Je nutno podotknout, že důvodem nesnižování mortality této nemoci je lékařská a epidemiologická složitost i oblast, ve kterých se tyto choroby vyskytují. Situaci nikterak nepomáhá ani vyšší zastoupení druhů prvoků a s ní spjatá virulence, ani migrace písečných mušek, globální oteplování či sociálně ekonomické faktory.⁵



Počet nových případů CL zaznamenaných v roce 2018:



Počet nových případů VL zaznamenaných v roce 2018:



Obrázek 2. Mapa zaznamenávající globální rozšíření CL a VL. Největší ložiska se vyskytují v Jižní a Střední Americe, Africe a Jižní Asii.¹⁵

2.1.1 Historický kontext

Nejstarší průkazný případ leishmaniózy byl identifikován v mumiích datovaných přibližně do let 2050-1650 př. n. l. (hrobka Střední říše v západních Thébách, detekce pomocí leishmaniální mitochondriální DNA).¹⁶ Popisy lézí byly nalezeny i v knihovně asyrského krále Ashurbanipala (7. století př. n. l.). Tento popis byl nejspíše vyvozen na základě 4500–3500 let starých textů. V 10. století arabští lékaři (Avicenna) léze podrobně popsali a seřadili. Od té doby se jim dle místa výskytu začalo říkat Orientální léze.¹⁷

Skotský přírodovědec a lékař Alexander Russel v roce 1756 vypracoval klinický popis suché a mokré formy tzv. Orientálních lézí. Na přelomu roku 1824 a 1825 bylo zaznamenáno první ohnisko viscerální formy leishmaniózy (kala-azar) ve vesnici Mahomedpore v Indii. Za několik let se rozšířila po Indii do Západního Bengálska a Assamu, a nakonec dokonce i na sever Bengálska.¹⁶ Název kala-azar neboli černá horečka vznikl na konci 19. století.^{16,18} A ve stejném období pak ruský lékař Piotr Fokich Borovský určil, že za příčinou Orientálních lézí jsou prvoci. V roce 1903 britský lékař Roland Ross publikoval článek, v němž navrhl pojmenovat prvoka způsobujícího kala-azar *Leishmania donovani*. Název parazita byl označen podle irského lékaře Charlese Donovana a skotského patologa Williama Boog Leishmana, o jejichž studii zabývající se popisem parazitů se R. Ross opíral.¹⁶

2.1.2 Sociálně ekonomické dopady

Mezi rizikové faktory způsobující šíření a značný dopad leishmaniózy na populaci patří především chudoba, podvýživa, negramotnost, poruchy funkce imunitního systému, nesprávně uzpůsobené obydlí a environmentální změny.¹⁴ Důležitým faktorem stojícím za rozšířením leishmaniózy v zemích třetího světa jsou velmi vysoké náklady na léčebnou terapii. U postižených jedinců tedy dochází ke značnému zadlužení z důvodu nákladné léčby.¹⁹ Například v Nepálu je roční průměrný příjem na osobu nižší než průměrný výdaj na léčbu VL. Pacienti jsou v takových případech nuceni prodat domácí zvířata či si vzít půjčku na pokrytí léčebných nákladů.²⁰ A zpětně nedostatek financí má devastující účinek jak na psychiku, tak i na celkové zdraví člověka.²¹ Dále bylo zjištěno, že nízký příjem bílkovin, vitamínu A, železa a zinku, který je standardně zaznamenáván u valné většiny žen a dětí v Africe a Asii, má za následek vyšší riziko rozvoje VL po infikování. Taktéž pravděpodobnost nákazy ML roste v závislosti s nutriční proteinovou podvýživou.¹²

Leishmanióza má také vliv jak na psychiku, tak i na sociální postavení zejména žen v rozvojových zemích. Kvůli deformujícím jizvám způsobenými CL bývají navíc ženy společensky stigmatizovány. Díky tomuto handicapu se pak nemohou vdát a již vdané ženy jsou často manžely opuštěny.¹⁹ V Afganistánu se matky s CL dokonce nemohou starat o své děti.¹² Jizvy a léze spjaté s CL jsou tak v určitých zemích známkou chudoby.¹⁹

V posledních letech dochází z důvodu zvyšujícího se zájmu o návštěvy v tropických a subtropických oblastí se zvýšeným výskytem *Leishmanie* (turismus) a z důvodu globálního oteplování k šíření leishmaniózy i do jiných než endemických oblastí světa. Navíc, tato infekce se dále rozšiřuje i vlivem synergického efektu (oslabení imunitního systému hostitele) s pandemií lidského imunodeficientního viru (HIV) S velkou pravděpodobností tedy bude nemoc brzy brána jako celosvětový problém, s nímž se nebudou potýkat jen lidé třetího světa. Současně s tímto „rozvojem“ (šíření) tak roste zájem i o vývoj vakcín a nových léků s méně závažnými nežádoucími účinky aplikovatelných při léčbě leishmaniózy.¹⁹

2.1.3 Přenašeč

Prvoci rodu *Leishmania* jsou přenášeni na lidi a zvířata písečnými muškami z řádu *Diptera*, podřádu *Nematocera*, čeledi *Psychodidae* a podčeledi *Phlebotominae*.²² Vektorem může být pouze šest rodů těchto mušek, kde tři z nich se objevují v Novém světě – *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya* (vyskytující se poblíž lesů) a další tři pocházejí ze Starého světa – *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Chinius* (vyhledávající suché oblasti). Pouze dva z těchto šesti rodů: *Phlebotomus* a *Lutzomyia* jsou potvrzeni jako přenašeči lidské leishmaniózy.⁵ Na světě je prokázáno 800 druhů písečných mušek, z toho pravděpodobně 93 druhů je přenašečem *Leishmanií*.⁶ Příslušná klasifikace jednotlivých rodů *Phlebotomine* je problematická a i přes dlouhodobé zkoumání a zdokonalování identifikace ne všechny druhy jsou identifikovány a taxonomicky zařazeny.⁵ Pro odlišení různých druhů „flebotomine sandflies“ se nejčastěji berou na zřetel jejich morfologické vlastnosti,⁶ a to např. forma žlázek na spodině jednotlivých spermatických kanálků či genitální atriální armatury.²³

Životní cyklus vektoru je provázen dokonalou metamorfózou projevující se čtyřmi fázemi – vejce, larva se čtyřmi instary, kukla a nakonec imago. Chlupaté tělo dospělého je zbarveno od šedé až po téměř černou a není větší než 3,5 mm. Křídla napojující se na zadní stranu těla vytváří v klidu písmeno V, což je považováno za charakteristický znak těchto mušek. Mají dlouhé a jemné nohy. Živí se medovicí vyráběnou mšicemi a sladkým nektarem z rostlin. Pro úplný vývoj vajíček je nutné aby samice přijímala i krevní

potravu.²² Avšak samičky infikované *Leishmanií* mají problém s příjmem krevní potravy kvůli poškození stomodeální chlopně na přední části středního střeva (*mesenteronu*).⁶

Některé druhy písečných mušek nejsou uzpůsobeny pro vývoj parazitů, a to má za následek nižší množství přenašečů v populaci.²⁴ Vektory se rozlišují na specifické – podporující růst jednoho druhu *Leishmanáníí* a permissivní – podporující růst více než jednoho druhu. Přenašečem může být pouze taková muška u níž lze vystopovat resistenci prvoka na trávicí enzymy mesenteronu písečné mušky. Přítomnost vazebných míst ve středním střevě vektoru (vhodný lipofosfoglykan pro promastigoty *Leishmáníí*) jsou ideálními podmínkami pro dokončení vývoje parazita. Vektor tak po požití infekční krve může leishmaniózu přenášet 1-3 týdny.⁶

2.1.4 Leishmania

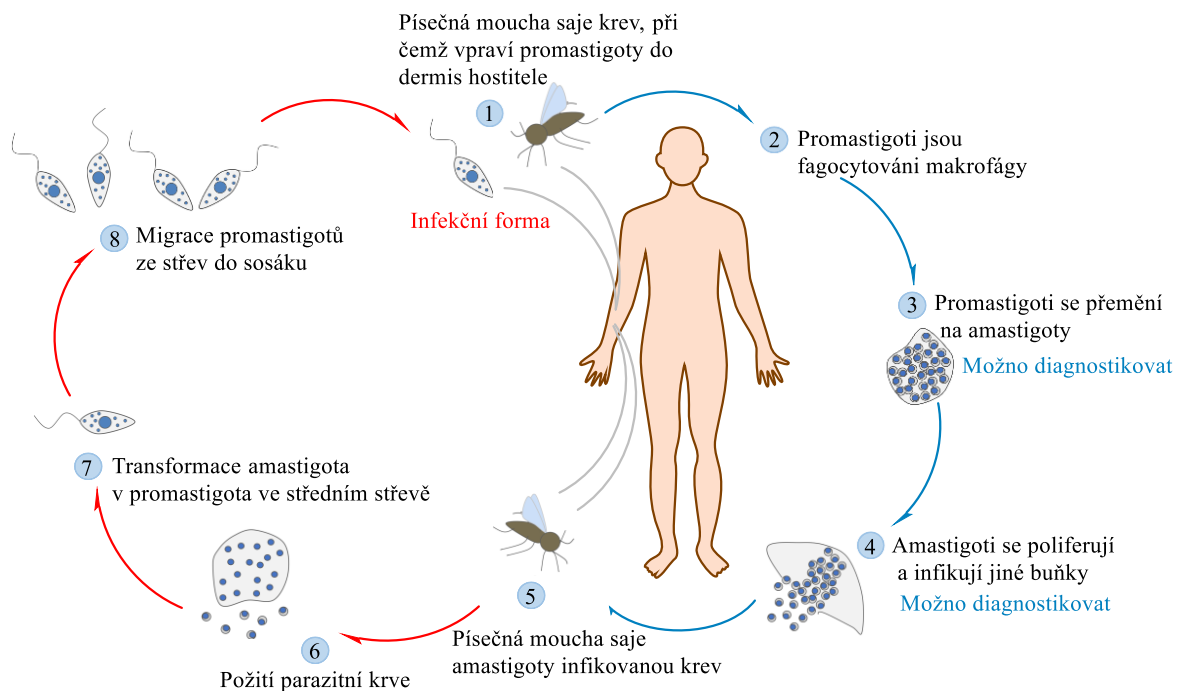
Paraziti rodu *Leishmania*, jak již bylo řečeno výše, způsobují komplexní onemocnění nazvané leishmanióza.²⁵ Taxonomicky se řadí do říše *Protista*, třídy *Kinetoplastea*, řádu *Trypanosomatida* a čeledi *Trypanosomatidea*.²⁶ Rod *Leishmania* se rozčleňuje na dva známé podrody, a to na *Leishmania* a *Viannia* lišící se epidemiologií a lokalizací vývinu promastigotů ve střevech písečných mušek.^{26,27} Starý i Nový svět má mnoho zástupců podrodu *Leishmania*, kteří se nachází ve formě promastigotů v mesenteronu a také i v předním střevě (*Suprasyllaria*) hmyzu. Podrod *Viannia* se vyskytuje pouze v Novém světě. Jeho bičíkatá stádia se vyvíjejí nejenom ve středním střevě, ale i v předním a zadním střevě (*Perispyllaria*). I přes neustálé zdokonalování taxonomie pomocí molekulárních metod, není klasifikační systém *Leishmanií* do dnešního dne zcela ucelený.²⁸ V současnosti rozlišujeme 30 různých druhů, přičemž 20 z nich je patogenních pro člověka.²⁵ V Tabulce 1 jsou vyznačeny pouze nejvýznamnější druhy *Leishmanií* cizopasíci jak na člověku, tak i u zvířat.

Tabulka 1. Vybrané druhy parazita rodu *Leishmania*.²⁹

Podrod parazita	Druh parazita	Vektor <i>Phlebotomus/Lutzomyia</i>	Výskyt	Klinická forma	Primární hostitel
<i>Leishmania</i>	<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i> , <i>P. dubosqi</i> , <i>P. salehi</i>	Starý svět	CL	Hlodavec
	<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>			Člověk, Hlodavec
	<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>		CL, DCL	Hlodavec
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. longipalpis</i>	Nový svět	CL	Hlodavec
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i>			Hlodavec
	<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	Starý a Nový svět	VL	Člověk
	<i>L. infantum</i>	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>L. longipalpis</i>			Pes, liška
<i>Viannia</i>	<i>L. brazilelnsis</i>	<i>L. wellcomei</i> , <i>L. complexus</i> , <i>L. carrerai</i>	Nový svět	ML, CL	Hlodavec
	<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i>			Neznámé
	<i>L. panamensis</i>	<i>L. umbratilis</i>		CL	Lenochod
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. trapidoi</i>			Lenochod

Jak již bylo řečeno, vývoj parazita je rozdělen do dvou fází: promastigotická a amastigotická. Bičíkaté stádium promastigotů s protáhlým tvarem měří 12-20 μm ; oproti tomu morfologie bezbičíkatých amastigotů je elipsovitá dosahující délky 2,5-3,5 μm .^{11,30} Životní cyklus parazita započiná nasáním infikované krve hostitele do trávicího traktu samičích písečných mušek rodu *Phlebotomus* či *Lutzomyia* (Obrázek 3). Písečné mušky symbiontizují pouze s **amastigoty**, kteří jsou lokalizováni jen v pokožce. Jiné bezbičíkaté formy *Leishmanií*, jež napadají útrobní orgány hostitele jsou pro přenašeče nedostupné.^{29,31}

Amastigoti se v mesenteronu hmyzu začínou přeměňovat na **procyklické promastigoty**, jejichž hlavní funkcí je replikace.³⁰ Tento proces ale může být inhibován faktorem blokujícím tuto transformaci, jenž je přítomen v krvi hostitele. Tím ovšem nedochází k degradaci promastigota trávicími enzymy hmyzu.³² Procykličtí promastigoti podléhají transformaci na **nektomonádní promastigoty** zhruba za 2-3 dny po nákaze písečné mušky.³⁰ Sekreční chitinasy parazita i endogenní chitinasy hmyzu usnadňují migraci tohoto stádia *Leishmanií* k přední části mesenteronu. Někteří promastigoti se připojí k mikroklkům epitelu, až docílí kontaktu se stomodeální chlopní mezi předním a středním střevem.^{29,30} Následující stádium, tj. **leptonadový promastigot**, vytvoří sekreční gel promastigotů důležitý pro přenos parazita. Tento gel totiž přetváří prostředí mesodermu pro metacyklogenezi, při které dochází k diferenciaci tohoto stádia na infekční **metacyklické promastigoty**.³⁰ Infekční promastigoti s bičíkem dvojnásobně delším než jejich tělo uniknou poté do proboscis.³² Vektor vpraví do savce při sání krve sliny obsahující metacyklické promastigoty, kteří odolávají lýze v prostředí hostitele a jsou fagocytováni makrofágy v podobě fagolyzozomu.³³ V místě infekce se vyskytuje větší množství neutrofilních granulocytů, které paraziti podle předpokladu využívají jako přechodné hostitelské buňky, jež jim umožní vstup do makrofágů bez jejich aktivace.³⁴ Ve fagolyzozomu se paraziti transformují na intracelulární amastigoty,³¹ které prolifерují a nakonec způsobí prasknutí makrofágu a uvolnění jeho obsahu do okolního prostředí. Zde promastigoti napadají další makrofágy.³³



Obrázek 3. Zjednodušený popis životního cyklu Leishmanií jak ve vektoru tak v hostiteli. Inspirováno internetovým zdrojem 2.

2.1.5 Klinické projevy

Rozvoj různých forem leishmaniózy závisí na genetice hostitele, na zánětlivé a imunitní reakci hostitele na parazita, na druhu parazita i na původu a typu vektoru. Druhy *Leishmanií* charakterizované společnými specifickými molekulárními a biologickými znaky mohou u hostitele vyvolat různorodou škálu klinických obrazů od samo léčivých lézí až po smrtelně nebezpečné vnitřní formy.^{7,35} U 5-10 % pacientů vyléčených z VL v Asii do 2-3 let od infekce propukne PDKL. V Africe je těchto případů mnohem více, a to až u 50 % případů PDKL se zde vyvine již do jednoho roku od vyléčení. Naopak u 10 % případů s CL, která je mírnější formou leishmaniózy, se vyvine vážná forma leishmaniózy jako např. ML, DCL či RCL. Tedy formy, jež vyžadují rychlou medikaci.⁷

Od roku 1998 byl zaznamenán rapidní nárůst hlášených případů CL, a to hlavně v oblasti Středozemního moře. Toto lze nejspíše odůvodnit celkově vyšším celosvětovým záchytem CL.¹⁵ Žádná ze zdravotních organizací jako např. Světová zdravotnická organizace (WHO), Lékaři bez hranic (MSF) či Iniciativa pro léky pro zanedbávané nemoci (DNDi) nemá jednoznačný program pro léčbu CL. Infikovaní pacienti s CL tak automaticky spadají pod programy zaměřené na VL. Sama o sobě je sice VL zanedbávanou chorobou, ale její léčba je upřednostňována kvůli fatálnějšímu dopadům.³⁶

Klinický projev CL se začíná projevovat u pacientů od dvou týdnů do tří měsíců po infikování v místě bodnutí písečnou muškou dermální lézí, která započiná svědivou papulou, jež se postupně mění v uzlík (Obrázek 4A). Léze může postupem času buď bezprostředně odeznít, anebo ulcerovat.³⁷ S většinou případů lokalizovaných lézí, typických pro CL, je lidský organismus schopný se vypořádat i bez terapeutických zásahů. Vředy se postupem několika měsíců či let samovolně vyhojí, avšak místa vpichu jsou znetvořena jizvou. Přítomnost vředů lze vidět tedy převážně na nezakrytých částech těla, a to především na obličeji, krku, pažích a nohou.³⁸

Existují i mnohem závažnější dermální formy než lokalizované, a to především u pacientů s imunodeficiencí či imunosupresí. Pro vyléčení těchto CL je potřeba terapeutická intervence.³⁸ Jednou z forem CL je právě DCL, která se vyvine z CL po úplné anergii pacienta. Pro DCL jsou typické četné uzliny či papuly, které nevředovají. Ve starém světě DCL přenáší *L. aethiopica*, a v Novém světě naopak *L. mexicana* a *L. amazonensis*.³⁷ Ve vyléčené kožní jizvě nebo jejím okolí se v řádech měsíců či let může objevit papula. Jedná se o formu zapříčiněnou infekcí způsobenou *L. tropica*, která se nazývá lupoidní leishmaniózou, a jejíž léčba trvá i několik let.³⁸

Nejčastěji se ML projeví po několika měsících a v některých případech dokonce po 20 či více letech pomocí kožních lézí, avšak může dojít i k výskytu současně s CL.^{6,37} Slizniční léze jsou běžné v Novém světě, bývají způsobené převážně podrody *Viannia* a to hlavně druhy *L. braziliensis* a *L. panamensis*, přičemž velká část případů je hlášena v Bolívii, Peru a Brazílii.⁶ Mezi první příznaky patří erytém a vředovatění nosní dírky pronikající až k přední části chrupavčité nosní přepážky, které způsobuje ucpání nosní dírky s následnou perforací septa (Obrázek 4B).^{6,39} Zhruba v 75% může také dojít k napadení hltanu, patra, hrtanu, průdušnic nebo horního rtu.⁶ Ulceraci často předchází lymfadenopatie, která je doprovázena horečkou a hepatomegalií. V nejhroších případech může dojít k totální destrukci chrupavčité tkáně nosu, hltanu a hrtanu, což má za následek neprůchodnost dýchacích cest.³⁹

Největší hrozbou je propuknutí systémového onemocnění ve formě VL, která může být buď antropologická (způsobená *L. donovani*), anebo zoonotická (*L. infantum*). Zoonotická VL s příležitostnými lidskými hostiteli se liší přenosem od antropologické VL u níž je přenášení ve sledu člověk-vektor-člověk. Inkubační doba VL trvá většinou 2–6 měsíců.⁴⁰ Parazit se v hostiteli šíří v makrofázích vnitřních orgánů, kdy napadají především játra, slezinu, kostní dřeň a lymfatické uzliny.⁴¹ Malátnost, fyzická slabost, lehce zvýšená

teplota, průjem, kašel, hepatosplenomegalie, úbytek hmotnosti, pancytopenie a polyklonální hypergamaglobulinemie charakterizují klinické příznaky VL (Obrázek 4F).^{41,42} Pokročilejší případy, které se v důsledku trombocytopenie projevují krvácením ze sliznic, se mohou vyvinout až do rozvojem sepse. Sepse většinou nastává díky bakteriální, virové či mykotické koinfekci. Leishmanióza ve spojení s koinfekcí je silně život ohrožující⁴¹ a obtížně léčitelná. Bez léčby vede VL z více než 95 % k úmrtí. Bylo zjištěno, že tato forma onemocnění se vyskytuje převážně u dětí a mladých dospělých mužského pohlaví.¹⁵



A)



B)



C)



D)



F)

Obrázek 4. A) Vřed na kůži způsobený CL (internetový zdroj 3); B) Destrukce nosní chrupavky u pacienta infikovaného ML (internetový zdroj 4); C) ML u jedenácti-leté pacientky se syndromem Louis – Barové (internetový zdroj 5); D) Pacient infikovaný PKDL; F) Podvyživené dítě nakažené VL se značnou hepatosplenomegalií (internetový zdroj 6).

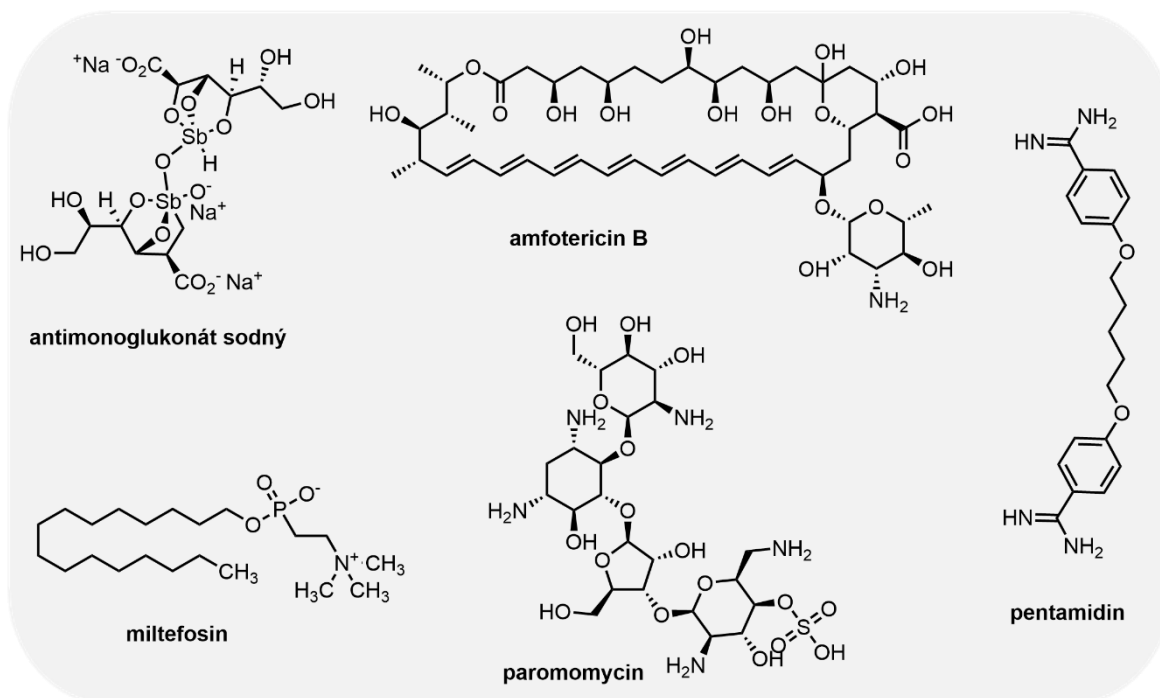
Po úspěšné léčbě VL (vyvolané *L. donovani*) se někdy projeví PKDL,⁴¹ která je pro hostitele nepříjemná, ale neohrožuje jej na životě (Obrázek 4D).⁷ Zpravidla se PKDL vyskytuje ve východní Africe a je samo hojící. To samé však neplatí pro indický

subkontinent. V posledních letech tendence nálezů infikovaných lidí PKDL v Indii vzrůstá, avšak tento jev je nejspíše projevem vyšší kontroly detekce nemoci.¹⁵

2.1.6 Současná léčba

Farmakoterapie se rozděluje na lokální (uplatňující se při mírnějších průbězích CL) a systémovou (při VL, ML a těžších CL). U CL se v závislosti na pravděpodobnosti i vývoje ML, vícečetných či větších lézí nad 5 cm a u pacientů nereagujících na lokální léčbu doporučuje použití systémové terapie. V Novém světě se upřednostňuje především systémová léčba s výjimkou infekce způsobené *L. mexicana*, u níž se aplikuje lokální léčba.⁴³ Mezi systémová léčiva patří pentavaletní antimonium, pentamidin, imidazoly/triazoly, miltefosin, amfotericin B/liposomální amfotericin B a sitamaquin. Pro místní léčbu se využívají fyzikální metody (kryoterapie, termoterapie atd.), CO₂, mast s 15% paromomycinem a lokální použití pentavaletního antimonu.^{9,43,44}

Mezi nejčastěji využívané **deriváty antimonu** patří stibogluconát sodný a meglumin antimonát, které se několik desítek let hojně podávaly pro léčbu ML v Novém světě a VL v Novém a Starém světě (Obrázek 5). Jejich využití bylo omezeno z důvodu rozvoje klinické rezistence vůči těmto preparátům v Indii a také kvůli zvýšené kardiotoxicitě a obtížnému podávání.^{43,44} Především nejsou vhodné pro pacienty trpícími leishmaniózou s HIV koinfekcí zejména kvůli tomu, že během medikace vzrůstají nežádoucí účinky. **Amfotericin B** deoxycholát se dříve dával pacientům s VL, u nichž byla potvrzena rezistence na antimonné deriváty. Nevýhodou tohoto léku jsou však značné nežádoucí účinky – nefrotoxicita, kardiotoxicita, iontová dysbalance a reakce na infuzi. K potlačení těchto vedlejších účinků došlo k zavedení lipidových forem.⁴⁴ Přínosem **miltefosinu** je, že se jedná o perorální lék. Ve značné míře se podával proti VL a ML, zejména při rezistenci na jiné antileishmaniální léčiva. Miltefosin se nesmí používat u těhotných žen, jelikož je teratogenní.⁴⁵ Kvůli snižující se účinnosti a prodloužené době léčby se od užívání miltefosinu pomalu upouští.⁹ **Pentamidin** se využívá pro léčbu CL a ve vyšších koncentracích i proti ML.⁴³ V endemických oblastech pro VL se stále častěji aplikuje kombinovaná chemoterapie, zejména kvůli zamezení vzniku rezistence na podávání antiparazitální látky, snížení nežádoucích účinků a i nákladů na léčbu a na snížení doby léčby.⁴⁴



Obrázek 5. Příklady nejčastěji využívaných látek s antileishmaniální aktivitou

Doposud na trhu neexistuje žádná vakcína proti *Leishmáním*, která by splňovala veškeré podmínky na ně kladené. Vývoj vakcíny znesnadňují především nedostatečné informace o patogenezi parazitů, možná reinfekce pacientů i nedostatek profylaktických medikamentů. Z nedávné studie vyplývá, že vakcinace pomocí DNA kódující hemoglobinový receptor *Leishmáním* se jeví jako velmi slibná, avšak její testování stále není u konce.⁹

Nutnost přípravy nových antileishmaniálních léčiv a vakcín je doposud urgentní. Dosavadní léky nejsou pro pacienty zcela vhodné v důsledku zvyšující se rezistence parazitů na medikamenty, značné toxicity a také vedlejších účinků. Kvůli tomu, že většina typů leishmanióz se objevuje v rozvojových zemích, důležitou roli hrají náklady na léčbu a dostupnost léčiv. Soudobá medikace s prokázanou účinností tvoří základní pilíř léčby, ale je nutné usilovat o vývoj nových semisyntetických i syntetických léků.⁹ V rostlinné říši se vyskytuje několik sloučenin s různou bioaktivitou, z nichž právě dimery fenylypropanoidů by mohly být účinné proti infekčním stádiím leishmanií.⁴⁶

2.2 Sekundární rostlinné metabolity šikimátové dráhy

V rostlinách probíhá několik dějů zahrnující syntézu látek pro život nezbytných tzv. primárních metabolitů. Zároveň s nimi jsou ale tvořeny i sekundární metabolity, které slouží především jako obranný systém vůči biotickým a abiotickým faktorům.^{47,48} Dále tyto látky

slouží jako ochrana vůči různým predátorům. Další metabolity se účastní i jiných procesů u rostlin včetně růstu, obrany, reprodukce či odpuzování organismů využívající rostliny jako zdroj potravy.^{47,49} Sekundární látky jsou ve vysokých dávkách obsaženy např. v ovocných slupkách a v listech, kde slouží jako ochrana proti pigmentaci, UV záření a zvyšují odolnost vůči různým chorobám. Bylo prokázáno, že mají také antifungální, antimikrobiální, antivirové, antioxidační, protizánětlivé, ale i protinádorové vlastnosti. V lidské společnosti se tento typ látek také využívá jako barviva, lepidla, vosky, oleje, ochucovadla, parfémy i léky. Z našeho pohledu je také důležité, že sekundární rostlinné metabolity jsou potencionální zdroj nových přírodních terapeutik. Sekundární metabolity se dělí na tři skupiny podle jejich syntézy - (a) fenolické sloučeniny, (b) terpeny a (c) alkaloidy s obsahem dusíku či síry.⁴⁸

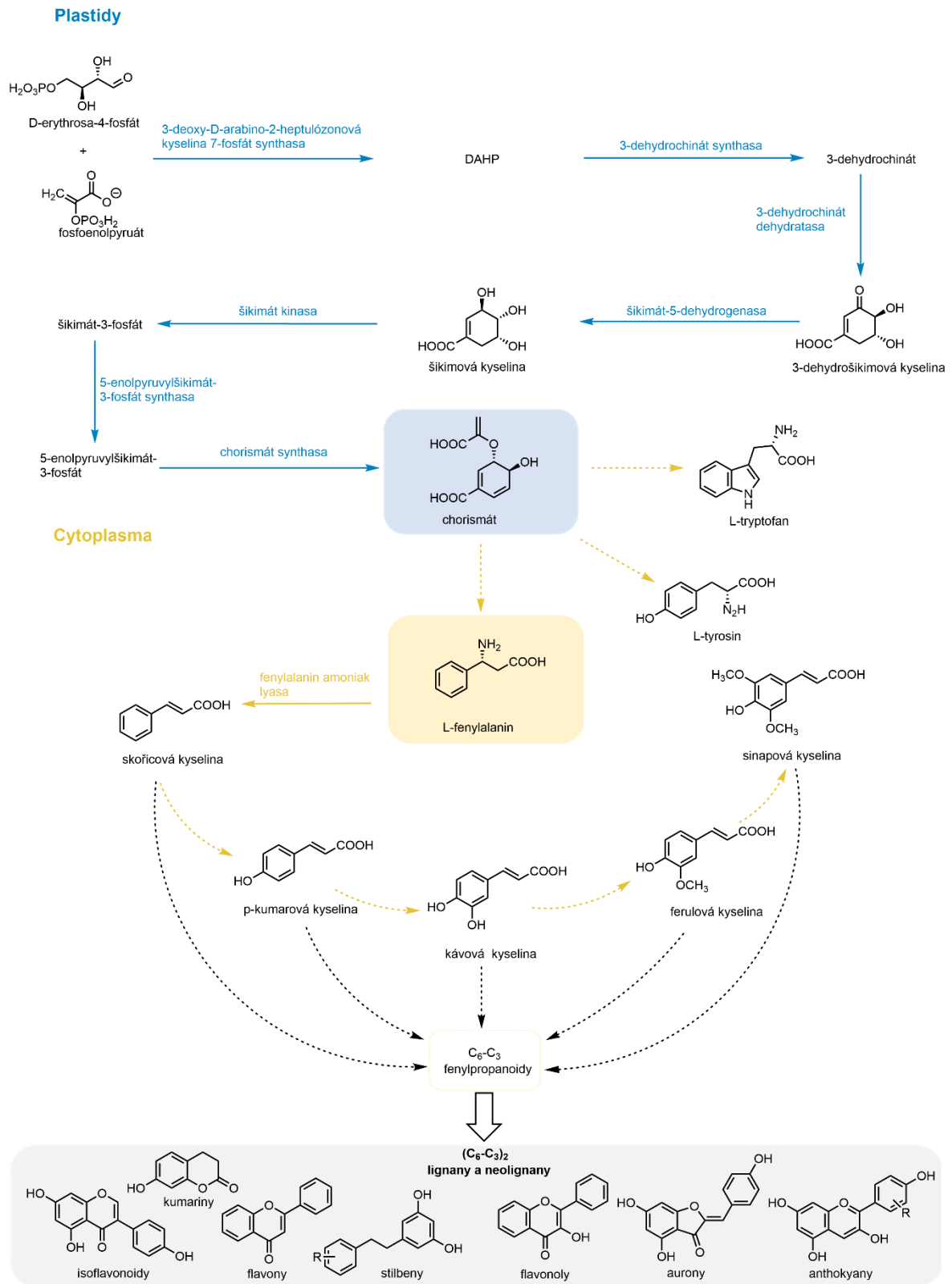
Fenolické sloučeniny obecně obsahují minimálně jeden aromatický kruh s jednou či více hydroxylovými skupinami. Jedná se o široce rozšířené látky, jejichž molekulová hmotnost je velmi variabilní.⁴⁸ Dané metabolity jsou syntetizovány prostřednictvím šikimátové dráhy, anebo pomocí fenylpropanoidní dráhy a flavonoidovou dráhu (v závislosti na druhu vznikající látky).⁴⁹

Šikimátová dráha je označení pro kaskádu sedmi enzymatických reakcí jejichž výsledným produktem je chorismát, který je dále přeměnou na další aromatické sloučeniny (Obrázek 6). Veškeré děje šikimátové dráhy se odehrávají v plastidech. Prvním krokem dráhy je syntéza meziproductů glykolýzy a pentoso-fosfátové dráhy, a to fosfoenolpyruátu s D-erytroso-4-fosfátem za vzniku 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu (DAHP). Reakci katalyzuje 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát synthasa. Sloučenina DAHP je přeměněna na 3-dehydrochinát pomocí enzymu 3-dehydrochinát synthasa, jehož aktivaci umožňují dvoumocné kationty s použitím kofaktoru nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+). Následně dochází k dehydrataci 3-dehydrochinátdehydratasou na 3-dehydrošikimát, který je následně redukován na šikimát prostřednictvím šikimát dehydrogenasy a redukované formy nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Šikimát, první identifikovaný meziproduct, po kterém je pojmenovaná celá dráha, je fosforylován šikimát kinasou za doprovodu ATP na šikimát-3-fosfát. Šestým krokem je navázání enolpyruátové části fosfoenolpyruátu na šikimát-3-fosfát enzymem 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát synthasou. Meziproduct 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát je *anti*-1,4-eliminován (fosfátová skupina) a transformován na chorismát za katalýzy chorismát synthasy. Výsledný produkt šikimátové dráhy je poté přeměněn na aromatické aminokyseliny – tryptofan, tyrosin a nebo fenylalanin,

kteře se transportují do cytosolu, kde jsou dále zpracovány na biosyntézu proteinů nebo sekundárních metabolitů.⁵⁰

Fenylpropanoidní dráha sdružuje několik reakcí umožňující syntézu tisíců strukturně odlišných fenolických látek. Tato dráha začíná prekurzorem fenylalaninem, který je katalytickým enzymem fenylalanin amoniak lyasou přeměněn na kyselinu skořicovou. Ta může být dále modifikována přes *p*-kumarovou kyselinu, kávovou kyselinu, ferulovou kyselinu či sinapovou kyselinu. Následující reakcí mediovanou chalkonsynthasou dochází k tvorbě meziproduktů, které postupnými následujícími reakcemi produkují sloučeniny odvozené od fenylpropanoidů. Nutno podotknout, že postranní větve fenylpropanoidní cesty započínají vždy u fenylalaninu.⁵¹

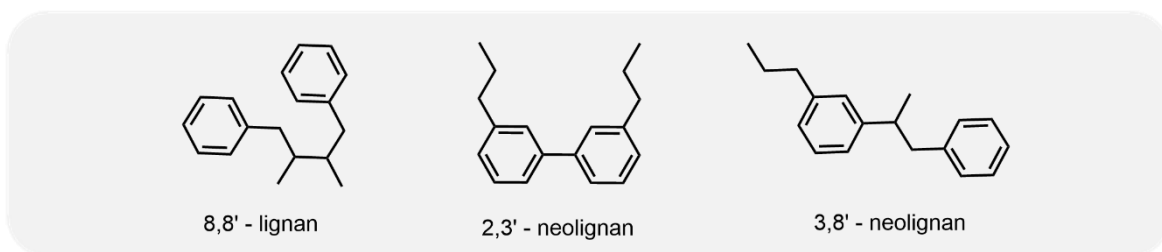
Fenylpropanoidy jsou charakterizovány aromatickou strukturou, která je tvořena fenyllovou skupinou navázanou na tříuhlíkatý řetězec. Jejich kostra je označována jako C₆-C₃.⁵² Jsou hojně rozšířené v celé rostlinné říši a u některých mikroorganismů. Avšak různé druhy rostlin se značně liší podskupinami fenylpropanoidních struktur, jež produkují. Počet fenylpropanoidních sloučenin doposud popsaných v literatuře dosahuje řádově několika desítek tisíc. Konečné počty však velmi pravděpodobně budou mnohonásobně vyšší.⁵³ Fenylpropanoidy se dělí na kumariny, aurony, taniny, antokyany, flavonoidy, isoflavonoidy, stilbenoidy, hydroxycinamové kyseliny, skořicové aldehydy, stibeny, lignany a neolignanů.^{51,53} Jejich koncentrace a biologická aktivita v rámci rostlin závisí na mnoha vlivech jako je např. světlo či stres.⁵² Biosyntéza těchto látek rostlinám umožňuje reagovat na patogeny, býložravce, světlo, nedostatek minerálů, či chemikálie.⁵³ Dokonce tvoří spojovací články mezi rostlinami a jinými organismy. Vždy je však nutné, aby správný fenylpropanoid byl ve správný čas na správném. Jedná se např. o sloučeniny, které přitahují hmyz pro opylování a také udržují strukturní odolnost. Pro své blahodárné biologické účinky využívané proti zánětům, nádorům, diabetes mellitus či patogenům se vyrábí ve farmaceutickém, kosmetickém i potravinářském průmyslu. Soudobá příprava spočívá na extrakci z rostlin či rostlinných buněčných kultur. Avšak tato metoda není vždy zcela výhodná a velmi často s sebou nese značné úskalí. Dalšími způsoby výroby fenylpropanoidů je mikrobiální produkce a chemická syntéza.⁵³



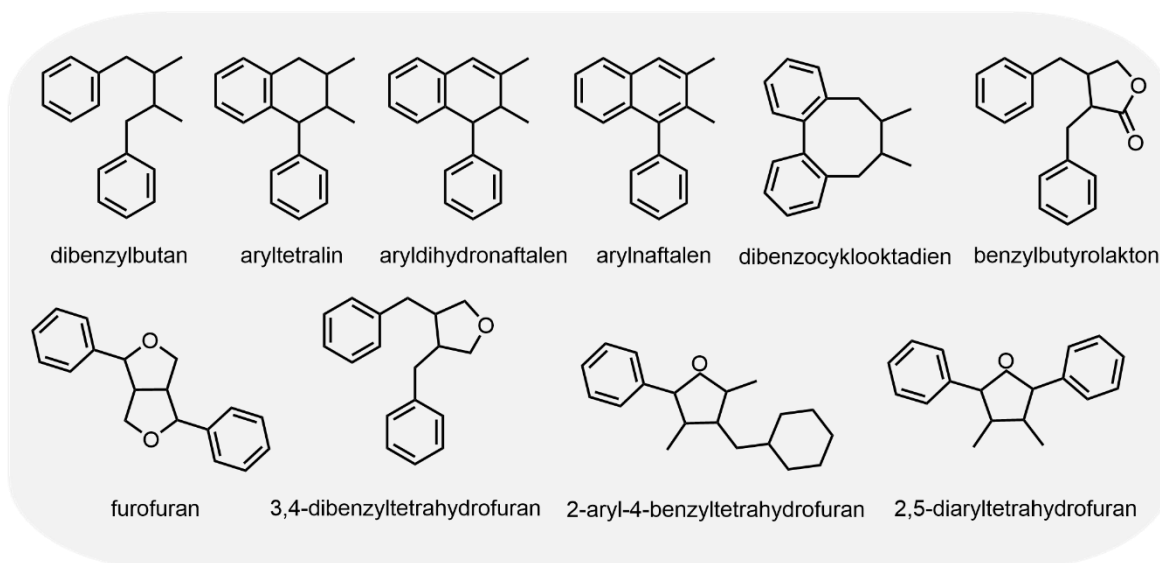
Obrázek 6. Stručný náčrt šikimátové dráhy a fenypropanoidní cesty vedoucí k fenypropanoidům.^{50,51}

2.2.1 Charakteristika a bioaktivita lignanů a neolignanů

Bohatá třída fenylpropanoidů se rozděluje na několik podskupin látek, které jsou význačné v několika aspektech. Řadí se mezi ně lignany a neolignany. Lignany jsou sloučeniny tvořené fenylpropanoidními dimery propojených mezi uhlíky C₈-C_{8'} propylových postranních řetězců (Obrázek 7). Neolignany pokrývají všechny ostatní možnosti propojení jednotek až na C₈-C_{8'}.⁵⁴ Lignany lze klasifikovat do 8 podskupin dle jejich strukturního vzorce – dibenzylbutan, aryltetralin, arylhydronaftalen, arylnaftalen, dibenzocyklooktadien, benzylbutyrolakton, furofuran a furanová jednotka, jež lze dále rozdělit na tři podjednotky: 3,4-dibenzyltetrahydrofuran, 2-aryl-4-benzyltetrahydrofuran a 2,5-diaryltetrahydrofuran (Obrázek 8). Rozmanitější podskupina neolignanů je tvořena 15 různými strukturami.⁵⁵



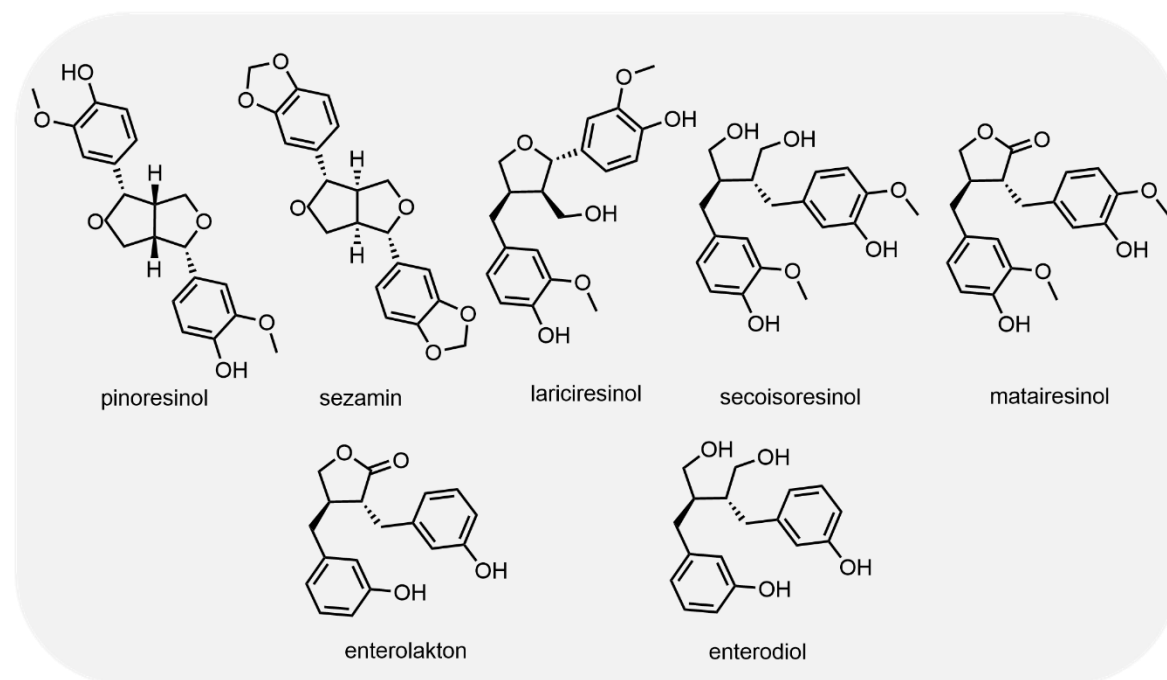
Obrázek 7. Základní struktury lignanů a neolignanů.⁵⁴



Obrázek 8. Strukturní vzorce podskupin lignanů.⁵⁵

Lignany a neolignany se vyskytují téměř ve všech suchozemských rostlinách.⁵⁶ Jsou obsaženy v celozrnných obilninách, fazolích, lněných či sezamových semínkách, čaji, kávě, zelenině, bobulích i jiném ovoci.⁵⁷ Nejenže jsou součástí potravy, ale lze je užívat i díky jejich blahodárných účinkům k léčení (tradiční čínská a japonská medicína). U tohoto typu látek byly potvrzené protinádorové, hepatoprotektivní, sedativní, antioxidační,

antipatogenní, insekticidní, antihypertenzivní, antagonistické a estrogenní biologických aktivity.⁵⁶ Mezi vědecky velmi pozoruhodné sloučeniny produkovanými rostlinami patří **pinoresinol**, **lariciresinol**, **secoisolariciresinol**, **matairesinol** a **sezamin** (Obrázek 9). V tlustém střevě jsou tyto glykosidové prekurzory enterolaktonu a enterodiolu přeměněny pomocí střevní mikroflóry na výše zmíněné savčí lignany – **enterolakton** a **enterodiol**, jež jsou také známé jako fytoestrogeny. I přestože fytoestrogeny nejspíše nemají jakoukoliv hormonální funkci, vážou se v buňce na estrogenní receptory.⁵⁷ Bylo prokázáno, že hladina enterolaktonu v krvi je podstatně nižší u pacientek s karcinomem mléčných žláz než u zdravých jedinců. Snižit riziko hormonálně závislého onkologického onemocnění, osteoporózy a srdečních příhod lze právě díky ustálené hladině enterolaktonu. I přes prokázané pozitivní účinky lignanů a neolignanů není biologická aktivita mnoha z nich objasněna, a proto jsou cílem dalšího zkoumání.⁵⁸

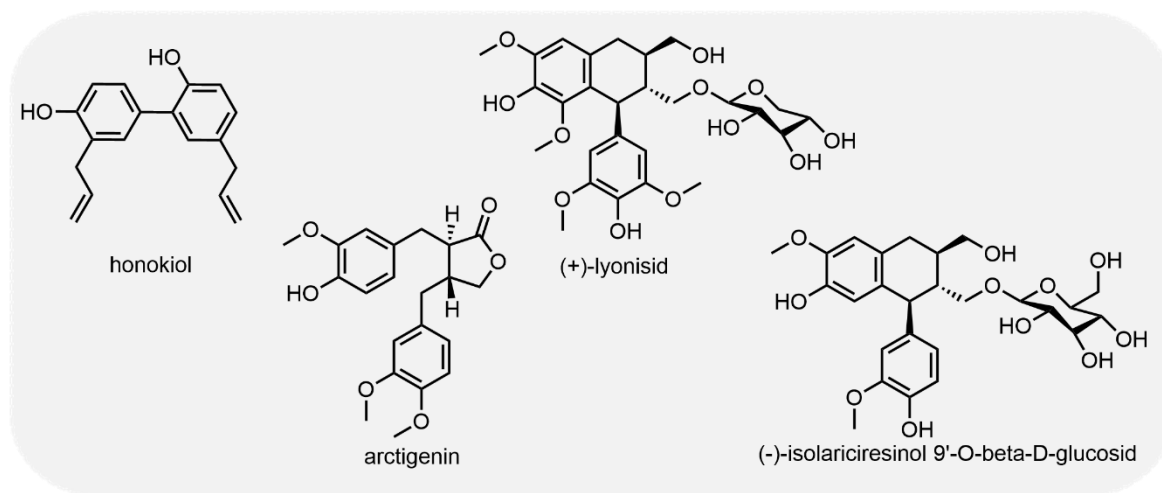


Obrázek 9. Chemické struktury vybraných přírodních lignanů.⁵⁸

2.2.1.1 Ovlivnění centrální nervové soustavy

Jednou z molekul, která má známou a značnou aktivitu na centrální nervovou soustavu, je **honokiol** (Obrázek 10). Jedná se o neolignanový bifenol přítomný v semenných šiškách či kůře stromu *Magnolia*, který je hojně využíván v tradiční čínské medicíně jako analgetikum.^{59,60} Bylo prokázáno, že má protinádorové, protizánětlivé, antitrombózní, antipatogenní, antioxidační a neuroprotektivní účinky.^{59,61} Při experimentech na kulturách potkaních kortikálních neuronů zaváděných za účelem zkoumání neurotropní aktivity

honokiolu, bylo zjištěno, že 4'-fenolová a 5-allylová skupina u této látky hrají význačnou roli pro růst neuronů. Zároveň bylo prokázáno, že 4-O-methylhonokiol má také neurotrofickou aktivitu.⁶¹ Pravděpodobně díky své malé molekulové hmotnosti může honokiol procházet hematoencefalickou bariérou,^{60,61} čímž představuje potenciální lék pro léčbu neurodegenerativních poruch jako je např. Alzheimerova choroba (AD). Honokiol zabraňuje zániku cholinergních neuronů u AD tím, že inhibuje agregaci proteinu β -amyloidu (Ap) v mozku, cholinesterasu, oxidativní stres a chelatuje železo.⁶⁰ Další sloučeniny, které vykazovaly příznivé účinky proti agregaci Ap, jsou (+)-**lyonisid** a (-)-**isolariciresinol 9'-O-beta-D-glucosid**. Pomocí molekulárního dokování bylo zjištěno, že inhibice agregace Ap je způsobena glykosidovým řetězcem. Navíc se ukázalo, že účinnost těchto sloučenin je násobně vyšší než u běžných léčiv proti AD (např. kurkuminu).⁶² **Actigenin**, lignan dibenzylbutyrolaktonového typu, je známý svou neuroprotektivní aktivitou. Mimo to byly u tohoto lignanu objeveny protinádorové a protizánětlivé vlastnosti. Dále je v klasické medicíně využíván pro léčbu encefalitidy. Pro své neuroprotektivní vlastnosti by arctigenin a jeho deriváty mohly být aktivní vůči různým nervovým onemocněním (schizofrenii, autismus, bipolární porucha, mentální retardaci aj.). Jeho účinnost spočívá v inhibici ionotropních glutamových receptorů, jež jsou citlivé na kainát, čímž brání excitotoxicitu neuronů. A také může procházet přes hematoencefalickou bariéru.⁶³

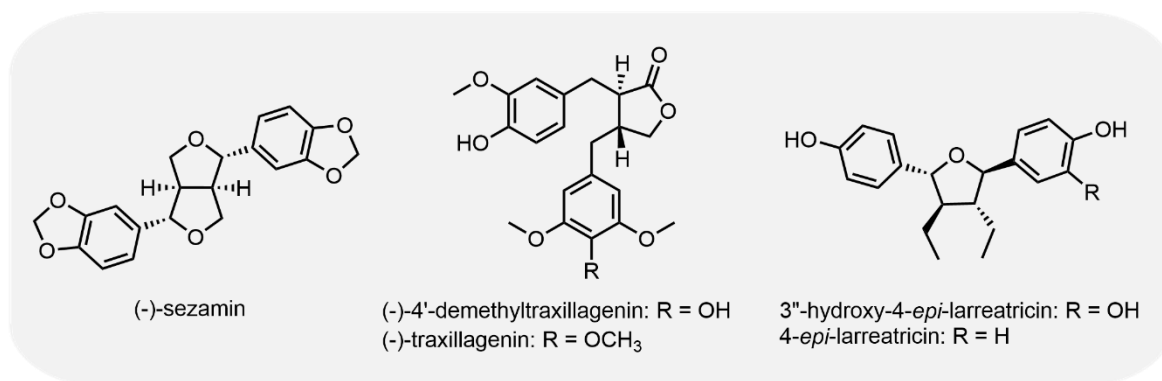


Obrázek 10. Chemické struktury lignanů a neolignanů s neuroprotektivními vlastnostmi.⁶¹⁻⁶³

2.2.1.2 Antioxidační aktivita

Produkty oxidace vznikají v rostlinách spontánně při oxidativních procesech (O_2 , peroxidové radikály aj.). Nadprodukce volných radikálů je však pro rostlinu toxická a způsobuje poškození buněčných struktur. Důsledkem může být urychlené stárnutí buněk. Tyto negativní účinky jsou klíčové pro vývoj chronických a degenerativních chorob. Pro

zabránění tohoto procesu se využívají antioxidanty, které neutralizují tyto reaktivní druhy volných radikálů a přemění je na neškodlivé molekuly.⁶⁴ Přírodními antioxidanty rostlin jsou právě fenolické látky. V živočišných buňkách pak tyto látky mohou fungovat obdobně. Antioxidační vlastnosti byly prokázány u **sezaminu** (Obrázek 11) (záchyt volných radikálů), který zabráňuje lipoperoxidaci vyvolané po fyzické námaze. Bylo zjištěno, že epoxyignany s tetrahydrofuranovou skupinou, zejména **3''-hydroxy-4-epi-larreatricin** a **4-epi-larreatricin**, mají poměrně vysokou antioxidační aktivitu, která je s vysokou pravděpodobností spojena s počtem a polohou hydroxy a methoxy skupiny na skeletu. Zároveň tetrahydrofuranová a fenylová skupina také nejspíše těmto vlastnostem přispívá. Lignany **actigenin**, **3''-hydroxy-4-epi-larreatricin** a **4-epi-larreatricin** jsou účinné proti toxickým trichloromethylovým radikálům, které vznikají poškozením jaterních buněk tetrachloromethanem. Dané radikály způsobují peroxidaci lipidů či se naváží na proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Dle publikovaných dat fenolová skupina u lignanů hraje při těchto aktivitách nezastupitelnou roli.⁶⁵

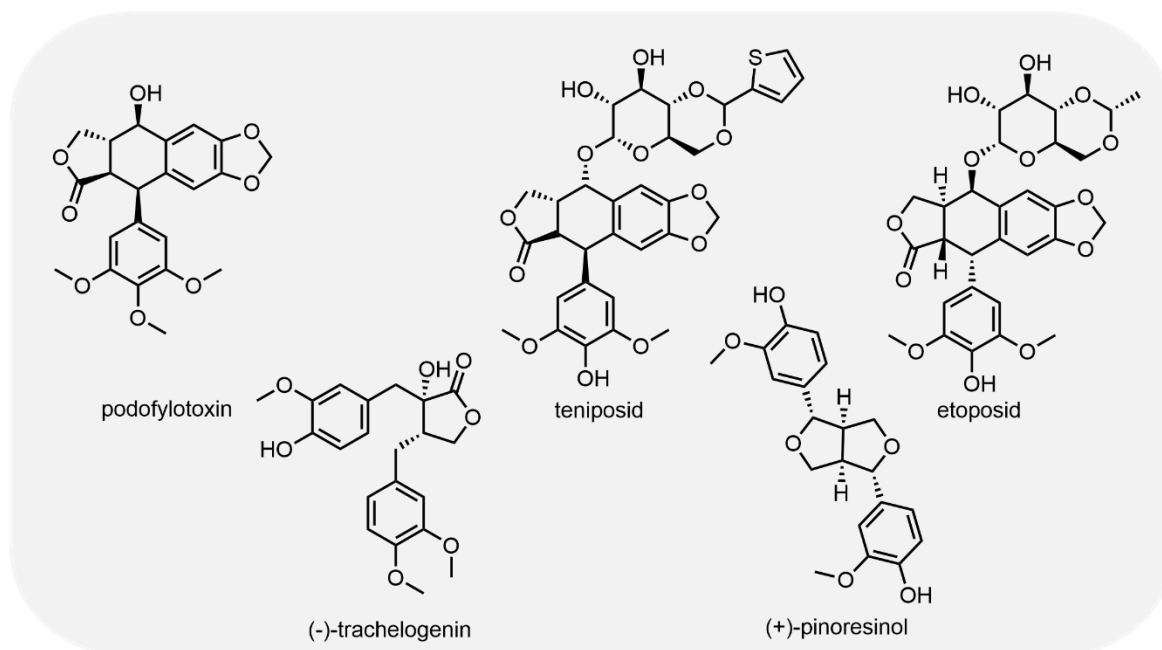


Obrázek 11. Vybrané chemické struktury lignanů zodpovědné za redukci volných radikálů.⁶⁵

2.2.1.3 Antikarcinogenní účinky

Nádorové buňky se dělí mnohonásobně rychleji než zdravé buňky. Tento fakt musí být zohledněn při jejich léčbě, např. při léčbě maligních nádorových onemocnění se obecně používá chirurgická resekce, radioterapie, chemoterapie či cílená biologická léčba. V oblasti chemoterapie v poslední době prudce vzrostl zájem o přírodní sloučeniny s cytotoxickou aktivitou či schopností blokovat buněčný cyklus.⁶⁶ Jednou z takových přirozeně se vyskytujících látek je **podofylotoxin** (*Podophyllum*) (Obrázek 12), který je schopen zastavit replikaci buněk tak, že se váže se na tubulin a naruší tak cytoskelet při buněčném dělení. Zároveň má i antivirové vlastnosti, jelikož blokuje reverzní transkriptasu. Kvůli gastrointestinální toxicitě podofylotoxinu musely být vyvinuty jeho semisyntetické deriváty – **etoposid** a **teniposid**, které nemají (resp. mají značně omezené) nežádoucí účinky.

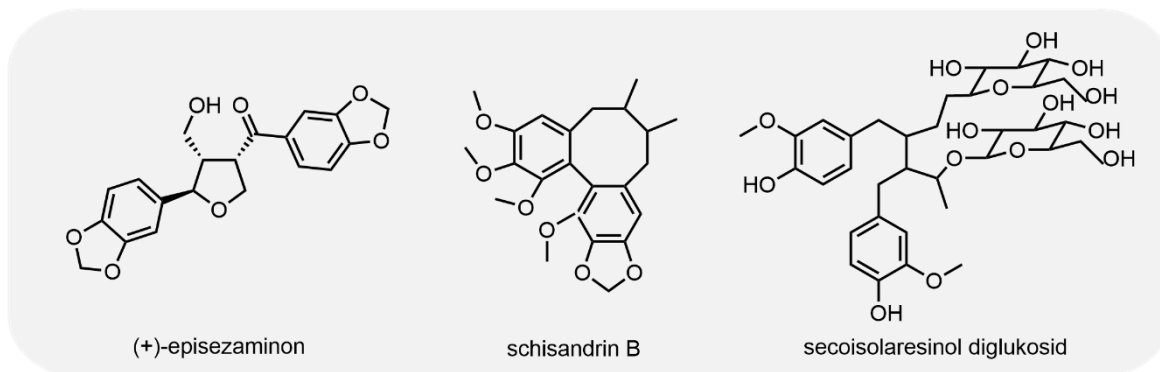
Etoposid se používá k léčbě karcinomu žaludku, vaječníku, pankreatu, různých druhů leukémie atd.⁶⁷ Další laktonový lignan, **(-)-trachelogenin**, byl prokázán jako účinná látka při autofágii nádorových buněk lidského kolorektálního karcinomu. Mezi účinky této látky patří antihypertenzní, antileukemická, chemopreventivní, antiproliferační a cytotoxická aktivita.⁶⁸ Lignan **(+)-pinoresinol** vykazuje antifungální, antibakteriální, protizánětlivou, antioxidační, hypoglykemickou a protinádorovou aktivitu. Zastavuje buněčný cyklus nádorových buněk a navodí tak jejich apoptózu. Z podrobného výzkumu vyšlo, že (+)-pinoresinol blokuje buněčné linie HepG2 hepatocelulárního karcinomu a má potenciál inhibovat invazi a migraci tumoru.⁶⁹



Obrázek 12. Chemické struktury lignanů s protinádorovými vlastnostmi.^{67–69}

2.2.1.4 Protizánětlivé účinky

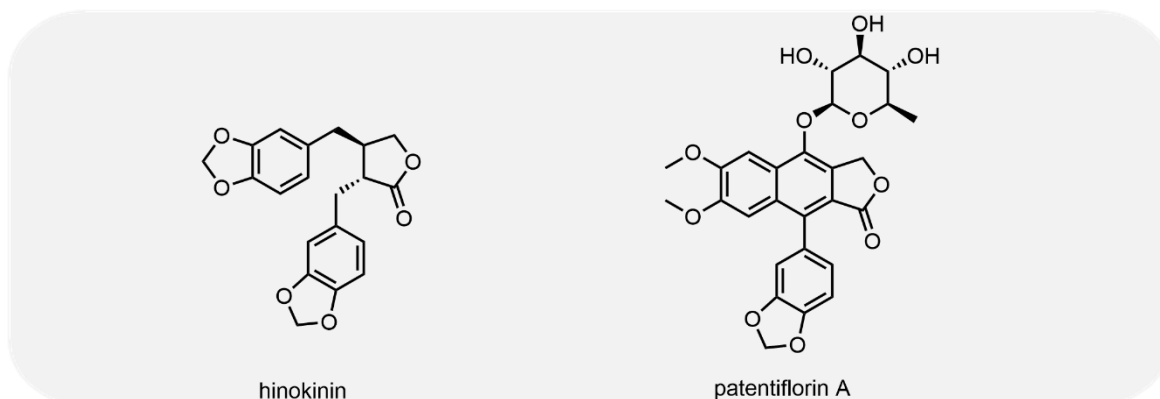
Zánětlivá reakce je obranou reakcí organismu na poškození vlastní tkáně. Při přetrvávajícím napadení, které může kontinuálně spouštět zánětlivé reakce či při autoimunitních onemocněních může docházet k rozvoji chronických zánětů s graduální obměnou tkáně. Některé lignany mají schopnost inhibovat expresi prozánětlivých molekul jako např. oxidu dusnatého, interleukinů, tumor nekrotizující faktorů, lipooxygenasy aj. **Secoisolariciresinol diglukosid** (Obrázek 13) snižuje účinky leukocytů zodpovědných za zánětlivou aktivitu tak, že přímo brání interakci zánětlivých buněk s hematoencefalickou bariérou. **Schisandrin B** a (+)-**epizesaminon** působí proti zánětům obdobně.⁵⁸



Obrázek 13. Secoisolaresinol diglukosid a (+)-episezaminon s protizánětlivou aktivitou.⁵⁸

2.2.1.5 Antibakteriální a antivirové účinky

V důsledku zneužívání a nadužívání antibakteriálních léčiv vzrůstá celosvětový problém týkající se vzniku multirezistentních kmenů. Sekundární rostlinné metabolity s bakteriocidní či bakteriostatickou aktivitou by mohly být potencionálním řešením tohoto problému. Jednou z takových látek je **hinokinin** (Obrázek 14). U této látky izolované z *Commiphora leptophloes* byly objeveny slibné antibakteriální účinky (aktivní vůči rezistentním *Staphylococcus aureus*).⁷⁰ Arylnaftelanový lignan **patentiflorin A** (syntetizovaný i přírodní, izolovaný z *Justicia gendarussa*) vykazuje aktivitu proti HIV. Antivirová aktivita je u tohoto lignanu vyšší v porovnání se standardně využívaným léčivem vůči AIDS, zidovudinem.⁷¹

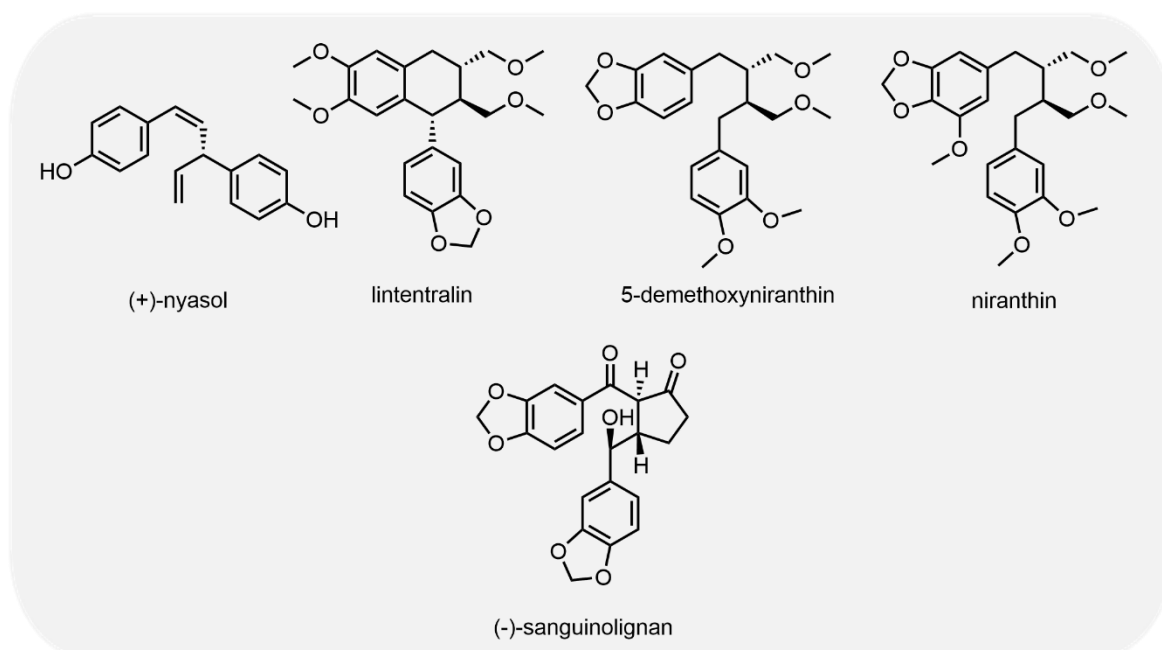


Obrázek 14. Hinokinin s antibakteriální aktivitou a patentiflorin A s virucidní aktivitou^{70,71}.

2.2.1.6 Antiprotozoální aktivita

Chagasova choroba a leishmanióza se zařazují k zanedbávaným tropickým onemocněním. Na Chagasovu chorobu způsobenou bičíkatými prvky *Trypanosoma cruzi* ročně zemře 14 000 lidí. **Lintetralin**, **5-demethoxyniranthin** a **niranthin** (Obrázek 15), které byly nejspíše izolovány z listů *Phyllanthus amarus*, byly testovány proti *T. cruzi* a *Leishmania amazonensis*. Niranthin vykazoval nízkou cytotoxicitu vůči hostitelským buňkám a zároveň vysokou antitrypanosomální aktivitu proti intracelulárním amastigotům. Lintetralin a 5-

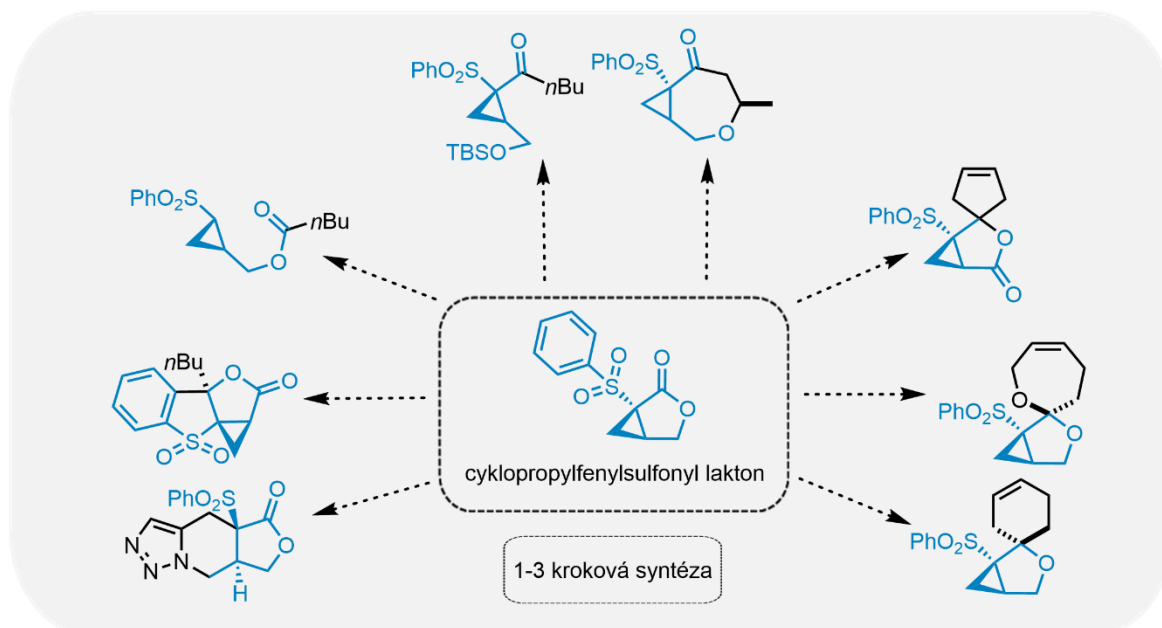
demethoxyniranthin byly účinné proti promastigotům *L. amazonensis*, avšak jejich účinnost byla mnohem vyšší u intracelulárních amastigotů. Jejich schopnost rozpouštět se v tucích je nejspíše klíčovým faktorem pro interakci látky s parazitem v hostitelské buňce. Předpokládá se, že dané lignany by mohly být účinné i na jiné druhy *Leishmanií*.⁷² U (+)-**nyasolu** byla potvrzena aktivita vůči promastigotům *Leshmania major* a zároveň střední účinek proti růstu prvoka *Plasmodium falciparum* způsobující jednu z nejzávažnějších chorob světa, malárii.⁷³ Listy rostliny *Piper sanguineispicum* obsahující (-)-**sanguinolignanem** A (SA) vykazují aktivitu proti amastigotům *L. amazonensis*. I přestože tato látka není ani zdaleka tak účinná jako amfotericin B, byla u něj objevena pozoruhodná nízká cytotoxicita vůči makrofágům a karcinogenním i zdravým buněčným liniím.⁷⁴



Obrázek 15. Chemické struktury lignanů s antiprotozoální aktivitou.⁷²⁻⁷⁴

Chemická syntéza a biologická aktivita SA byla následně zkoumána v naší výzkumné skupině. Bylo zjištěno, že klíčový skelet SA, lignano-lakton, je pravděpodobně příčinou antileishmaniální aktivity. Cílem projektu bylo, a nadále je, modifikovat tento skelet zahrnující alespoň 4 různé funkční skupiny pro vytvoření chemicky různorodé knihovny, která by umožnila popis vztahu chemické struktury a mechanismu účinku vytvořených látek. Tato knihovna by pak mohla vytvořit základ pro studium a vývoj nového antileishmaniálního terapeutika. Jako základní skelet pro tento vývoj byl vybrán **cyklopropyl fenyl sulfonyl lakton** (Obrázek 16). Tento lakton byl následně transformován na nové sloučeniny, čímž byla vytvořena knihovna první generace, která obsahovala 101

látek. Sloučeniny byly testované na promastigotech *Leishmania major* na Hebrejské Univerzitě v Izraeli a následně na buněčné linii lidských makrofázích THP-1 (zjištění cytotoxicity). Inhibiční aktivita promastigotů *L. major* byla u dvou látek vyšší než 80 %, z čehož cyklopropyl fenyl sulfonyl lakton znemožnil růst 95 % parazitům. Dalším pozoruhodným objevem bylo, že u obou látek nebyla pozorována cytotoxicita u buněk THP-1. I když tato bioaktivita není srovnatelná s amfotericinem B, tento výzkum otvírá dveře k syntéze nové knihovny chemických sloučenin.³



Obrázek 16. Příklad syntetických sloučenin připravené rozmanitě orientovanou syntézou (Diversity-Oriented synthesis, DOS).⁴

U cyklopropyl fenyl sulfonyl laktanu nebylo prozatím zjištěno, která část molekuly přesně zodpovídá za antileishmaniální aktivitu. Cílem mé práce je pokusit se strukturně modifikovat sulfonový fragment dané látky. Důvodem modifikace tohoto fragmentu je porozumět jeho aktivitě ve vztahu s parazitem a pozorovat vliv nově upravených molekul na amastigoty a hostitelské makrofágy. Bohužel z důvodu COVID-19 karantény jsem nemohla testovat tyto látky na *leishmaniích* (Izrael) a tedy jsem provedla pouze ohodnocení jejich aktivity vůči *C. elegans*. Biologické testování vůči buněčné linii MCF-7 odvozené od prsního adenokarcinomu bylo provedeno Mgr. Lucíí Rárovou, Ph. D.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Pro jednotlivé kroky byly použity tyto chemikálie: acetonitril (CH_3CN), bromoacetonitril, α -bromoethylacetátu, (2-bromomethyl)benzen, 2-bromopentan, destilovaná voda, diethylether (Et_2O), dichlormethan (CH_2Cl_2), dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol (EtOH), ethylester kyseliny octové (EtOAc), 1H-tetrazol-5-thiol-1-fenyl, hexan, deuterovaný chloroform, deuterované DMSO, jodomethan, 1-jodopropan, 2-jodopropan, kyselina jodistá (H_5IO_6), kyselina octová (AcOH), 2-merkaptobenzothiazolu (BT-SH), methanol (MeOH), methanolát sodný (MeONa), methyl bromoacetát, natrium-benzensulfínát, oxid chromový (CrO_3), peroxid vodíku (H_2O_2 50%), petrolether (P.E.), (S)-(+)-epichlorhydrin, síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), siřičitan sodný (Na_2SO_3), sodík (Na), triethylamin (Et_3N), tetrahydrát heptamolybdenan amonný ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner a Fluka. Pakliže není uvedeno jinak, veškeré látky byly použity ve stejné čistotě, v jaké byly dodány. Nasycený roztok hydroxidu sodného (NaCl), 2 M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (HCl) a suchý EtOH byly připraveny technickým personálem v Laboratoři růstových regulátorů.

3.1.1 Vizualizační roztoky pro tenkovrstvou chromatografií (TLC)

- Zásaditý roztok KMnO_4 (20 g K_2CO_3 a 9 g KMnO_4 v 150 mL 10% NaOH).
- Vanilín (2 g vanilínu v 100 mL EtOH s obsahem 1 mL koncentrované H_2SO_4).
- Hannesianův vizualizační roztok (12 g fosfomolybdenové kyseliny v 250 mL EtOH).

3.2 Pufry a média

Pro kultivaci *C. elegans* byly použity tyto pufry a média: M9 médium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 15 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), fosfátový pufr (KH_2PO_4 136 g, doplněno destilovanou vodou do 1 L, upraveno pH na 6 s použitím 5M KOH , znovu doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), stopové prvky (Na_2EDTA 1,86g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,69 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,29 g, CuSO_4 0,016 g, doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), citrátový pufr ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 268,8 g, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 26,3 g, doplněno destilovanou vodou do 900 mL, upraveno pH na 6 pomocí 5M KOH , znovu doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), S bazální reagent (NaCl 5,9 g, 50 mL nesterilní fosfátového pufru, přidáno 1 mL cholesterolu, 5mg/mL v EtOH , doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), S-complete médium (10 mL sterilního citrátového pufru, 10

mL sterilních stopových prvků, 3 mL sterilního 1M CaCl₂ a 3 mL sterilního 1 M MgSO₄), LB médium (trypton 10 g, kvasnicový extrakt 5 g, NaCl 10 g doplněno do 1 L destilované vody a autoklávováno), mrazící roztok (NaCl 5,85 g, KH₂PO₄ 6,8 g, glycerol 300 g, 5,6 mL 1M NaOH, doplněno destilovanou vodou do 1 L a autoklávováno), pufr na chitinasový test (NaOH 40 g, glycin 75 g, doplněno destilovanou vodou do 1 L a srovnáno pH na 10,6), roztok na věkovou synchronizaci *C. elegans* (8 mL destilované vody, 1,5 mL roztok NaClO a 0,5 mL 10M NaOH), médium pro růst hlístic neboli nematode growth medium (NGM), které bylo připraveno z NaCl 1,2 g, pepton 1 g, agar 7,8 g v 400 mL destilované vodě s přidávkem 400 µl cholesterolu, 5 mg·mL⁻¹ v EtOH. Celá směs byla autoklávována a po zchladnutí bylo přidáno: 200 µl 1M sterilního CaCl₂, 400 µL 1M sterilního MgSO₄ a 10 mL sterilního fosfátového pufru s pH 6. Substrát chitinasy a pozitivní kontrola jsou z firmy Merck. Zbylé látky většinou pocházejí z LachNer, ale co se týče kvasnicového extraktu, tryptonu, peptonu a agaru tak ti jsou z VWR.

3.3 Metody a materiál

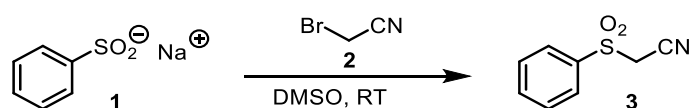
Veškeré sloučeniny byly navažovány analytickými vahami AS 220.R2. Magnetická míchačka s ohřevem Meidolph MR 3001 K byla používána pro průběh chemických reakcí, kdy pro kontrolu průběhu reakcí a sledování orientační čistoty meziproductů i productů byla použita TLC na hliníkových vrstvách pokrytých silikagelem 60 SIL G/UV 254 s fluorescenčním indikátorem od výrobce Machery-Nagel či Sigma-Aldrich. Kolonovou chromatografií na silikagelu 34 od výrobce Sigma-Aldrich (velikost částic 230-400 mech, velikost pórů 60 Å) byly purifikovány finální produkty. Eluované frakce byly kontrolovány pomocí TLC a frakce se stejným obsahem byly zahuštěny na rotační vakuové odparce (RVO) Interface I-300 Büchi. Poté byla změřena jejich spektra pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). NMR byla provedena analýza zařízením Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz, které je výkonné při frekvenci 500 MHz (¹H) a 125 MHz (¹³C). Pro měření probíhající za laboratorní teploty (RT) byly použity deuterovaná rozpouštědla chloroformu. Chemické posuny (δ) pro deuterovaný chloroform byly kalibrovány na: ¹H – 7,27 ppm a ¹³C – 77,23 ppm. Protonové interakce jsou uváděny jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t), triplet tripletu (tt), pentet (p) a multiplet (m). Na inertní standard anebo signál reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla byla provedena kalibrace δ. Chromatogram byl získán pomocí kapalinového chromatografu (LC) Agilent 1290 Infinity II s UV-VIS detektorem a hmotnostním detektorem (MS) Agilent InfinityLab LC/MS. Pro přečištění productů byla použita kolona s reverzní fází Agilent 5Prep-C18 10x21.2 mm, kdy 1 mg

produktu byl rozpuštěn v 1 mL 1% MeOH. Rozpouštědlo bylo tvořeno (A) vodou a (B) MeOH. Byl využíván gradient – 10% MeOH (0 minut), 90% MeOH (10-12 minut), 10% MeOH (12,5-13 minut) při průtoku 20 mL/min. Kvartérní pumpa měla průtok 0,5 mL/min (mobilní fáze - 15mM mravenčnan amonný : MeOH 50 %). Hmotnostní spektra byla získána hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HRMS) Agilent 6230 Time-of-Flight s iontovým zdrojem Dual AJS ESI, nebulizátor: 35 psi, teplota odpařujícího plynu: 350 °C, teplota a rychlost desolvačního plynu: 260 °C a 11 L/min, napětí na kapiláře a kuželové napětí: 3500 V a 300 V. Byl nastaven režim úplného skenování (100-1700 m/z). Celkové vyhodnocení bylo provedeno softwarem MassHunter. Přístroj B-540 Büchi byl využíván pro měření bodu tání (b.t.). Polarimetrem Pol A Ar 3001 byla měřena optická otáčivost při vlnové délce 589 nm rozpuštěním 10 mg připravené látky v 1 mL rozpouštědla (chloroformu anebo CH₂Cl₂).

3.4 Organická syntéza

3.4.1 Cílená syntéza cyklopropylfenylsulfonfyl laktonu

3.4.1.1 2-(Fenylsulfonfyl)acetonitril (3)



Sodná sůl benzensulfinátu **1** (5 g; 30,5 nmol; 1,2 equiv) byla rozpuštěna v DMSO (50,8 mL; 0,5 M vůči bromoacetonitrilu **2**) za RT. Po dvou minutách byl roztok ochlazen na 0 °C (voda/led) a za 5 minut byl přidán **2** (3 g; 25,4 mmol; 1 equiv). Po 30 minutách míchání směsi byla oddělena lázeň a roztok byl míchán po dobu 2 hodin při RT. Ke směsi byla přidána destilovaná voda (50 mL) a celá směs byla extrahována pomocí Et₂O (3x 150 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (150 mL). Organická fáze byla sušena nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zahuštěna na RVO. Výsledkem reakce byl sněhobílý produkt **3** (4,6 g; 99%).

b.t. = 110-112 °C

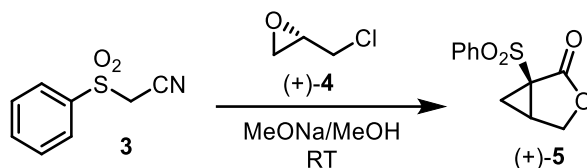
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.02 (dt, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 1H), 7.67 – 7.59 (m, 1H), 4.13 (s, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 136.77, 135.58, 129.95, 128.95, 110.68, 45.86

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 182 [M+H]⁺ (100)

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₈H₈NO₂S [M+H]⁺: 182.0270, nalezeno 182.0270

3.4.1.2 Cyklopropylfenylsulfonyl lakton (+)-5



Pro rozpuštění **3** (4,6 g; 25,3 mmol; 1 equiv) v MeOH (114 mL) byl přidán MeONa (34,3 mL; 25 % v MeOH; 6,1 equiv) za RT. Po 30 minutách při RT byl přidán (*S*)-(+)-epichlorohydrin (+)-**4** (2,6 g; 27,8 mmol; 1,1 equiv). Směs byla míchaná po dobu 24 hodin při RT. Na RVO byl odpařen MeOH. Směs byla zředěna destilovanou vodou (114 mL), okyselena pomocí ledové AcOH na pH 4 a míchána dalších 24 hodin. Poté byla provedena extrakce celé reakční směsi pomocí CH₂Cl₂ (3x120 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným NaCl (120 mL), sušeny nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrovány a zahuštěny na RVO. Hnědá olejovitá kapalina byla extrahována krystalizací v chlazeném MeOH (50 mL), směs byla následně vložena pod ultrazvuk a uložena do lednice přes noc. Z reakční směsi vykryštoval produkt a byl odsát. Zbytek směsi byl odpařen a čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂; P.E.: EtOAc = 10:1 → 4:1 → 2:1). Spojené přečištěné fáze dali vznik produktu ve formě bílých krystalů látky (*1R*)-1-(phenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (+)-**5** (1,2 g; 20 %).

b.t. = 113-115 °C

$\alpha_D^{25} = +90,3$ (c 1.00, CHCl₃)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 1.46 (1 H, dd, *J* = 5.4, 5.4 Hz), 2.19 (1 H, dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz), 3.18 (1 H, ddd, *J* = 4.8, 5.4, 8.7 Hz), 4.19 (1 H, d, *J* = 9.7 Hz), 4.40 (1 H, dd, *J* = 4.8, 9.7 Hz), 7.60 (2 H, dd, *J* = 7.3, 7.8 Hz), 7.71 (1 H, dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz), 8.07 (2 H, d, *J* = 7.3 Hz)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 19.32, 26.62, 45.93, 66.90, 128.84, 129.06, 134.27, 138.06, 167.65

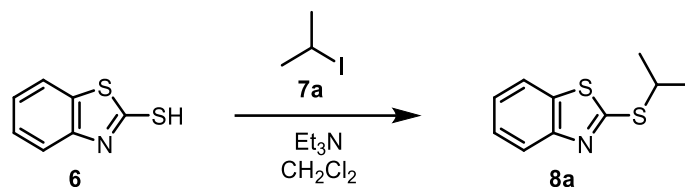
MS (ESI⁺), *m/z* (%): 238 (M⁺)

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₁H₁₀O₄S 238.0300, nalezeno 238.0299

3.4.2 Příprava alkyl sulfonů

3.4.2.1 Alkylace heteroarylthiolů **6** a **9**

3.4.2.1.1 2-(isopropylthio)benzo[d]thiazol (**8a**)



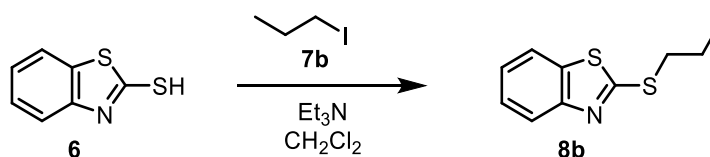
Do roztoku BT-SH **6** (1,4 g; 8,37 mmol; 1 equiv) v CH_2Cl_2 (16,7 mL; 8,37 mmol; 1 equiv) ochlazeném na 0 °C (voda/led) byl přidán Et_3N (3,49 mL; 25,1 mmol; 3 equiv) a následně po kapkách v průběhu 5 minut 2-jodopropan **7a** (1,7 g; 10 mmol; 1,2 equiv) rozpuštěný v CH_2Cl_2 (2 mL). Výsledná reakční směs byla ponechána míchat po dobu 24 hodin při RT a následně rozředěna pomocí CH_2Cl_2 (100 mL). Poté byla promyta 2M aq. HCl (1x50 ml), nasyceným roztokem NaCl (50 ml), sušena nad Na_2SO_4 , zfiltrována, odpařena na RVO, čímž poskytla surový produkt **8a** (1,75 g; 99%).

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.82 – 7.72 (m, 1H), 7.43 (ddd, $J = 8.3, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.31 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.1$ Hz, 1H), 4.10 (p, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.52 (d, $J = 6.8$ Hz, 7H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.83, 153.50, 135.44, 126.22, 124.48, 121.79, 121.14, 39.73, 23.50

MS (ESI⁺), m/z (%): 210 [M+H]⁺

3.4.2.1.2 2-(propylthio)benzo[d]thiazol (**8b**)



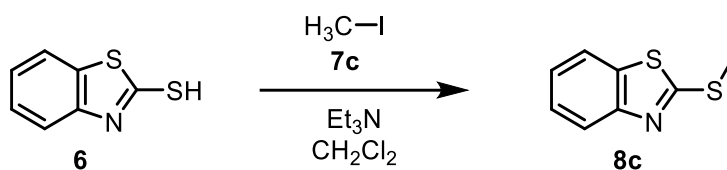
Do roztoku BT-SH **6** (5 g; 29,9 mmol; 1 equiv) v CH_2Cl_2 (100 mL) ochlazeném na 0 °C (voda/led) byl přidán Et_3N (12,5 mL; 89,7 mmol; 3 equiv) a následně po kapkách v průběhu 5 minut 1-jodopropan **7b** (6,1 g; 35,9 mmol; 1,2 equiv) rozpuštěný v CH_2Cl_2 (5 mL). Výsledná reakční směs byla ponechána míchat po dobu 24 hodin při RT a následně rozředěna pomocí CH_2Cl_2 (100 mL). Poté byla promyta 2M aq. HCl (50mL), nasyceným roztokem NaCl (50 ml), sušena nad Na_2SO_4 , zfiltrována a odpařena na RVO. Ze směsi byl izolován surový produkt **8b** (5,4 g; 99%).

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.88 (dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H), 7.78 – 7.74 (m, 1H), 7.42 (ddt, $J = 8.2, 7.2, 1.0$ Hz, 1H), 7.30 (ddt, $J = 8.1, 7.4, 0.9$ Hz, 1H), 3.40 – 3.30 (m, 2H), 1.87 (h, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 167.61, 153.54, 135.34, 126.21, 124.32, 124.26, 121.64, 121.11, 121.05, 35.74, 22.89, 13.59.

MS (ESI⁺), m/z (%): 210 [M+H]⁺

3.4.2.1.3 2-(methylthio)benzo[d]thiazol (**8c**)



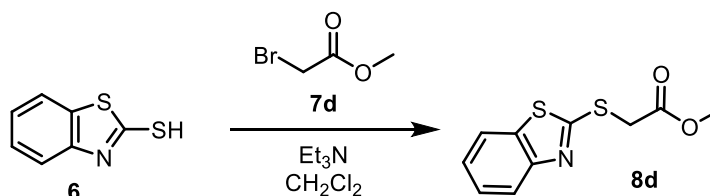
Do roztoku BT-SH **6** (11.2 g, 66.9 mmol, 1 equiv) v CH_2Cl_2 (134 mL) ochlazeném na 0 °C (voda/led) byl přidán Et_3N (27.9 mL, 201 mmol, 3 equiv) a následně po kapkách v průběhu 5 minut jodomethan **7c** (11.4 g, 80.3 mmol, 1.2 equiv) rozpuštěný v CH_2Cl_2 (5 mL). Výsledná reakční směs byla ponechána míchat po dobu 24 hodin při RT a následně rozředěna pomocí CH_2Cl_2 (100 mL). Poté byla promyta 2M aq. HCl (100mL), nasyceným roztokem NaCl (100 ml), sušena nad Na_2SO_4 , zfiltrována přes fritu a odpařena na RVO. Ze směsi byl izolován surový produkt **8c** (9.6 g, 99%).

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.92 – 7.86 (m, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 1H), 7.43 (ddd, $J = 8.3, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 2.81 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 168.31, 153.57, 135.35, 126.28, 124.31, 121.60, 121.18, 16.15

MS (ESI⁺), m/z (%): 182 [M+H]⁺

3.4.2.1.4 Methyl 2-(benzothiazol-2-ylthio)acetát (**8d**)



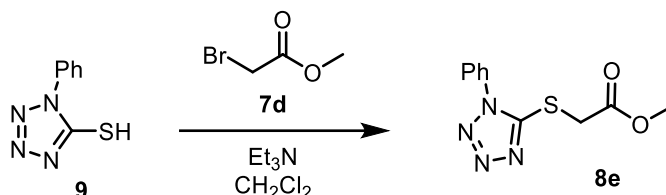
BT-SH **6** (5 g; 29,9 mmol; 1 equiv) byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 (52,3 mL). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led). Byl do něj přidán methyl bromoacetát **7d** (4,6 g; 29,9 mmol; 1 equiv) a po 3 minutách byl přidán Et_3N (8,31 mL; 59,8 mmol; 2 equiv). Po 5 minutách byla odstraněna vodní lázeň a směs byla míchána 48 hodin při RT. Ke směsi bylo přidána HCl

(50 ml, 2 M) a vodní vrstva byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x50 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (50 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány přes Celite® a odpařeny do sucha na RVO. Odparek poskytl surový sulfid **8d** (5 g; 70%).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 3.79 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 7.30 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H)

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 240 [M+H]⁺

3.4.2.1.5 Methyl 2-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio)acetate (**8e**)

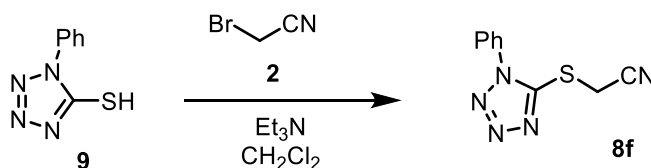


Tetrazol **9** (5 g; 16,7 mmol; 1 equiv) byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (139 mL). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a byl do něj přidán methyl bromoester **7d** (2,64 mL; 16,7 mmol; 1 equiv) a po 3 minutách byl přidán Et₃N (7,72 mL; 33,3 mmol; 2 equiv). Po 5 minutách byla odstraněna vodní lázeň a směs byla míchána 4 dny při RT. Směs byla rozředěna pomocí CH₂Cl₂ (100 mL) a následně promyta pomocí 2,0 M aq. HCl (80 mL). Vodní vrstva byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x80 mL) a spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (80 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrány a odpařeny do sucha na RVO, čímž došlo k izolaci surového produktu **8e** (3,42 g; 49%).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.58 (m, 5H), 4.19 (s, 2H), 3.75 (s, 3H)

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 251 [M+H]⁺

3.4.2.1.6 2-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)thio)acetonitril (**8f**)



Tetrazol **9** (3 g; 16,7 mmol; 1 equiv) byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (83 mL). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a byl do něj přidán methyl bromoacetonitril **7d** (2,1 g; 16,7 mmol; 1 equiv) a po 3 minutách byl přidán Et₃N (4,63 mL; 33,3 mmol; 2 equiv). Po 5 minutách byla odstraněna vodní lázeň a směs byla míchána 4 dny při RT. Směs byla rozředěna pomocí CH₂Cl₂ (100 mL) a následně promyta pomocí 2.0 M aq. HCl (80 mL). Vodní vrstva byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (3x80 mL) a spojené organické fáze byly promyty nasyceným

roztokem NaCl (80 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrvány a odpařeny do sucha na RVO, čímž došlo k izolaci surového produktu **8f** (3,42 g; 95%).

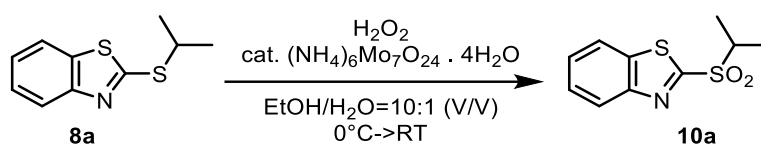
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.61 (ddd, *J* = 4.6, 3.5, 2.1 Hz, 3H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 4.24 (s, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 151.27, 133.09, 131.00, 130.38, 123.87, 114.89, 18.61

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 218 [M+H]⁺ (45%)

3.4.2.2 Oxidace sulfidů **6** a **9** na sulfony **10**

3.4.2.2.1 2-(Isopropylsulfonyl)benzothiazol (**10a**)



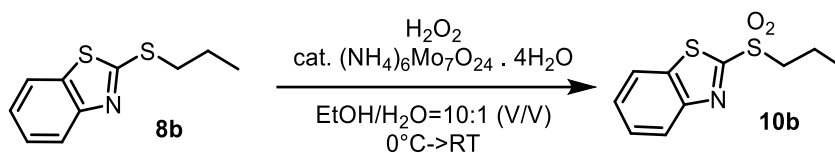
Do roztoku **8a** (1,75 g; 8,36 mmol; 1 equiv) v EtOH (33,4 mL), který byl ochlazen na 0 °C (voda/led), byl postupně přidán roztok (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O (2,1 g; 1,67 mmol; 0,2 equiv) v H₂O₂ (4,74 ml; 50% vodný roztok; 83,6 mmol; 10 equiv). Výsledná směs s oranžovým zákalem byla míchána při RT po dobu 24 hodin. Roztok byl nalit do směsi EtOAc (50 mL) H₂O (50 mL) a výsledný bifázový systém byl rozdělen. Vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3x50 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (50 ml), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrvány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (P.E. : EtOAc = 10:1 → 4:1 → 2:1), čímž se získal produkt **10a** (0,5 g; 25 %) jako viskózní olej.

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.36 – 8.18 (m, 0H), 8.12 – 7.98 (m, 0H), 7.63 (dddd, *J* = 22.3, 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 0H), 3.76 (p, *J* = 6.9 Hz, 0H), 1.49 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 164.99, 153.18, 137.16, 128.18, 127.83, 125.76, 122.49, 55.63, 15.60.

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 242 [M+H]⁺

3.4.2.2.2 2-(Propylsulfonyl)benzothiazol (**10b**)



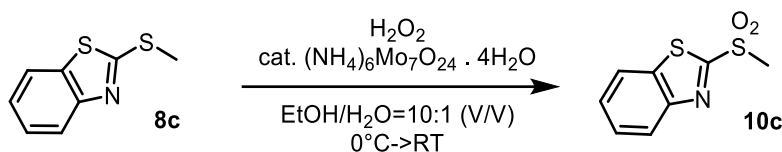
Do roztoku sulfidu **8b** (5,4 g; 25,8 mmol; 1 equiv) v EtOH (103 mL), který byl ochlazen na 0 °C (voda/led), byl postupně přidán roztok $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (6,4 g; 5,16 mmol; 0,2 equiv) v H_2O_2 (14,6 mL; 50% vodný roztok; 258 mmol; 10 equiv). Výsledná směs byla míchána při RT po dobu 24 hodin. Roztok byl nalit do směsi EtOAc (100 mL) s H_2O (100 mL) a výsledný bifázový systém byl rozdělen. Vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3x100 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (100 ml), sušeny nad Na_2SO_4 , zfiltrvány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (P.E. : EtOAc = 10:1 → 4:1), čímž se získal produkt **10b** (3,4 g; 51 %) jako viskózní olej.

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.24 (ddd, $J = 8.2, 1.3, 0.7$ Hz, 1H), 8.03 (ddd, $J = 8.0, 1.4, 0.7$ Hz, 1H), 7.66 (ddd, $J = 8.3, 7.2, 1.4$ Hz, 1H), 7.61 (ddd, $J = 8.4, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 3.53 – 3.48 (m, 2H), 1.99 – 1.85 (m, 2H), 1.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.13, 152.99, 145.14, 128.24, 127.88, 125.70, 122.57, 56.59, 16.48, 13.19.

MS (ESI⁺), m/z (%): 242 [M+H]⁺

3.4.2.2.3 2-(Methylsulfonyl)benzothiazol (**10c**)



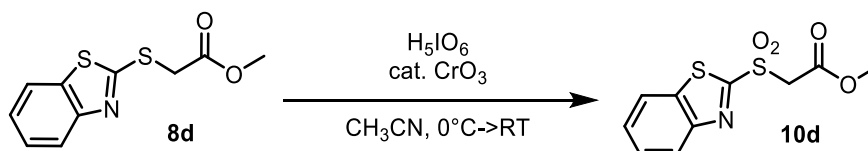
Do roztoku sulfidu **8c** (9,6 g; 53 mmol; 1 equiv) v EtOH (212 mL), který byl ochlazen na 0 °C (voda/led), byl postupně přidán roztok $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (13,2 g; 10,6 mmol; 0,2 equiv) v H_2O_2 (30 mL; 50% vodný roztok; 10 equiv). Výsledná směs byla míchána při RT po dobu 24 hodin. Roztok byl nalit do směsi EtOAc (200 mL) H_2O (200 mL) a výsledný bifázový systém byl rozdělen. Vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3x200 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl (200 ml), sušeny nad Na_2SO_4 , zfiltrvány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (CH_2Cl_2 : EtOAc = 2:1), čímž se produkt **10c** (7,2 g; 64%) jako viskózní olej.

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.26 – 8.20 (m, 1H), 8.04 (dt, $J = 8.0, 0.8$ Hz, 1H), 7.70 – 7.65 (m, 1H), 7.65 – 7.59 (m, 1H), 3.43 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 165.54, 156.56, 141.86, 128.33, 127.95, 125.65, 122.61, 42.65

MS (ESI⁺), m/z (%): 214 [M+H]⁺

3.4.2.2.4 Methyl 2-(benzothiazol-2-ylsulfonyl)acetát (**10d**)



Do roztoku CH₃CN (52,2 mL) byl za RT přidán sulfid **8d** (5 g; 20,9 mmol; 1 equiv) a H₅IO₆ (14,3 g; 62,7 mmol; 3 equiv). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a ke směsi byl přidán CrO₃ (0,63 g; 6,27 mmol; 0.3). Po 30 minutách byla oddělaná lázeň a směs byla míchána po dobu 24 hodin při RT. Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a ke směsi byl přidán nasycený roztok Na₂SO₃ (52 mL). Vzniklá černá kapalina byla zfiltrována přes Celite[®] a vzniklý roztok byl extrahován pomocí EtOAc (5x50 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (50 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny na RVO, což poskytlo produkt **10d** (4,4 g; 76%) jako žlutou krystalickou látku.

b.t. = 68-70 °C

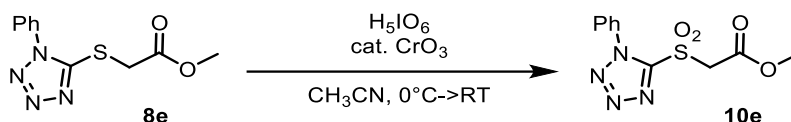
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.35 – 8.17 (m, 1H), 8.11 – 8.00 (m, 1H), 7.65 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.4$ Hz, 1H), 7.61 (dtd, $J = 10.6, 7.2, 1.5$ Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.74 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 164.95, 162.25, 152.55, 137.13, 128.43, 127.92, 125.72, 122.53, 77.48, 77.16, 76.85, 58.66, 53.53.

MS (ESI⁺), m/z (%) 272 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺) m/z : [M + H]⁺ spočítáno pro C₁₀H₁₀NO₄S₂ 272.0046; nalezeno 272.0043

3.4.2.2.5 Methyl 2-((1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)acetate (**10e**)



Do roztoku CH₃CN (35 mL) byl při RT přidán sulfid **8e** (3,4 g; 15,7 mmol; 1 equiv) a H₅IO₆ (10,8 g; 47,2 mmol; 3 equiv). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a ke směsi byl přidán CrO₃ (0,5 g; 4,72 mmol; 0,3 equiv). Po 30 minutách byla oddělaná lázeň a oranžový roztok byl míchán po dobu 48 hodin při RT. Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a byl ke směsi přidán nasycený vodný roztok Na₂SO₃ (35 mL). Vzniklá reakční směs byla zfiltrována přes Celite® a vzniklý roztok byl extrahován pomocí EtOAc (5x35 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny na RVO, což poskytlo surový reakční produkt **10e**, který byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (P.E. : EtOAc = 10:1 → 4:1 → 2:1), a poskytli žádaný produkt **10e** (0,5 g; 13%).

b.t. = 66-67 °C

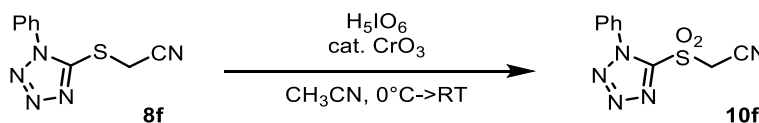
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.95–7.51 (m, 5H), 4.69 (s, 2H), 3.75 (s, 3H)

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 161.6, 153.2, 132.8, 131.6, 129.6, 125.5, 59.2, 53.6

MS (ESI⁺), *m/z* (%) 283 [M+H]⁺

HRMS (ESI⁺) *m/z*: [M + Na]⁺ spočítáno pro C₁₀H₁₀N₄NaO₄S: 305.0320; nalezeno 305.0317

3.4.2.2.6 2-[(1-Fenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl]acetonitril (**10f**)



Do roztoku CH₃CN (35 mL) byl při RT přidán sulfid **8f** (3,42 g; 15,7 mmol; 1 equiv) a H₅IO₆ (10,8 g; 47,2 mmol; 3 equiv). Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a ke směsi byl přidán CrO₃ (0,5 g; 4,72 mmol; 0,3 equiv). Po 30 minutách byla oddělaná lázeň a oranžový roztok byl míchán po dobu 48 hodin při RT. Roztok byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a byl ke směsi přidán nasycený vodný roztok Na₂SO₃ (35 mL). Vzniklá reakční směs byla zfiltrována přes Celite® a vzniklý roztok byl extrahován pomocí EtOAc (5x35 mL). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny na RVO, což poskytlo surový reakční produkt **10e**, který byl purifikován pomocí

sloupcové chromatografie na silikagelu (P.E. : EtOAc = 10:1 → 4:1 → 2:1), a poskytl žádaný produkt **10f** (0,5 g; 13%).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 7.83 – 7.47 (m, 5H), 4.81 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 147.84, 132.16, 130.17, 129.92, 124.95, 115.20, 45.89.

MS (ESI⁺), m/z (%) 250 [M+H]⁺

3.5 Biologické testy

3.5.1 Životaschopnost lidských buněčných linií

Buněčné biotesty byly provedeny Mgr. Lucií Rárovou, Ph.D. Pro stanovení cytotoxicity vybraných připravených látek a vlivu životaschopnosti lidských nádorových buněk byly použity buněčné linie prsního adenokarcinomu MCF-7. Nejdříve byla provedena kultivace buněk v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) doplněném o 10% fetální sérum, 2 mM L-glutamin, streptomycin 100 µg/ml a penicilin 100 IU/mL v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Buňky byly vysázeny podle standardního protokolu do 96-jamkové desky o koncentraci 5000 buněk/jamka. Druhého dne byly testované látky přidány do jamek vždy v triplikátu v odlišných koncentracích, přičemž nejvyšší koncentrace činila 50 mM. Po 72 hodinách byl do jamek aplikován roztok resazurinu (10 µL), desky byly následně inkubovány po dobu 3 hodin. Poté měla být změřena fluorescence přístrojem Tecan (excitace: 544 nm, emise: 590 nm). Hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC₅₀) by byla vyhodnoceny v programu Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie). Z důvodu kontaminace buněčných linií hodnoty fluorescence a hodnoty stanovení IC₅₀ nebyly získány.

3.5.2 Anthelmintická aktivita

Ke stanovení anthelmintické aktivity byla využita wild-type linie *C. elegans* N2. Červi byli pěstováni na Petriho miskách s NGM osázenými bakteriemi *Escherichia coli* OP50 připravené z LB média za standardních kultivačních podmínek. *C. elegans* i *E. coli* byly zakoupeny od Caenorhabditis genetic center (Minnesota, USA). Práce převážně probíhala ve flowboxu (aura HZ 72 T – BioAir). Nejprve byly připraveny bakterie v LB médiu. Do sterilní baňky s LB médiem byly kličkou přidány z LB misky bakterie. Baňka s inokulovaným médiem byla třepána na třepáče (IKA KS 260 basic) a zároveň kultivována v inkubátoru (Schoeller) při 37 °C přes noc. Teplé tekuté NGM médium bylo pipetou nanášeno na Petriho misky (60 mm a 100 mm) a po ztuhnutí média byly na misky nanášeny

E. coli v LB médiu, jež byly kultivovány ve 37 °C přes noc. Z udržovací misky s červy byl vyříznut čtverec NGM, který byl přenesen na čerstvou misku obsaženou bakteriemi. Následně byla připravena bakteriální suspenze v S-complete. Do zkumavky zvážené váhou AND byla přenesena bakteriální suspenze a stočena na centrifuze (Holm&Halby). Po odstranění supernatantu byly stěny zkumavky dvakrát omyty S basálním činidlem. Ze zkumavek byla odebrána přebytečná tekutina. Mokřý pelet byl rozsuspendován v S-complete médiu, aby výsledná koncentrace suspenze činila 60 mg bakterií/mL. Populace *C. elegans* byla smyta pipetorem (Swiftpet) z misky pomocí 2 mL M9 média a přenesena do mikrozkušavek, jež byly stočeny mikrocentrifugou (Labnet) zhruba na 10 sekund. Po odstranění supernatantu byl přidán 1 mL roztoku na věkovou synchronizaci, poté byly mikrozkušavky s hlísty třepány na termoshakeru (Mixing Block MB-102) při otáčkách 15000 rpm a RT tak dlouho, dokud nedošlo k rozpuštění červů s výjimkou vajíček. Zhruba po 10 minutách byly vzorky stočené na 15 sekund. Supernatant byl odebrán a pelet s vajíčky byl 3x promyt 1 mL M9 média a 1x 1 mL S-complete médiem. Mikrozkušavky byly centrifugovány a pelet s vajíčky byl přenesen pomocí 5 mL S-complete média do 15 mL zkumavky. Červi byli umístěni do inkubátoru na třepačku při 150 rpm, 20 °C, na 24 hodin.

Počet čerstvě vylíhnutých larev hlístů byl spočítán na 1 mL. Do roztoku S-complete média s larvami byly přidány bakterie *E. coli* kultivované v LB médiu o koncentraci 60 mg·mL⁻¹. Výsledná koncentrace média obsahující hlísty a bakterie činila 3 mg·mL⁻¹. Daný roztok byl napipetován multikanálovou pipetou (Transferpette S-12) do 96 jamkové desky tak, aby každá jamka byla obsažena 15-30 červy. Testování vybraných látek bylo provedeno ve dvou koncentracích, a to 50 μmol·L⁻¹ a 5 μmol·L⁻¹. Ve stejných objemech jako testovaných látek byla použita pozitivní kontrola ivermektinu (1 μmol·L⁻¹ a 0,1 μmol·L⁻¹) a negativní kontrola DMSO (0,1 % a 0,01 %). Jednotlivé jamky obsahovaly 100 μL finální suspenze. Deska byla zajištěna folií a byla inkubována na třepačce při 150 rpm, 20 °C, po dobu 3 dní. Deska byla pozorována v mikroskopu (Leica) a každé jamce bylo přiděleno skóre – mrtví, zastavení vývoje, zpomalení vývoje, mírně zpomalené/méně potomstva a v pořádku. Následoval chitinasový test. Deska byla stočena při 1500 rpm na 2 minuty, aby se zbavilo kondenzace na folii. Do jednotlivých jamek bylo přidáno 2,5 μL roztoku 4-metylbelliferyl β-D-N, N', N''- triacetylchitotriosidu o koncentraci 0,8 mmol·L⁻¹. Deska byla inkubována na 1 hodinu při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byl přidán pufr pro chitinasový test o objemu 50 μL. Fluorescence desky byla měřena přístrojem Tecan – excitace: 360 nm a emise: 460 nm.

4. Výsledky

4.1 Cílená modifikace sulfonové části cyklopropyl laktonu

4.1.1 Příprava dosud nepřipraveného enantiomeru látky **5**

Mým prvním cílem bylo (znovu) připravit laktonový bicyklus **5**, ale v jeho opačném antipodu (Schéma 1). Tedy moje syntéza bicyklu **5** se od těch provedených Mgr. Danielou Konrádovou, Ph.D. a Bc. Terezou Golkovou lišila absolutní konfigurací na C₂ a C₄ atomech uhlíku u (+)-**5**. Celkově tato dvoukroková syntéza vyústila v tvorbu (+)-**5** ve 20% výtěžku.

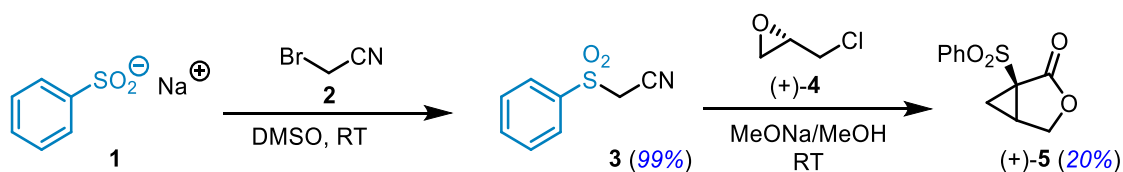


Schéma 1. Příprava cyklopropyl laktonu ve dvou krocích s 20 % výtěžkem.

4.1.2 Modifikace sulfonové části u látky **5**

Hlavním cílem mé práce bylo vyvinout metodu a následně pomocí ní připravit modifikované struktury bicyklolaktonu v oblasti fenylsulfonové části. Hlavním cílem zde bylo připravit alkylsulfonem substituované bicyklolaktony **11** a heterocyklem substituované bicyklolaktony **12** (Obrázek 17).



Obrázek 17. Plánované modifikace na bicyklo laktonovém kruhu – znázornění modifikované části.

4.1.3 Syntéza alkyl substituovaných bicyklolaktonů **11**

Plánovaná syntéza alkyl substituovaných sulfonových derivátů **11** měla být dosažena v 5 krocích z alkyl halidu **7** a BT-SH **6** (Schéma 2). Příprava byla založena na modifikaci látky **7** na odpovídající sulfon **10**, který by byl podroben redukcí mediovanou NaBH₄, která by dala za vznik sulfinové soli **13**. Tato sůl by reagovala s bromoacetonitrilem **2**, který by pak v bazicky mediované cyklizaci s epichlorhydrinem poskytl žádaný bicyklolakton **11**.

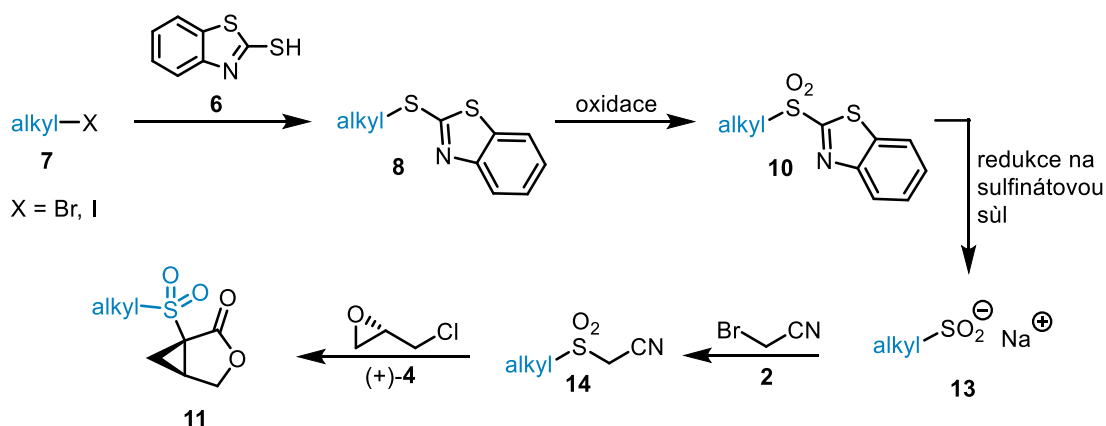


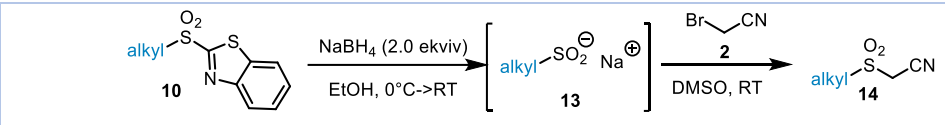
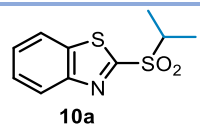
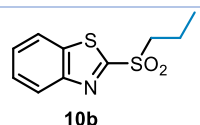
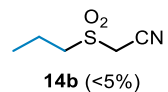
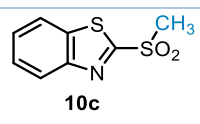
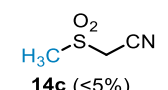
Schéma 2. Syntetické schéma vedoucí k alkyl sulfonyl bicyklo-laktonu.

Započala jsme syntézou alkyl benzothiazol-sulfidů **8** (Tabulka 2). Substituce se povedla u alkyl jodidů **7a-c** (řádek 1-3), ale nikoliv u alkyl bromidů (**7d** a **e**, řádek 4 a 5). Následná oxidace připravených sulfidů **8a-c** pak poskytla očekávaný sulfon. Bohužel jejich dvoukroková transformace na odpovídající kyano derivát **14** vhodný pro následnou cyklizační laktonizaci naprosto selhala (Tabulka 3). Z dosažených výsledků je nejednoznačné, který ze dvou kroků transformace nefungoval.

Tabulka 2. Příprava alkyl sulfonů vhodných pro následnou přípravu

Řádek			
1	 7a	 8a (99%)	 10a (25%)
2	 7b	 8b (99%)	 10b (51%)
3	 7c	 8c (99%)	 10c (64%)
4	 7d	 8g (<5%)	—
5	 7e	 8h (<5%)	—

Tabulka 3. Transformace alkyl benzothiazoyl sulfonů **10** na cyklizační prekurzory **14**

			
	Sulfon (10)	Sulfoniová sůl (13)	Cyklizační prekurzor 14
1	 10a	degradace	–
2	 10b	Nejednoznačné ¹ H NMR spektra	 14b (<5%)
3	 10c	Nejednoznačné ¹ H NMR spektra	 14c (<5%)

4.1.4 Syntéza heteroaryl substrátů

Syntéza heterocyklem substituovaných laktonů byla založena na tříkrokové syntéze (Schéma 3). Jako modelové sloučeniny byl vybrán BT-SH **6** a fenyltetrazol **9**. Jejich transformace na odpovídající cyklizační prekurzor **14** anebo **15** probíhala přes odpovídající sulfid, a poskytla cílové látky v akceptovatelných výtěžcích. Bohužel následná cyklizace za standardních podmínek (Schéma 5) nevedla ke žádoucímu výsledku. Ve všech případech došlo pouze k degradaci výchozích látek.

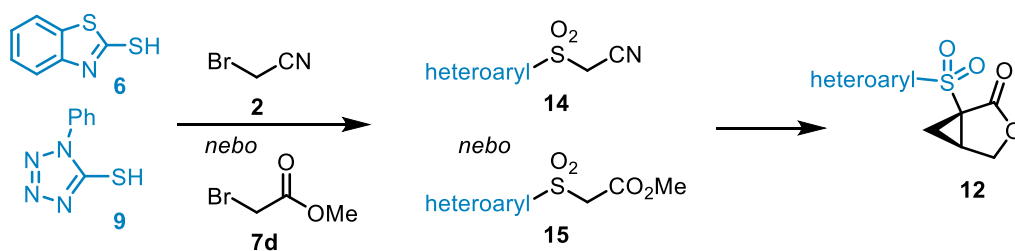


Schéma 3. Syntetické schéma vedoucí k heteroaryl sulfonyl bicyklolaktonu **12**.

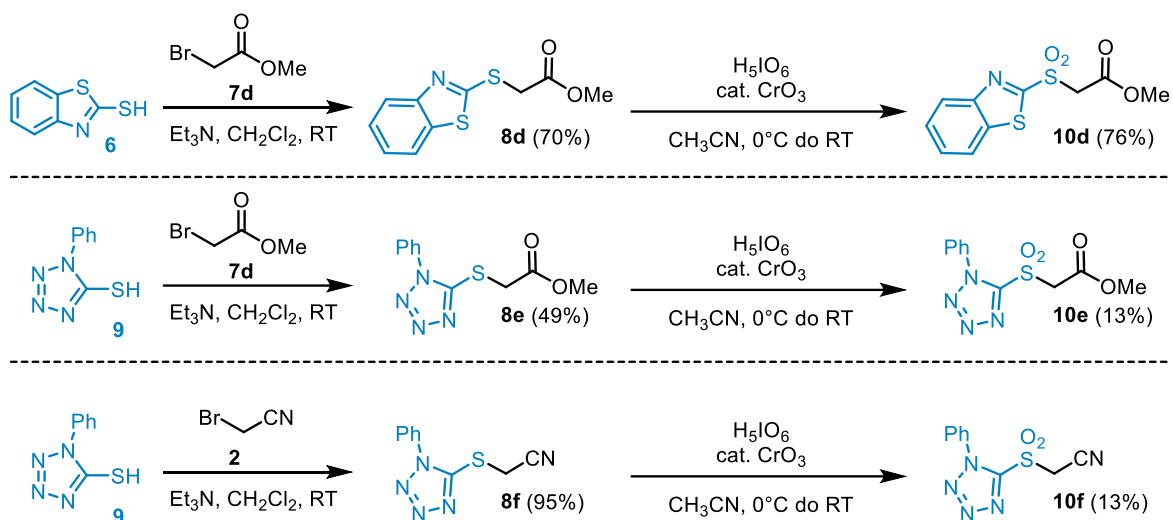


Schéma 4. Příprava cyklizačních prekurzorů **10d-f**.

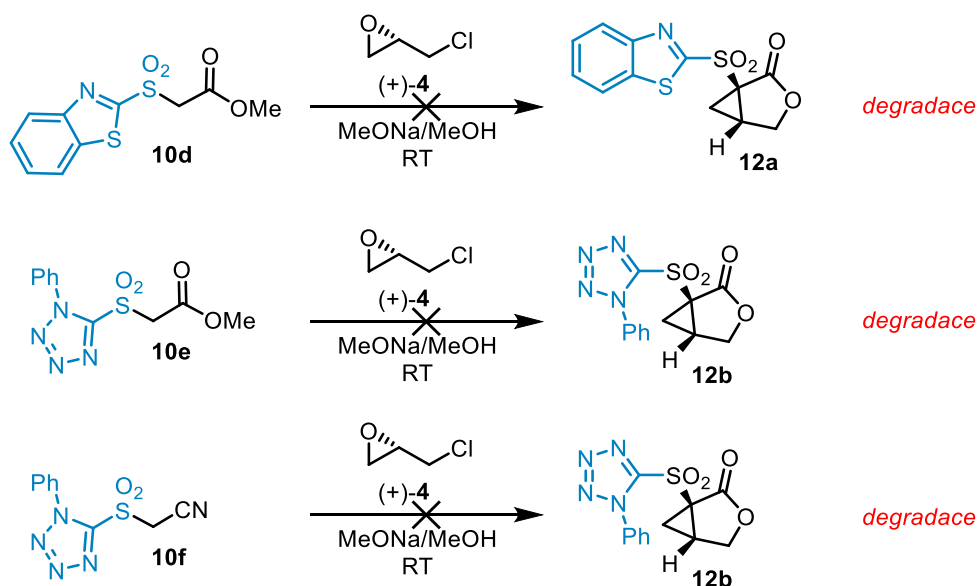


Schéma 5. Pokoušená cyklizace prekurzorů **10d-f** na cílové laktony **12a,b**.

4.2 Anthelmintická aktivita

Z důvodu neúspěšných syntéz, které nevedly k tvorbě požadovaných finálních produktů **11** a **12** byly na testování chitinasové aktivity na *C. elegans* použity pouze připravené meziproducty **10a-c** (Schéma 6).

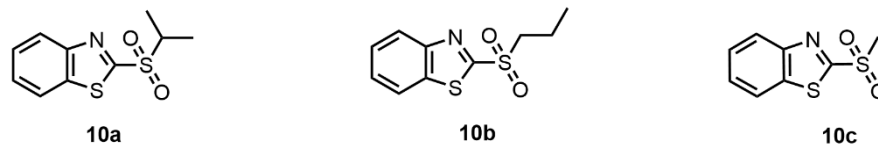
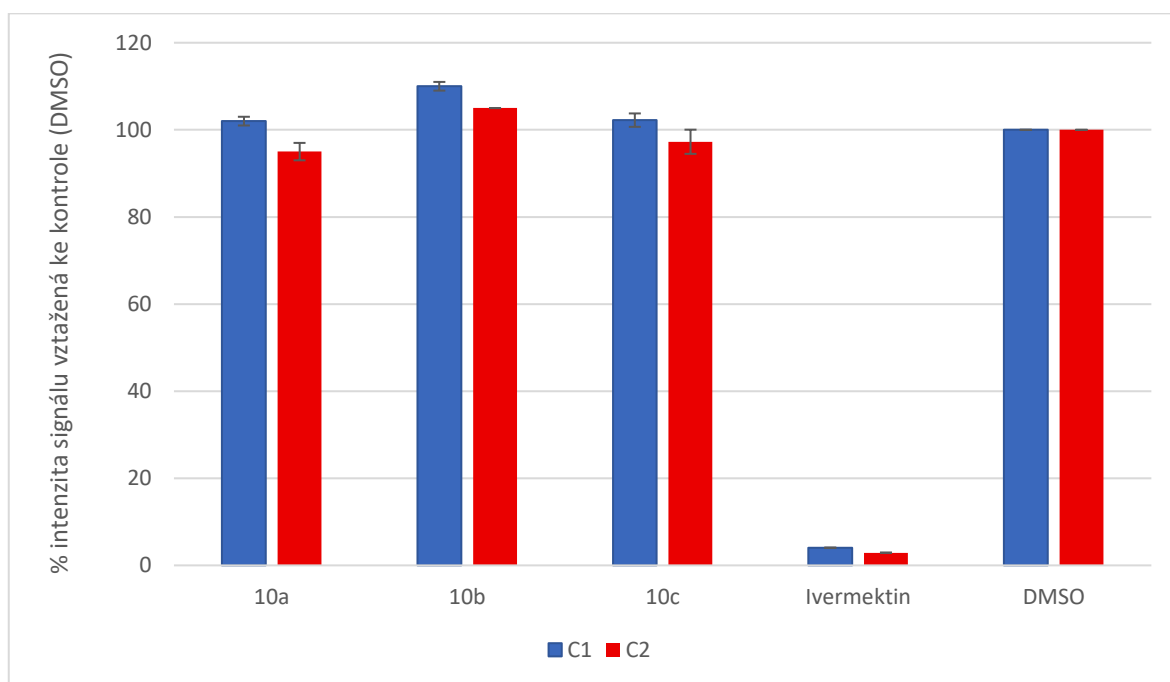


Schéma 6. Chemické struktury použitých meziproductů na chitinasové biotesty na *C. elegans* – 10a-c.

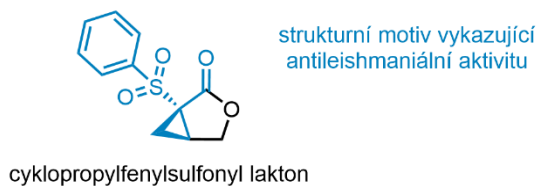


Graf 1. Chitinasová aktivita v *C. elegans* – určena pomocí procentuální intenzity signálu, jež byla vztažena k negativní kontrole, 100 % DMSO. Vzorčky 10a-c byly testovány ve dvou koncentracích: C1 = 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a C2 = 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Koncentrace pozitivní kontroly ivermektinu činila pro C1 = 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro C2 = 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jednotlivé hodnoty byly zprůměrovány ze tří opakování. Chybové úsečky značí střední chybu průměru.

Biotesty na *C. elegans* byly zaměřeny na chitinasovou aktivitu. Zdraví a množící se červi produkují chitinasu, kdežto mrtví a nemocní červi nikoli. Při tomto testu se využívá chitinasa pro měření reprodukční kapacity hlístů. Připravené látky (**10a-c**) byly testovány ve dvou koncentracích 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Ani u jedné z látek nebyl zaznamenán pokles signálu chitinasové aktivity (Graf 1). Toxický efekt a snížená produkce nebyla zaznamenána ani při vizuálním hodnocení v mikroskopu.

5. Diskuse

Cílem bakalářské práce bylo připravit deriváty sloučeniny cyklopropyl fenyl sulfonyl laktonu. Tuto látku ve své disertační práci připravila Mgr. Daniela Konrádová, Ph.D. a použila ji jako základní skelet pro syntézu dalších 101 sloučenin. Zjistila, že daný lignan a některé jeho deriváty disponovaly značnou účinností proti *Leishmaniím*. V pozorování vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou došla k závěru, že fenylsulfonyl fragment a laktonový kruh jsou příčinou slibných biologicky aktivních vlastností (Obrázek 18).



Obrázek 18. Struktura modifikovaného lignanu.

Tato práce klade důraz na pozměnění právě sulfonové skupiny proto, aby bylo možné zjistit, jak se tato část skeletu podílí na svých biologických vlastnostech. Účelem bylo připravit sedm látek lišících se zmíněným fragmentem a následně tyto látky ohodnotit na biotestech. Jelikož nám dočasná situace ovlivněná pandemií SARS-CoV-2 nehrála do karet, nebylo bohužel možné provést v Izraeli testování na parazitálních *Leishmaniích*, které měly být předmětem našeho zkoumání. Kvůli tomuto důvodu se vybrané látky testovaly pouze na *C. elegans* a buněčných liniích MCF-7 odvozených od lidského adenokarcinomu. A ve druhém případě, testování na buňkách, došlo z důvodu COVID-19 k dalším dvěma nepříjemnostem: (1) z důvodu restrikcí jsem nemohla testovat vzorky sama (zamezen přístup na katedru LRR), a (2) došlo k několika na sobě navazujícím kontaminacím buněčných kultur v laboratoři Mgr. Lucie Rárové, Ph.D., které znemožnili vyhodnotit testy na mých látkách.

5.1 Organická syntéza

Experimentální práce byla založena na dvou odlišných organických syntézách, při kterých měly vzniknout nové laktonové deriváty substituované na sulfonu buďto alkylem (látky **11a-e**) anebo heteroarylem (látky **12a,b**) (Obrázek 19). Bohužel se ukázalo, že v případě struktur **11** navržená syntéza (5-ti kroková) má několik úskalí. Nejprve jsme zjistili, že hned první krok, a to substituce benzothiazoylthiolu pomocí alkyl halidů není tak obecná, jak by se mohlo zdát, a že pokud nejsou využity alkyl jodidy, tak nedochází k substituci (Tabulka 2). Z mých pozorování vyplývá, že reakce běžely v pořádku, pokud byla odstupující skupina řádně aktivována (jodid) anebo pokud bylo elektrofilní centrum na alkyl bromidu dodatečně

aktivováno (přítomnost elektron akceptorní skupiny). V případě alkyl bromidů **7d** a **e** s velkou pravděpodobností v reakční směsi dochází k neočekávané vedlejší reakci, eliminaci (Schéma 7). Této vedlejší reakci, která se z důvodu pomalejší reaktivity vůči sulfidu **6** stává hlavní, by se dalo obejít pouhou změnou báze z Et₃N na např. diethylisopropylamin (DIPEA). To však nebylo v mé práci vyzkoušeno, neboť při paralelně prováděných reakcích jsem zjistila, že stejně nejsem schopna připravit touto cestou (Schéma 2) žádoucí prekurzory k látkám **11**.

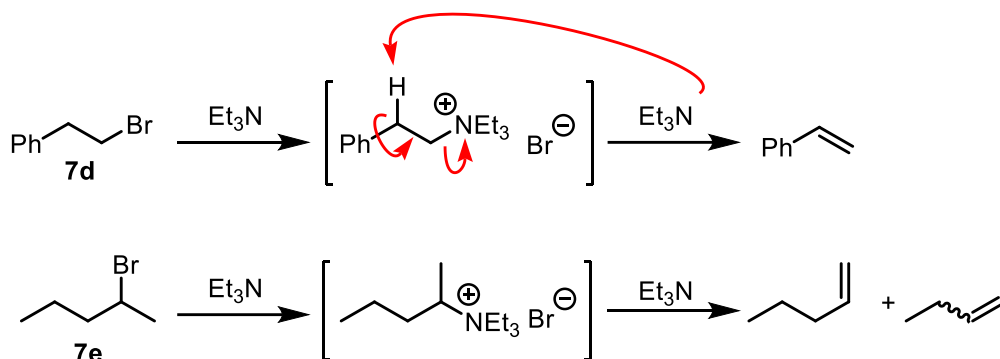
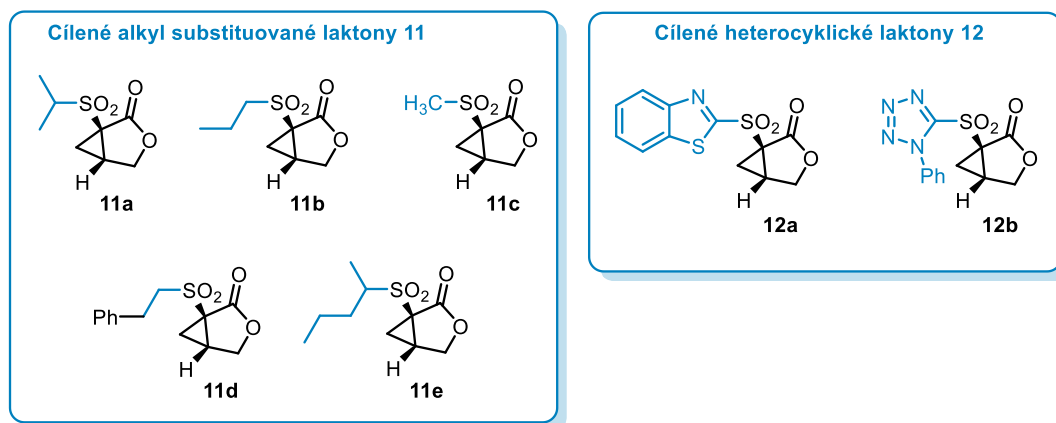


Schéma 7. Možné vedlejší reakce, jež jsou přítomny při reakci alkyl bromidů **7d** a **e**.

Druhou nevýhodou, pakliže pominu nízkovýtěžnou oxidaci sulfidů **10a-c**, která by se dala zvýšit použitím jiných vhodnějších oxidačních podmínek (např. *m*CPBA,⁷⁵ nebo H₅IO₆/CrO₃ systém⁷⁶) (Tabulka 3), jsme zjistili, že publikovaná metoda přípravy sulfinových solí **13** je nereprodukovatelná⁷⁷ (a to ani na modelových substrátech – nezahrnuto v mé práci). V tomto okamžiku není naprosto jasné, kde se při mé reprodukci objevila chyba a tento postup bude muset být ještě přezkoumán v budoucnu.



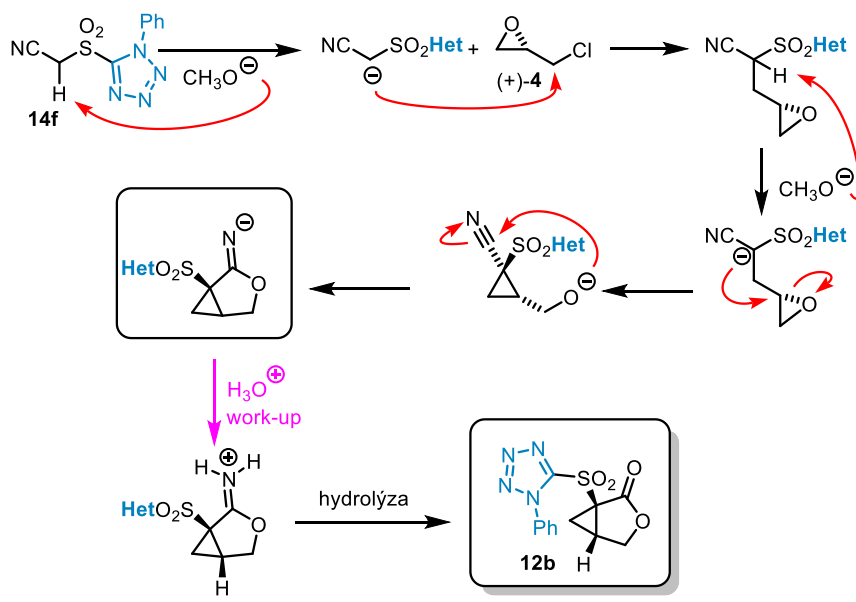
Obrázek 19. Cílené finální laktony **11** a **12**.

Následně jsem se zaměřila na přípravu heterocyklických laktonů **12** (Schéma 3). Tato syntéza byla založena na tříkrokové přípravě laktonového kruhu, která transformovala heteroaryl sulfid **6** a **9** na odpovídající estery, resp. kyano sloučeniny **10d-f** (Schéma 4).

Nejprve se tedy transformoval thiol na sulfid a následně byl sulfid oxidován pomocí $\text{H}_5\text{IO}_6/\text{cat. CrO}_3$ systému⁷⁶ na odpovídající sulfon **10**. Reakce probíhaly v dobrých anebo akceptovatelných výtěžcích a jejich optimalizace nebyla prozatím zkoumána, protože jsme nejprve chtěli vědět, jestli finální cyklizace bude fungovat.

Pro vlastní cyklizaci nezáleží na tom, jestli bude reagovat odpovídající ester **10d,e** anebo nitril **10f** (Schéma 8). V obou případech totiž jako hlavní produkt reakce bude izolována látka **12**. Bohužel se ukázalo, že v mém případě nedochází ke vzniku produktu ani v jednom případě. V reakční směsi byly vždy detekovány pouze produkty degradace výchozích látek (na základě ^1H NMR analýzy surové reakční směsi).

A - tvorba laktonu 12b z kyano derivátu 14f



B - tvorba laktonu 12 z odpovídajících esterů 14d,e

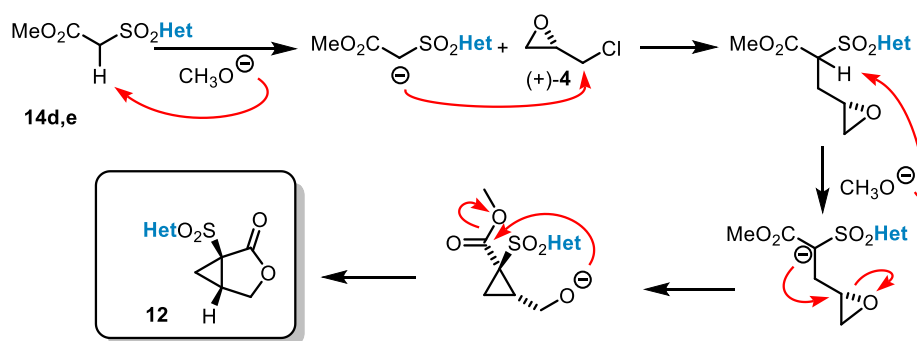


Schéma 8. Cyklizace sulfonů **10** s nitrilovou funkční skupinou (A) a esterovou funkční skupinou (B).

Na základě těchto pozorování se domníváme, že s velkou pravděpodobností dochází v reakční směsi k degradaci výchozí látky **10** anebo jednoho z intermediátů díky přítomnosti

methanolátu sodného (Schéma 9). Tato teorie musí být ještě potvrzena následujícími experimenty.

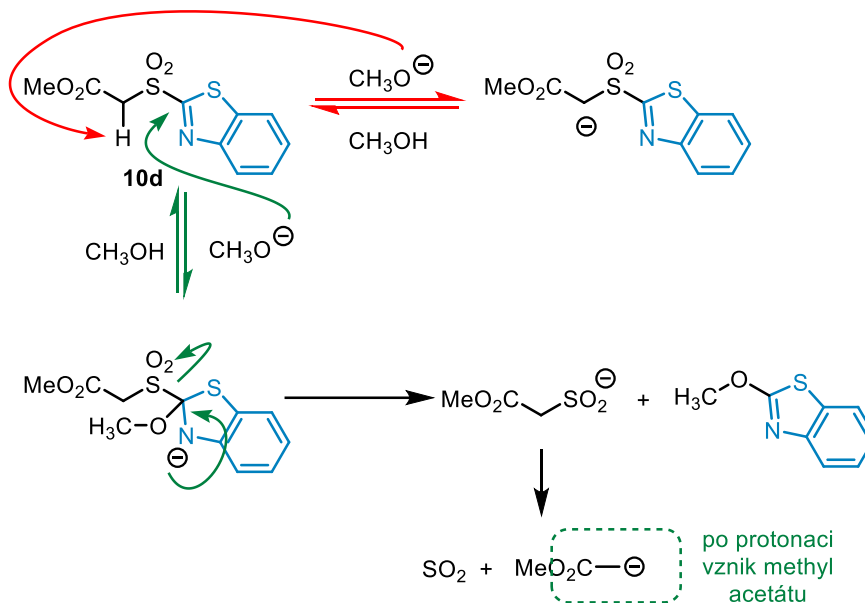


Schéma 9. Předpokládané vedlejší reakce, jež pravděpodobně degradují výchozí sulfony (anebo intermediáty reakce, kde interakce na obdobném principu budou hrát stejnou roli).

5.2 Biologické testování

Chitinasový biotest je založen na detekci signálu enzymu chitinasy, který produkují embrya parazitů *C. elegans* do kultivačního média. Reprodukční potenciál populace hlístů se dá určit pomocí fluorogenního substrátu enzymu (4-methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriosid), přičemž malý signál značí narušení produkce potomstva a zároveň i mortalitu či narušení vývoje hlístů.⁷⁸ Žádná z vybraných látek **10a-c** ani při vyšší koncentraci nevykazovala anthelmintickou aktivitu na *C. elegans*. Zajímavé je, že procentuální intenzita signálu u sloučeniny **10b** při koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ byla vyšší v porovnání s negativní kontrolou 100 % DMSO. O něco nižší signál v porovnání s negativní kontrolou lze zaznamenat u látek **10a** a **10c** při koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, bohužel účinnost byla velmi zanedbatelná, a proto tyto sloučeniny nemá cenu dále vyvíjet s ohledem na jejich anthelmintickou aktivitu.

6. Závěr

V předložené bakalářské práci je stručně popsána problematika týkající se komplexu parazitárních onemocnění, zvané leishmaniózy. Byl zde kladen důraz na souhrn informací, co se původce, přenašeče, mechanismu účinku a soudobé léčbě týče. Zároveň literatura byla zaměřena na sekundární rostlinné metabolity, a to především na lignany a neolignany jako tzv. potenciální léčiva proti leishmaniózám a byl popsán jejich vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou. Experimentální část navazovala na disertační práci Mgr. Daniely Konrádové, Ph. D., která připravila lignan cyklopropyl laktonu, jež vykazoval značnou antileishmaniální toxicitu a nebyl toxický na testovaných hostitelských buňkách. Cílem této práce bylo modifikovat skelet zmíněné látky, a to na sulfonovém fragmentu. Z důvodu dosavadní pandemie (SARS-CoV-2) nebylo možné provést biologické testování na *leishmaniích*, a proto jsem v laboratoři Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D. provedla otestování některých připravených látek na *C. elegans*. Další naplánované testování na buněčných liniích MCF-7 odvozených od prsního adenokarcinomu bohužel muselo být také zrušeno, neboť v laboratoři Mgr. Lucie Rárové, Ph.D. došlo ke kontaminaci buněk, a tak nebylo možné získané výsledky, jakkoliv interpretovat, resp. vyhodnotit.

Moje práce ukázala, že vybraným směrem (syntéza) nelze dané laktony modifikovat. Zároveň i odhalila, že syntetický přístup (než námi vybraný) musí být zvolen k přípravě látek se sulfonyl laktonovým skeletem s alkylovým anebo heteroarylovým skeletem na necyklické části sulfonu. Z pohledu struktury a jejich modifikací, tento typ modifikace je více než žádoucí a měl by být podrobněji zkoumán.

7. Použitá literatura

- (1) Sneader, W. The Discovery of Aspirin: A Reappraisal. *BMJ* **2000**, *321* (7276), 1591–1594. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7276.1591>.
- (2) Kolbe, H. Ueber Synthese Der Salicylsäure. *Ann. der Chemie und Pharm.* **1860**, *113* (1), 125–127. <https://doi.org/10.1002/jlac.18601130120>.
- (3) Konrádová, D. Biological Applications of Secondary Plant Metabolites of Phenyl Propanoid Origins, Palacký University Olomouc, 2019.
- (4) Konrádová, D.; Bon, D. J.-Y. D.; Pospíšil, J. 1-(Phenylsulfonyl)-3-Oxabicyclo[3.1.0]Hexan-2-One as a Building Block in Organic Synthesis. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (19), 12229–12238. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01625>.
- (5) Bruschi, F.; Gradoni, L. *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*; Bruschi, F., Gradoni, L., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>.
- (6) World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2010**, No. 949.
- (7) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet.* 2018, pp 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- (8) Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host–Pathogen Interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9* (8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>.
- (9) Bekhit, A. A.; El-Agroudy, E.; Helmy, A.; Ibrahim, T. M.; Shavandi, A.; Bekhit, A. E. D. A. Leishmania Treatment and Prevention: Natural and Synthesized Drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022>.
- (10) Cuvillier, A.; Miranda, J. C.; Ambit, A.; Barral, A.; Merlin, G. Abortive Infection of *Lutzomyia Longipalpis* Insect Vectors by Aflagellated LdARL-3A-Q70L Overexpressing *Leishmania Amazonensis* Parasites. *Cell. Microbiol.* **2003**, *5* (10), 717–728. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x>.
- (11) Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. Leishmaniasis: A Review. *F1000Research* **2017**, *6* (F1000 Faculty Rev), 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>.

- (12) Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C. Leishmaniasis and Poverty. *Trends Parasitol.* **2006**, 22 (12), 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>.
- (13) Pace, D. Leishmaniasis. *J. Infect.* **2014**, 69 Suppl 1 (S1), S10-8. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>.
- (14) World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2012**, No. 971, ix–xi, 1–119, 2 p following 119.
- (15) Santé, O. mondiale de la; Organization, W. H. Global Leishmaniasis Surveillance, 2017–2018, and First Report on 5 Additional Indicators. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **2020**, 95 (25), 265–280.
- (16) Steverding, D. The History of Leishmaniasis. *Parasites and Vectors.* 2017, pp 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
- (17) Cox, F. E. G. History of Human Parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, 15 (4), 595–612. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.4.595-612.2002>.
- (18) Sen Gupta, B. C. History of Kala-Azar in India. *Indian J. Med. Res.* **1947**, 123 (3), 281–286.
- (19) Okwor, I.; Uzonna, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, 94 (3), 489–493. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>.
- (20) Rijal, S.; Koirala, S.; Van der Stuyft, P.; Boelaert, M. The Economic Burden of Visceral Leishmaniasis for Households in Nepal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 100 (9), 838–841. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.09.017>.
- (21) Wagstaff, A. Poverty and Health Sector Inequalities. *Bull. World Health Organ.* **2002**, 80 (2), 97–105.
- (22) MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine Sandflies and the Spreading of Leishmaniases and Other Diseases of Public Health Concern. *Med. Vet. Entomol.* **2013**, 27 (2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>.
- (23) Ready, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, 58 (1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811->

153557.

- (24) Antoniou, M.; Gramiccia, M.; Molina, R.; Dvorak, V.; Volf, P. The Role of Indigenous Phlebotomine Sandflies and Mammals in the Spreading of Leishmaniasis Agents in the Mediterranean Region. *Eurosurveillance* **2013**, *18* (30), 20540. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20540>.
- (25) Lukes, J.; Mauricio, I. L.; Schönian, G.; Dujardin, J.-C.; Soteriadou, K.; Dedet, J.-P.; Kuhls, K.; Tintaya, K. W. Q.; Jirků, M.; Chocholová, E.; Haralambous, C.; Pratlong, F.; Oborník, M.; Horák, A.; Ayala, F. J.; Miles, M. A. Evolutionary and Geographical History of the *Leishmania* Donovanii Complex with a Revision of Current Taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (22), 9375–9380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>.
- (26) Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10* (3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- (27) Killick-Kendrick, W. P. and R. The Leishmaniases in Biology and Medicine, Vol. 1. Biology and Epidemiology. *Parasitology* **1988**, *96* (3), 642–642. <https://doi.org/10.1017/S0031182000080264>.
- (28) Antinori, S.; Schifanella, L.; Corbellino, M. Leishmaniasis: New Insights from an Old and Neglected Disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31* (2), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0>.
- (29) Bates, P. A. Transmission of *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Phlebotomine Sand Flies. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37* (10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.
- (30) Rogers, M. E.; Chance, M. L.; Bates, P. A. The Role of Promastigote Secretory Gel in the Origin and Transmission of the Infective Stage of *Leishmania mexicana* by the Sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* **2002**, *124* (5), 495–507. <https://doi.org/10.1017/S0031182002001439>.
- (31) Handman, E. Cell Biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* **1999**, *44*, 1–39. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60229-8](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60229-8).

- (32) Killick-Kendrick, R. The Life-Cycle of *Leishmania* in the Sandfly with Special Reference to the Form Infective to the Vertebrate Host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **1990**, *65* (SUPPL. 1), 37–42. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>.
- (33) Rasmusson, B.; Descoteaux, A. Contribution of Electron and Confocal Microscopy in the Study of *Leishmania*-Macrophage Interactions. *Microsc. Microanal.* **2004**, *10* (5), 656–661. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040851>.
- (34) Liu, D.; Uzonna, J. E. The Early Interaction of *Leishmania* with Macrophages and Dendritic Cells and Its Influence on the Host Immune Response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2* (83), 83. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>.
- (35) Colmenares, M.; Kar, S.; Goldsmith-Pestana, K.; McMahon-Pratt, D. Mechanisms of Pathogenesis: Differences amongst *Leishmania* Species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96* (Suppl 1), S3-7. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90044-1](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90044-1).
- (36) Fikre, H.; Mohammed, R.; Atinafu, S.; van Griensven, J.; Diro, E. Clinical Features and Treatment Response of Cutaneous Leishmaniasis in North-West Ethiopia. *Trop. Med. Int. Heal.* **2017**, *22* (10), 1293–1301. <https://doi.org/10.1111/tmi.12928>.
- (37) Goto, H.; Lauletta Lindoso, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26* (2), 293–307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>.
- (38) World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. Pierre Buffet and Gloria Morizot, Pasteur Institute, France, Lama Jalouk, consultant, Syrian Arab Republic and Mourad Mokni, consultant, Tunisia. Battereddin Annajar, Ministry of Health, provided comments and insight. T. *Manual for Case Management of Cutaneous Leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region*; 2014.
- (39) David, C. V.; Craft, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatol. Ther.* **2009**, *22* (6), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>.
- (40) Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral Leishmaniasis: What Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control? *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>.
- (41) Kumar, R.; Nylén, S. Immunobiology of Visceral Leishmaniasis. *Front. Immunol.*

- 2012**, 3 (AUG), 251. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>.
- (42) Badaro, R.; Jones, T. C.; Carvalho, E. M.; Sampaio, D.; Reed, S. G.; Barral, A.; Teixeira, R.; Johnson, W. D. New Perspectives on a Subclinical Form of Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **1986**, 154 (6), 1003–1011. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.6.1003>.
- (43) Blum, J. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis among Travellers. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 53 (2), 158–166. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh058>.
- (44) Chakravarty, J.; Sundar, S. Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, 20 (10), 1251–1265. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>.
- (45) Bhattacharya, S. K.; Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Engel, J.; Sindermann, H.; Junge, K.; Karbwang, J.; Bryceson, A. D. M.; Berman, J. D. Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38 (2), 217–221. <https://doi.org/10.1086/380638>.
- (46) Pospíšil, J.; Konrádová, D.; Strnad, M. Antileishmanial Activity of Lignans, Neolignans, and Other Plant Phenols. In *Progress in the chemistry of organic natural products*; Springer International Publishing, 2021; Vol. 115, pp 115–176. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64853-4_3.
- (47) Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M. H.; Bahadar, K. Role of Secondary Metabolites in Plant Defense against Pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, 124, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>.
- (48) Steglich, W.; Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; 2007; Vol. 46, pp 8113–8114. <https://doi.org/10.1002/9780470988558>.
- (49) Winkel-Shirley, B. Evidence for Enzyme Complexes in the Phenylpropanoid and Flavonoid Pathways. *Physiol. Plant.* **1999**, 107 (1), 142–149. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100119.x>.
- (50) Maeda, H.; Dudareva, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* **2012**, 63, 73–105.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>.

- (51) B. Weisshaar, G. I. J. Phenylpropanoid Biosynthesis and Its Regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, *1* (3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(98\)80113-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(98)80113-1).
- (52) Vanholme, B.; El Houari, I.; Boerjan, W. Bioactivity: Phenylpropanoids' Best Kept Secret. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.012>.
- (53) Park, S. Y.; Yang, D.; Ha, S. H.; Lee, S. Y. Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Natural Compounds. *Adv. Biosyst.* **2018**, *2* (1), 1700190. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700190>.
- (54) Umezawa, T. Diversity in Lignan Biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2003**, *2* (3), 371–390. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32>.
- (55) Teponno, R. B.; Kusari, S.; Spitteller, M. Recent Advances in Research on Lignans and Neolignans. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (9), 1044–1092. <https://doi.org/10.1039/C6NP00021E>.
- (56) Zhang J, Chen J, Liang Z, Z. C. New Lignans and Their Biological Activities. *Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *11* (1), 1–54. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100433>. PMID: 24443425.
- (57) Adlercreutz, H. Lignans and Human Health. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2007**, *44* (5–6), 483–525. <https://doi.org/10.1080/10408360701612942>.
- (58) Zálešák, F.; Bon, D. J.-Y. D.; Pospíšil, J. Lignans and Neolignans: Plant Secondary Metabolites as a Reservoir of Biologically Active Substances. *Pharmacol. Res.* **2019**, *146*, 104284. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.
- (59) Fang, C.-Y.; Chen, S.-J.; Wu, H.-N.; Ping, Y.-H.; Lin, C.-Y.; Shiu, D.; Chen, C.-L.; Lee, Y.-R.; Huang, K.-J. Honokiol, a Lignan Biphenol Derived from the Magnolia Tree, Inhibits Dengue Virus Type 2 Infection. *Viruses* **2015**, *7* (9), 4894–4910. <https://doi.org/10.3390/v7092852>.
- (60) Kantham, S.; Chan, S.; Mccoll, G.; Miles, J. A.; Veliyath, S. K.; Deora, G. S.; Dighe, S. N.; Khabbazi, S.; Parat, M.; Ross, B. P. Effect of the Biphenyl Neolignan Honokiol on A β 42-Induced Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*, A β 42 Fibrillation, Cholinesterase Activity, DPPH Radicals, and Iron(II) Chelation. *ACS Chem Neurosci*

- 2017, 8 (9), 1901–1912. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00071>.
- (61) Praveen Kumar, V.; Gajendra Reddy, R.; Vo, D. D.; Chakravarty, S.; Chandrasekhar, S.; Grée, R. Synthesis and Neurite Growth Evaluation of New Analogues of Honokiol, a Neolignan with Potent Neurotrophic Activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.015>.
- (62) Huang, X. X.; Xu, Y.; Bai, M.; Zhou, L.; Song, S. J.; Wang, X. B. Lignans from the Seeds of Chinese Hawthorn (*Crataegus Pinnatifida* Var. Major N.E.Br.) against - Amyloid Aggregation. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32 (14), 1706–1713. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399378>.
- (63) Borbély, S.; Jócsák, G.; Moldován, K.; Sedlák, É.; Preininger, É.; Boldizsár, I.; Tóth, A.; Atlason, P. T.; Molnár, E.; Világi, I. Arctigenin Reduces Neuronal Responses in the Somatosensory Cortex via the Inhibition of Non-NMDA Glutamate Receptors. *Neurochem. Int.* **2016**, 97, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.03.006>.
- (64) Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, 4 (2), 89–96.
- (65) Saleem M, Kim HJ, Ali MS, L. Y. An Update on Bioactive Plant Lignans. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22 (6), 696–716. <https://doi.org/10.1039/b514045p>.
- (66) Ionkova, I. Anticancer Lignans--from Discovery to Biotechnology. *Mini-reviews Med. Chem.* **2011**, 11 (10), 843–856. <https://doi.org/10.2174/138955711796575425>.
- (67) Canel C, Moraes RM, Dayan FE, F. D. Podophyllotoxin. *Phytochemistry* **2000**, 54 (2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00094-7).
- (68) Moura AF, Lima KSB, Sousa TS, Marinho-Filho JDB, Pessoa C, Silveira ER, Pessoa ODL, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, A. A. In Vitro Antitumor Effect of a Lignan Isolated from *Combretum Fruticosum*, Trachelogenin, in HCT-116 Human Colon Cancer Cells. *Toxicol. Vitro.* **2018**, 47, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.014>.
- (69) Zhang, Y.; Zhao, H.; Di, Y.; Li, Q.; Shao, D.; Shi, J.; Huang, Q. Antitumor Activity of Pinoresinol in Vitro: Inducing Apoptosis and Inhibiting HepG2 Invasion. *J. Funct. Foods* **2018**, 45 (January), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.009>.
- (70) de Souza Pereira, J. J.; Pereira, A. de P. C.; Jandú, J. J. B.; da Paz, J. A.; Crovella, S.;

- dos Santos Correia, M. T.; de Azevêdo Silva, J. Commiphora Leptophloeos Phytochemical and Antimicrobial Characterization. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 52. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00052>.
- (71) Zhang HJ, Rumschlag-Booms E, Guan YF, Wang DY, Liu KL, Li WF, Nguyen VH, Cuong NM, Soejarto DD, Fong HHS, R. L. Potent Inhibitor of Drug-Resistant HIV-1 Strains Identified from the Medicinal Plant Justicia Gendarussa. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (6), 1798–1807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00004>.
- (72) Conrado, G. G.; Grazzia, N.; de Oliveira, A. da S. S.; Franco, C. H.; Moraes, C. B.; Gadelha, F. R.; Miguel, D. C.; Garcia, V. L. Prospecting and Identifying Phyllanthus Amarus Lignans with Antileishmanial and Antitrypanosomal Activity. *Planta Med.* **2020**, *86* (11), 782–789. <https://doi.org/10.1055/a-1179-1003>.
- (73) Oketch-Rabah, H. A.; Dossaji, S. F.; Christensen, S. B.; Frydenvang, K.; Lemmich, E.; Cornett, C.; Olsen, C. E.; Chen, M.; Kharazmi, A.; Theander, T. Antiprotozoal Compounds from Asparagus Africanus. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60* (10), 1017–1022. <https://doi.org/10.1021/np970217f>.
- (74) Cabanillas, B. J.; Le Lamer, A.-C.; Castillo, D.; Arevalo, J.; Rojas, R.; Odonne, G.; Bourdy, G.; Moukarzel, B.; Sauvain, M.; Fabre, N. Caffeic Acid Esters and Lignans from Piper Sanguineispicum. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (11), 1884–1890. <https://doi.org/10.1021/np1005357>.
- (75) Trost, B. M.; Curran, D. P. Chemoselective Oxidation of Sulfides to Sulfones with Potassium Hydrogen Persulfate. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (14), 1287–1290. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90298-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90298-9).
- (76) Xu, L.; Cheng, J.; Trudell, M. L. Chromium(VI) Oxide Catalyzed Oxidation of Sulfides to Sulfones with Periodic Acid. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (13), 5388–5391. <https://doi.org/10.1021/jo030031n>.
- (77) Day, J. J.; Neill, D. L.; Xu, S.; Xian, M. Benzothiazole Sulfinate: A Sulfinic Acid Transfer Reagent under Oxidation-Free Conditions. *Org. Lett.* **2017**, *19* (14), 3819–3822. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01693>.
- (78) Milišiūnaitė, V.; Kadlecová, A.; Žukauskaitė, A.; Doležal, K.; Strnad, M.; Voller, J.; Arbačiauskienė, E.; Holzer, W.; Šačkus, A. Synthesis and Anthelmintic Activity of Benzopyrano[2,3-c]Pyrazol-4(2H)-One Derivatives. *Mol. Divers.* **2020**, *24* (4), 1025–

1042. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-10010-3>.

Internetové reference

Internetový zdroj 1: (24.11.2020)

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Internetovým zdroj 2: (18.11.2020)

<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Internetový zdroj 3: (28.11.2020)

https://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/

Internetový zdroj 4: (28.11.2020)

https://www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous_leishmaniasis/en/

Internetový zdroj 5: (28.11.2020)

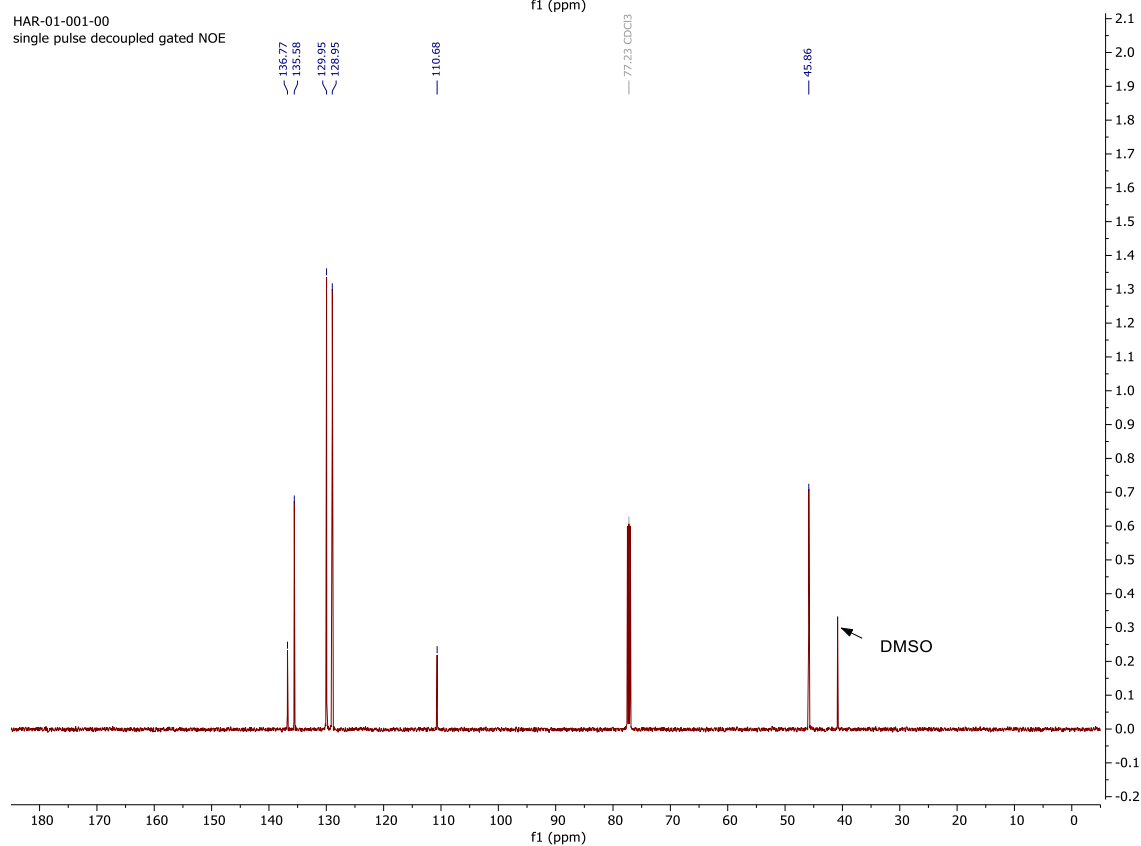
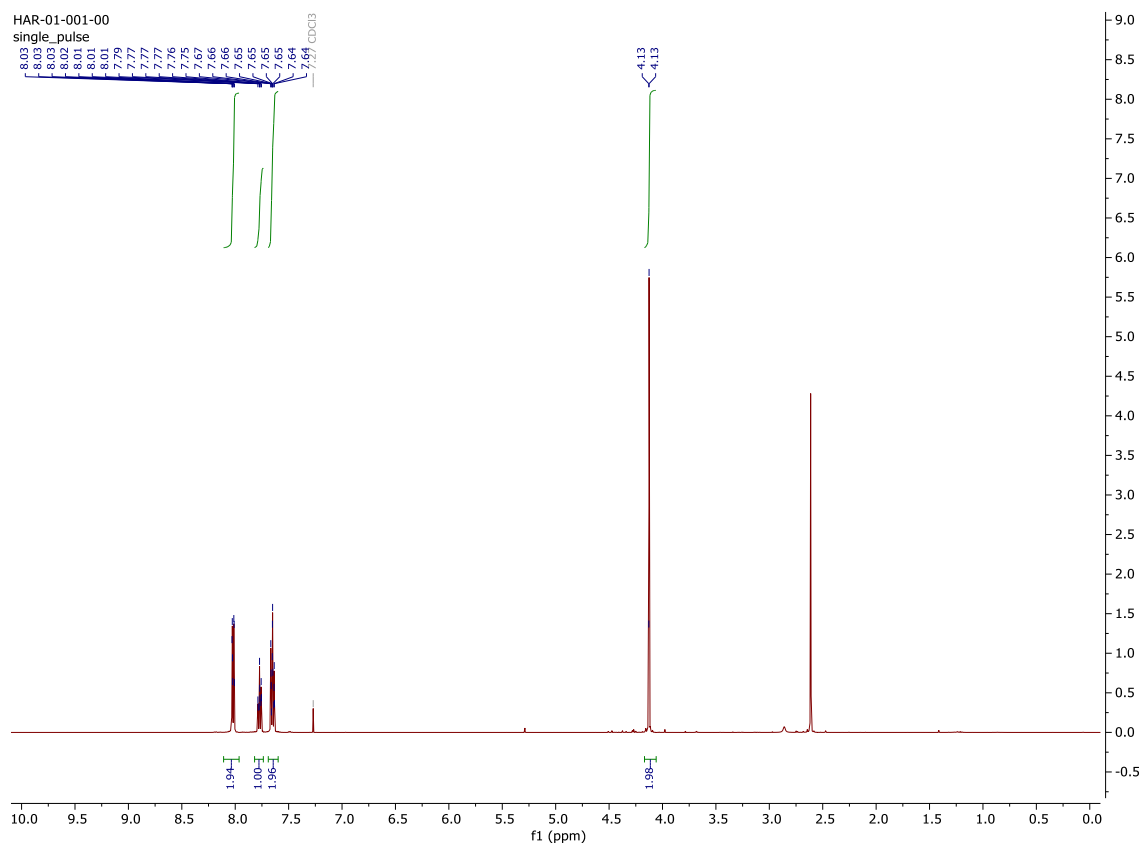
https://www.researchgate.net/figure/Mucocutaneous-leishmaniasis_fig1_272099464

Internetový zdroj 6: (28.11.2020)

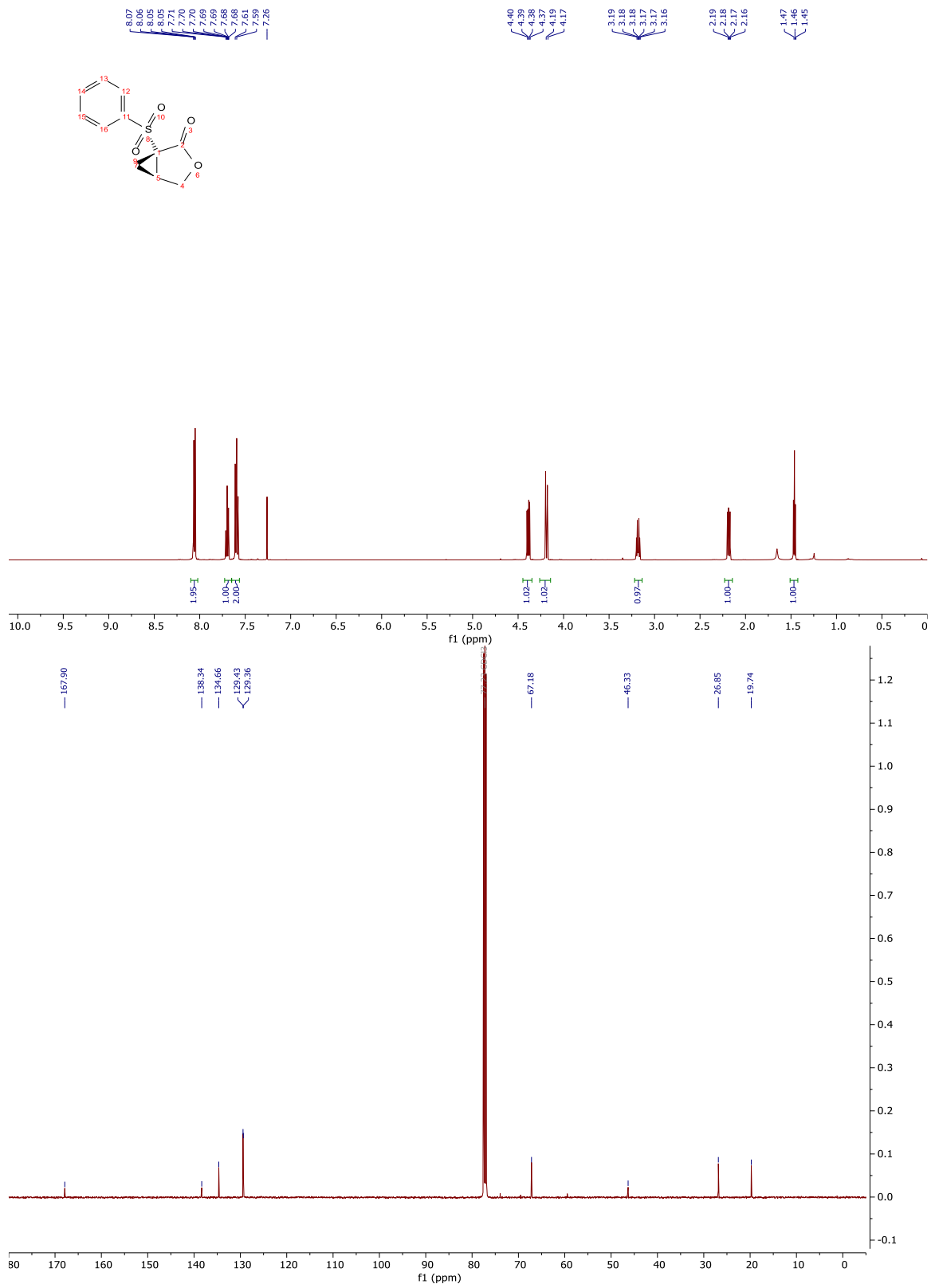
https://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/

8. Přílohy

^1H a ^{13}C NMR spektra látky **3**

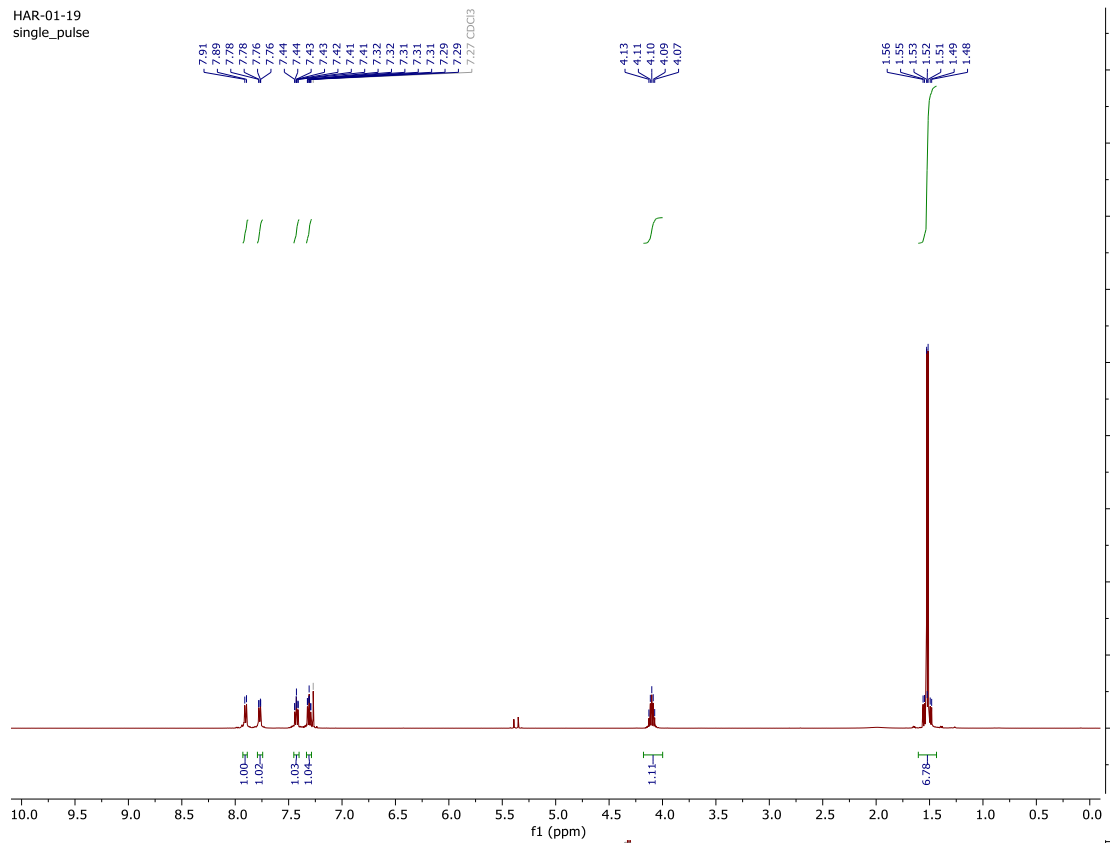


^1H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-5

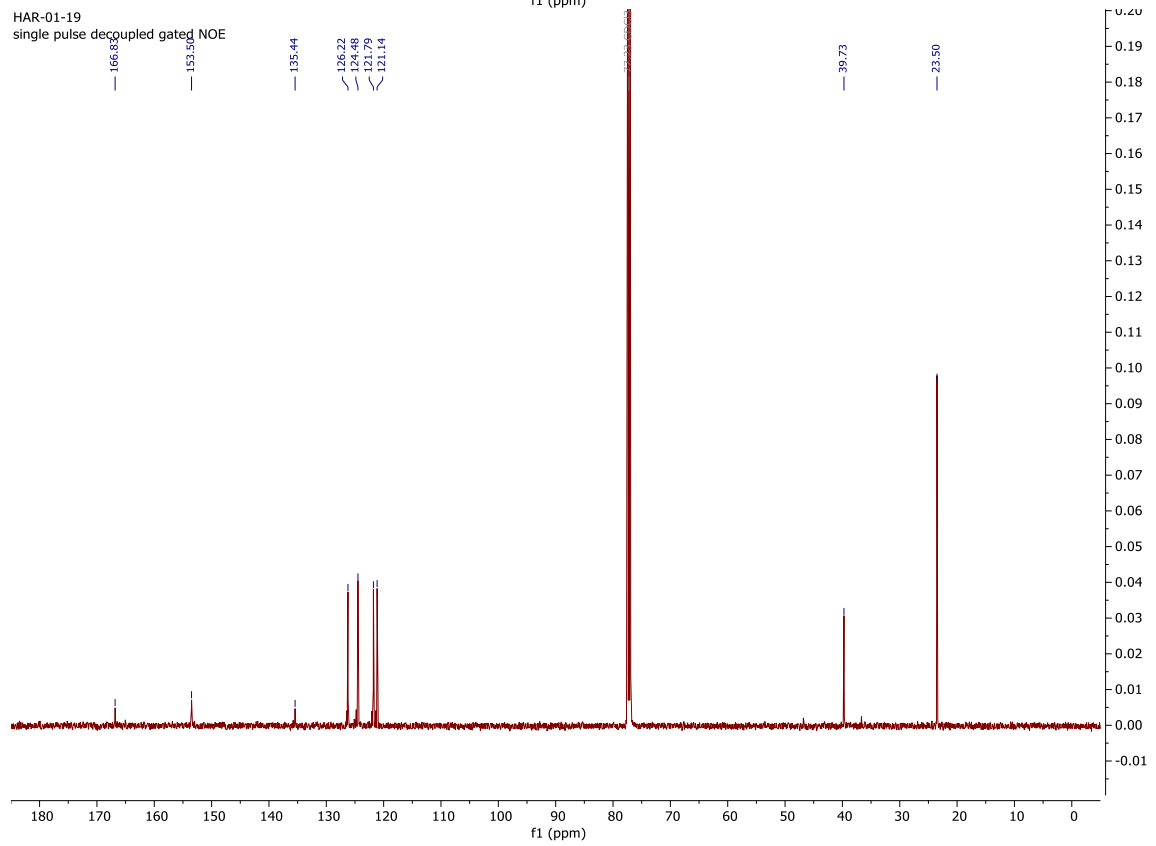


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **8a**

HAR-01-19
single_pulse

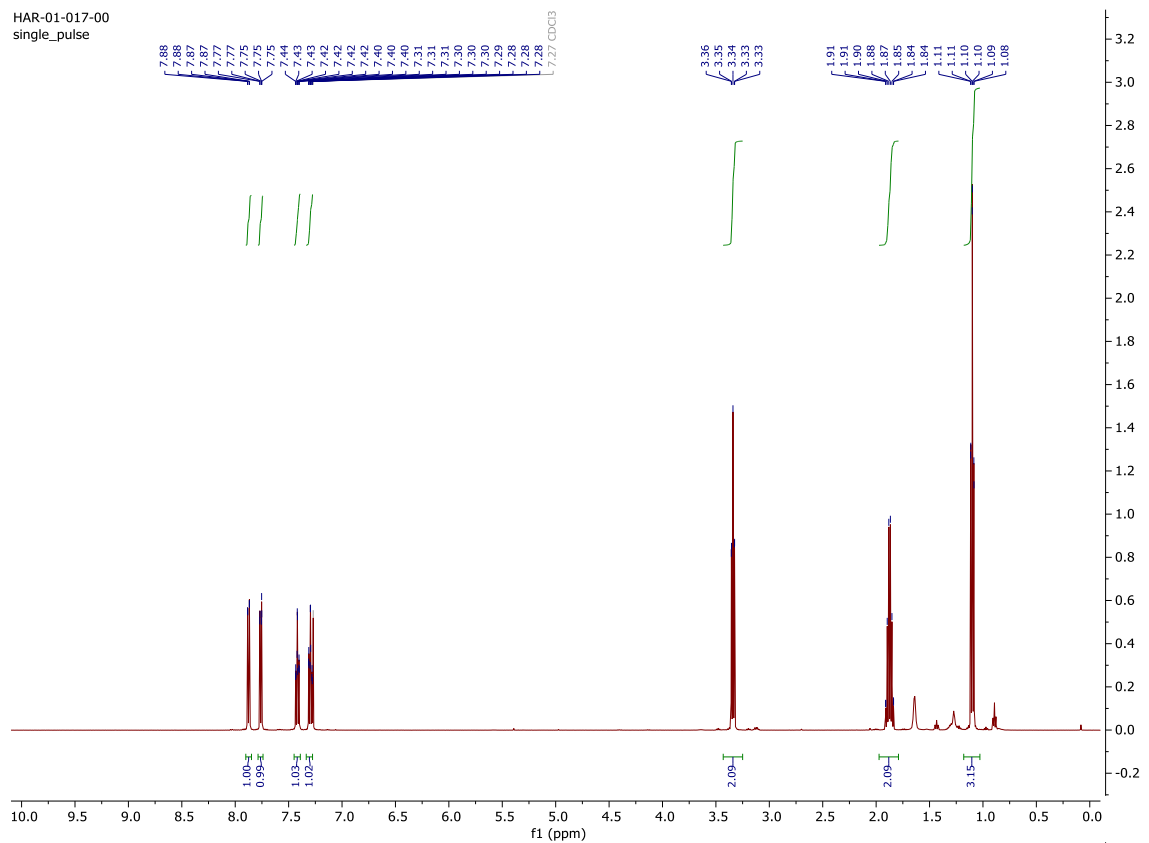


HAR-01-19
single pulse decoupled gated NOE

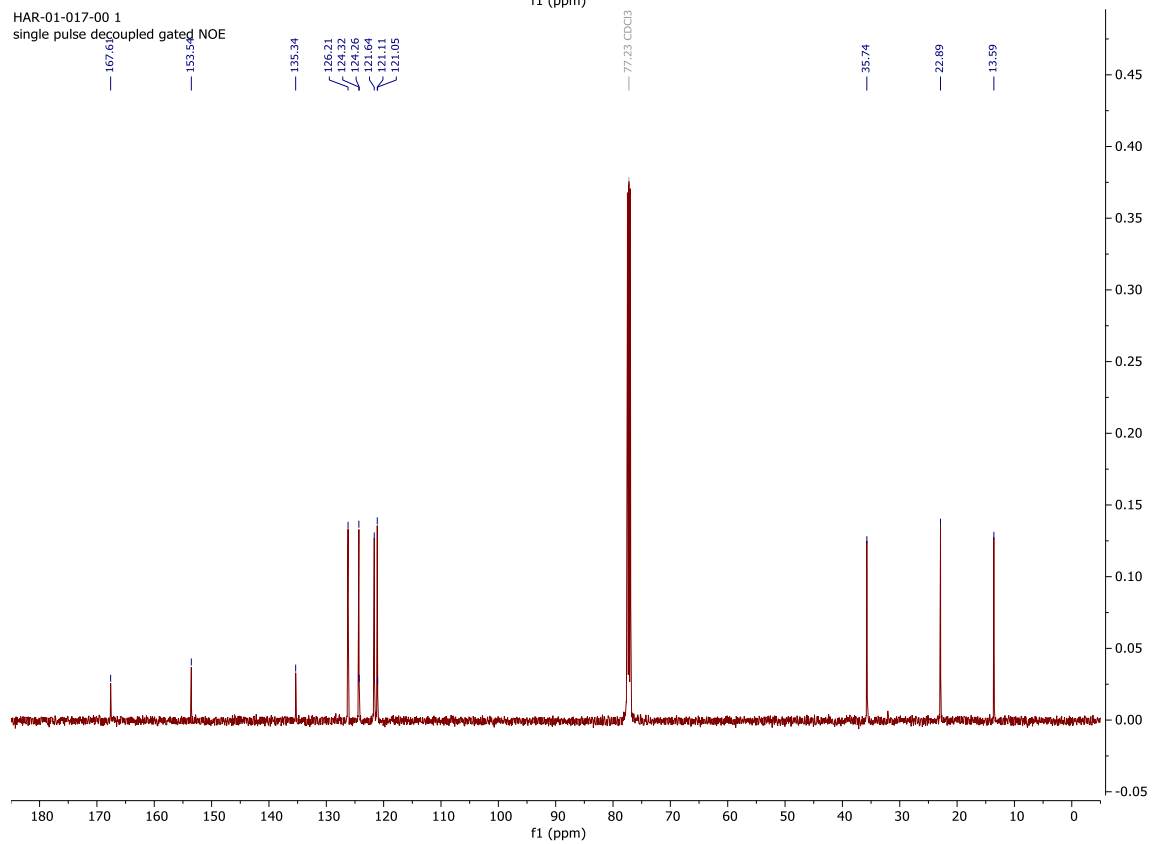


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **8b**

HAR-01-017-00
single_pulse

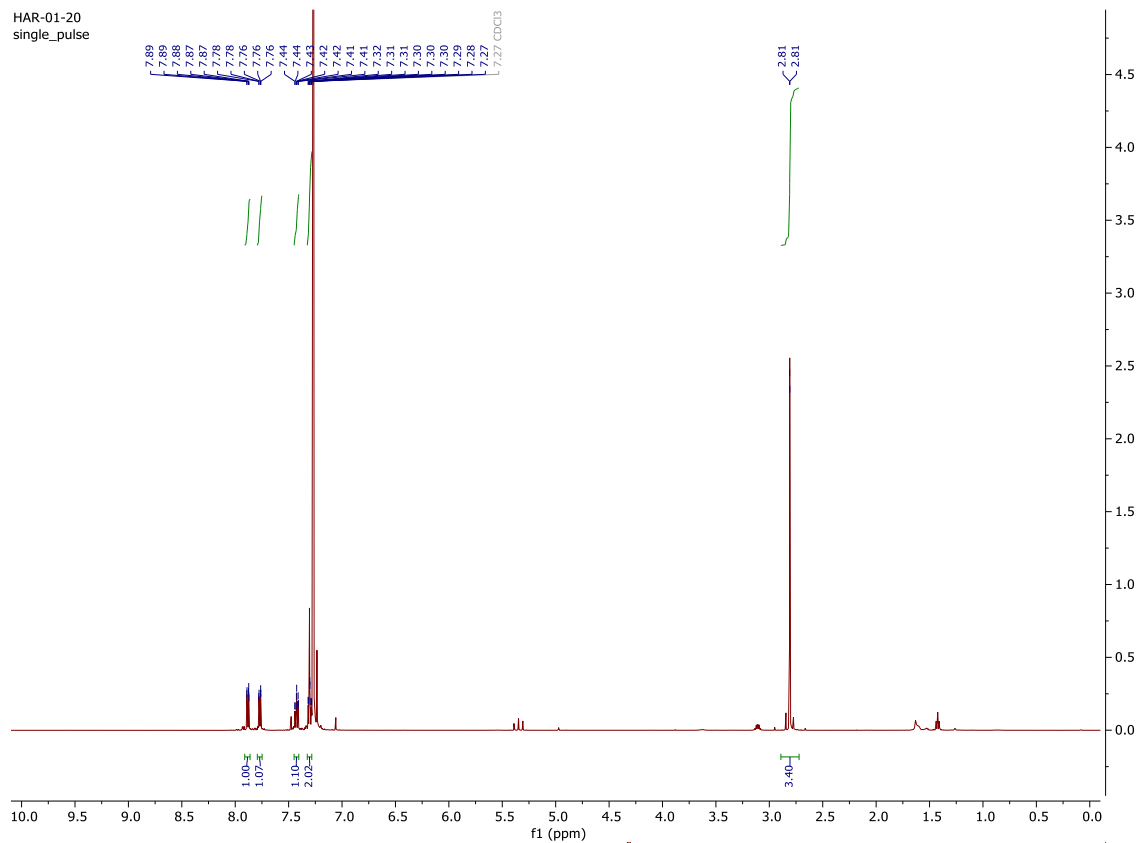


HAR-01-017-00 1
single pulse decoupled gated NOE

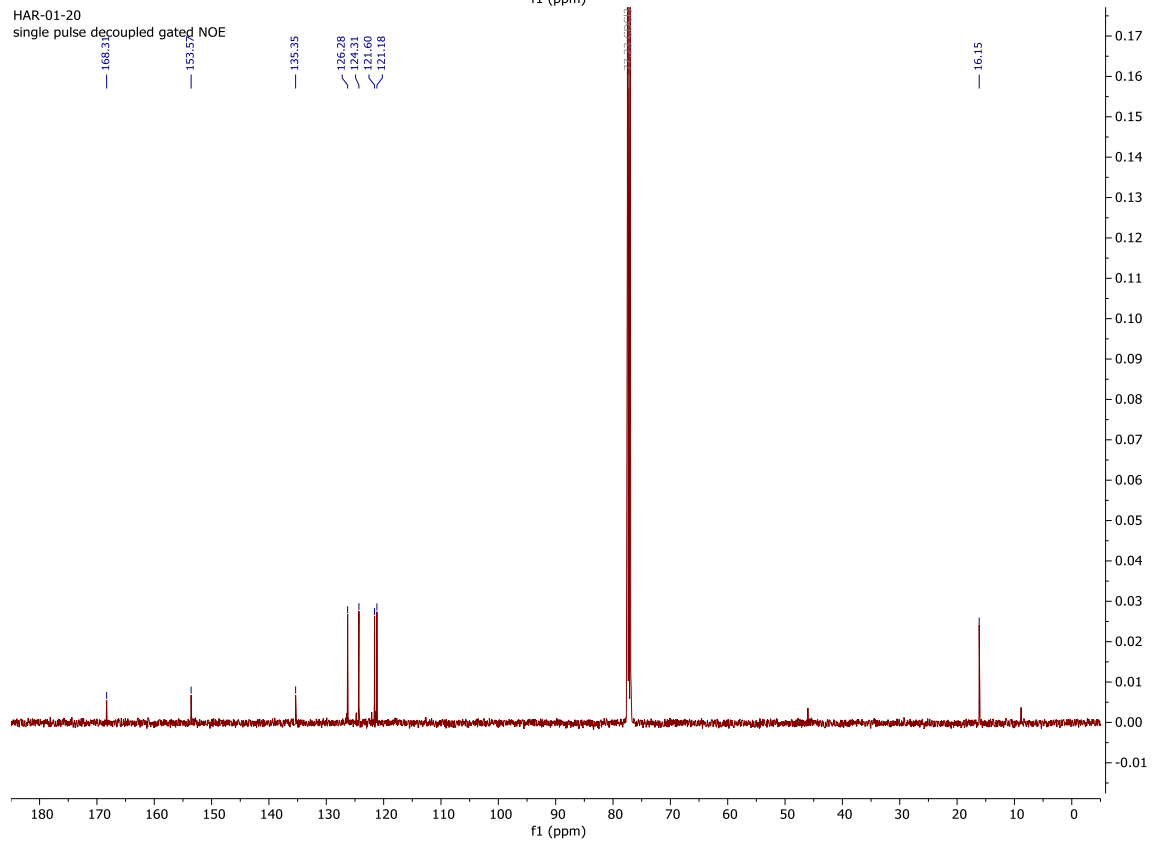


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **8c**

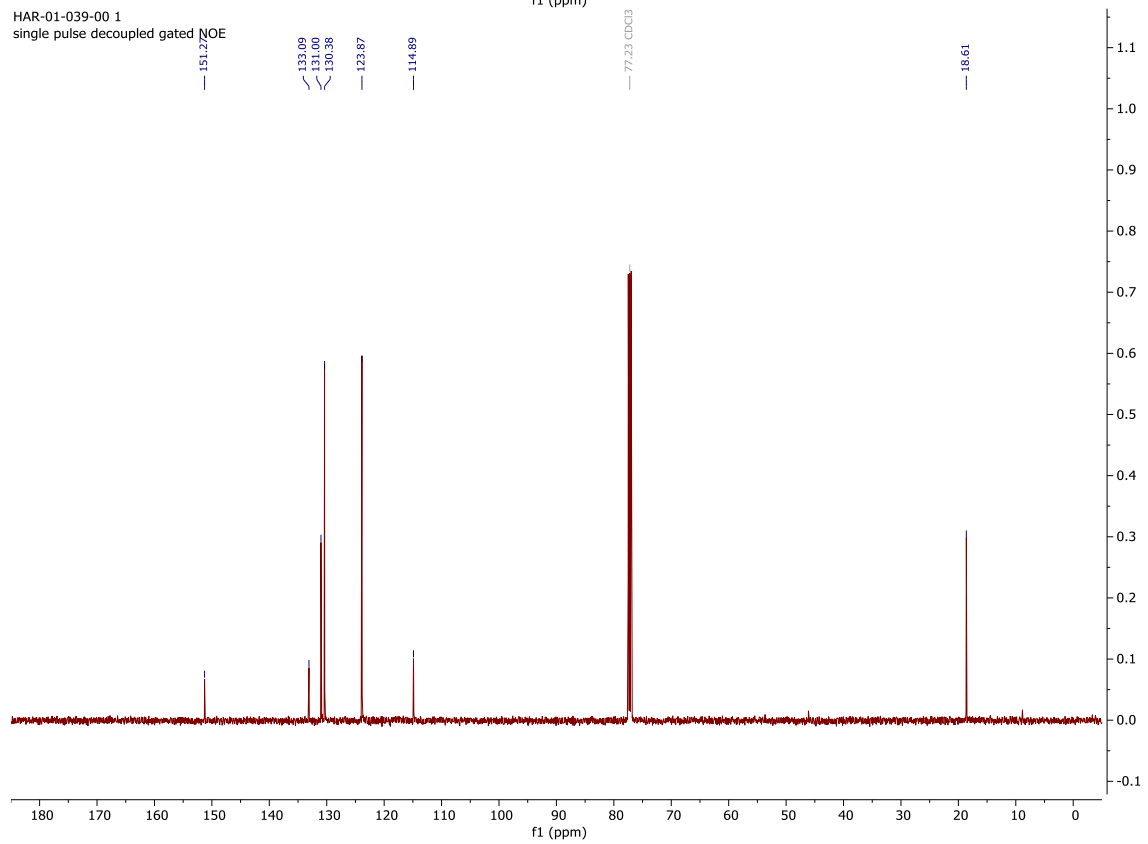
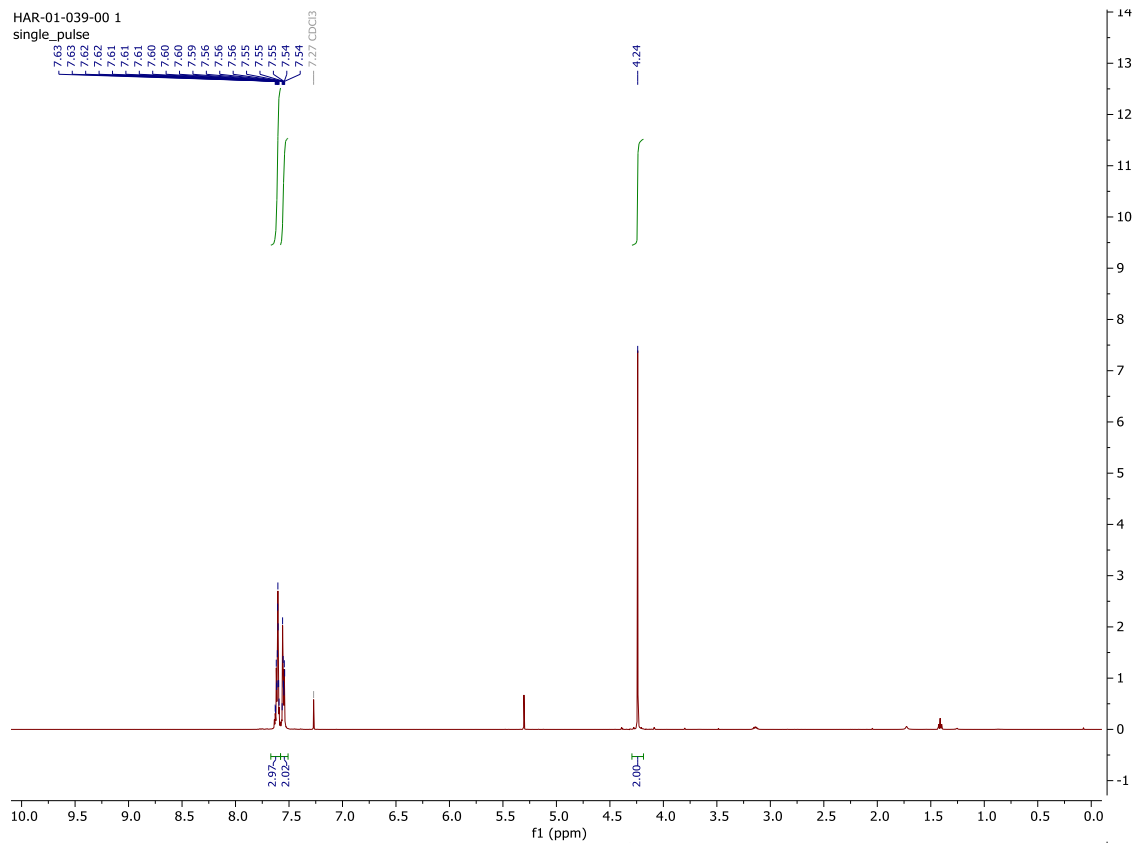
HAR-01-20
single_pulse



HAR-01-20
single_pulse decoupled gated NOE

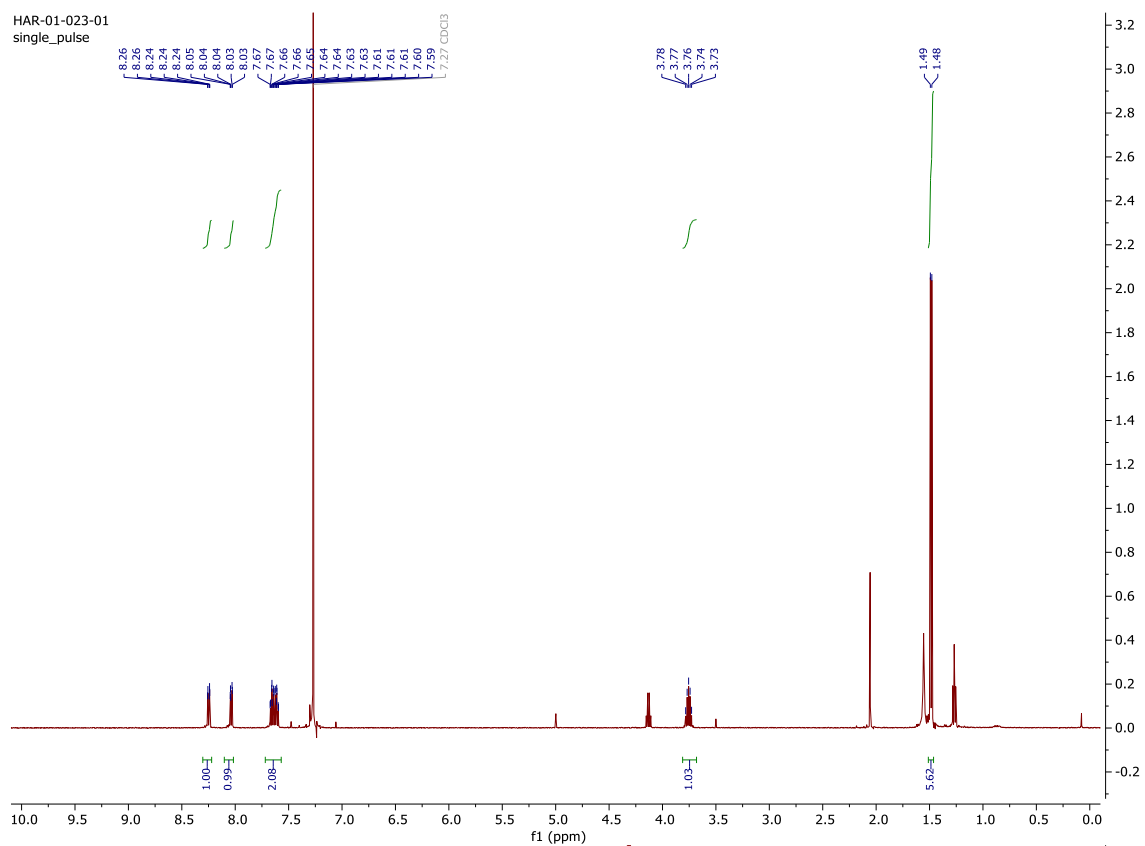


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **8f**

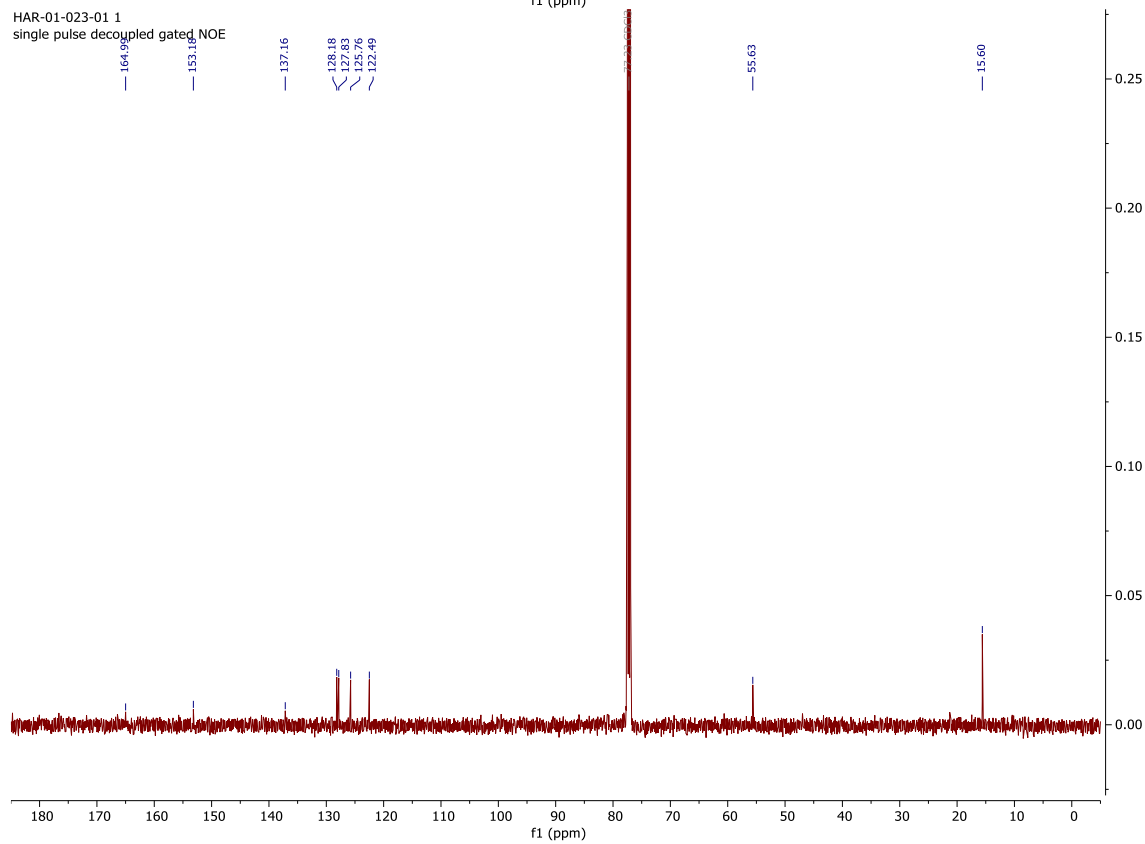


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **10a**

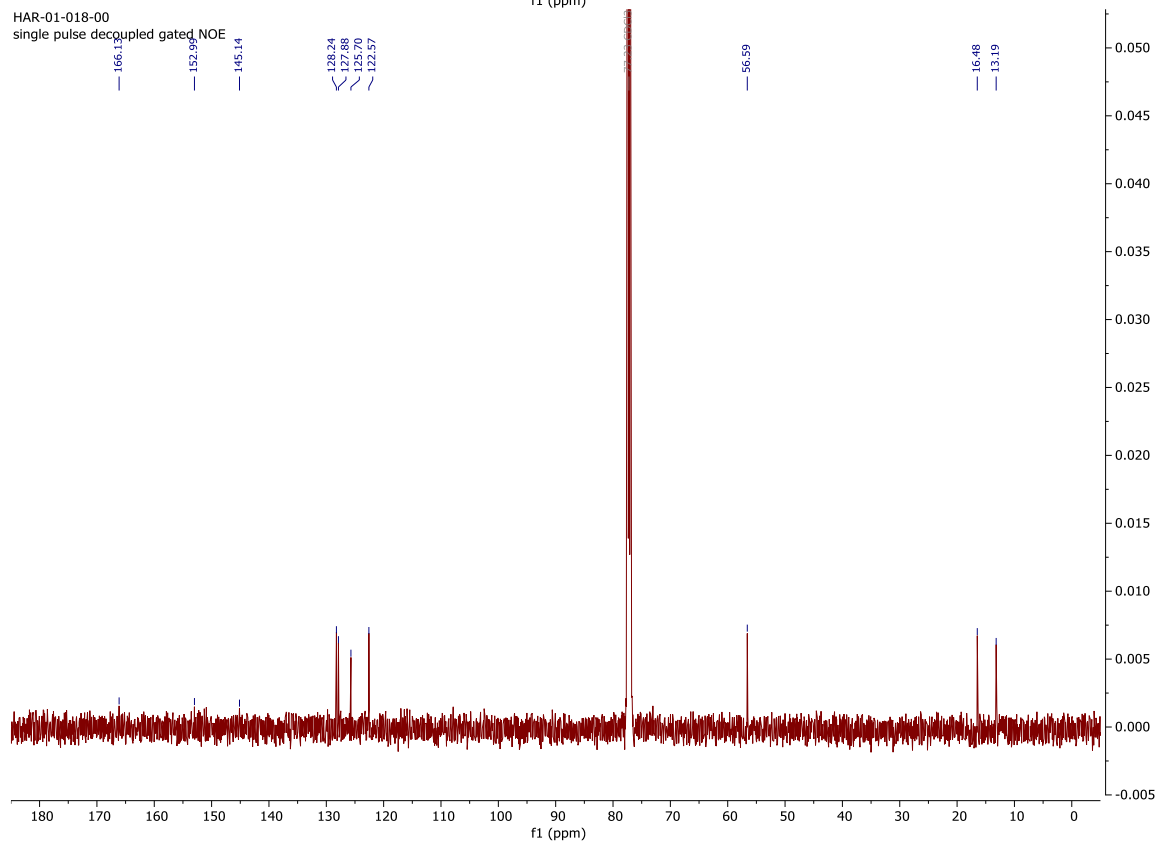
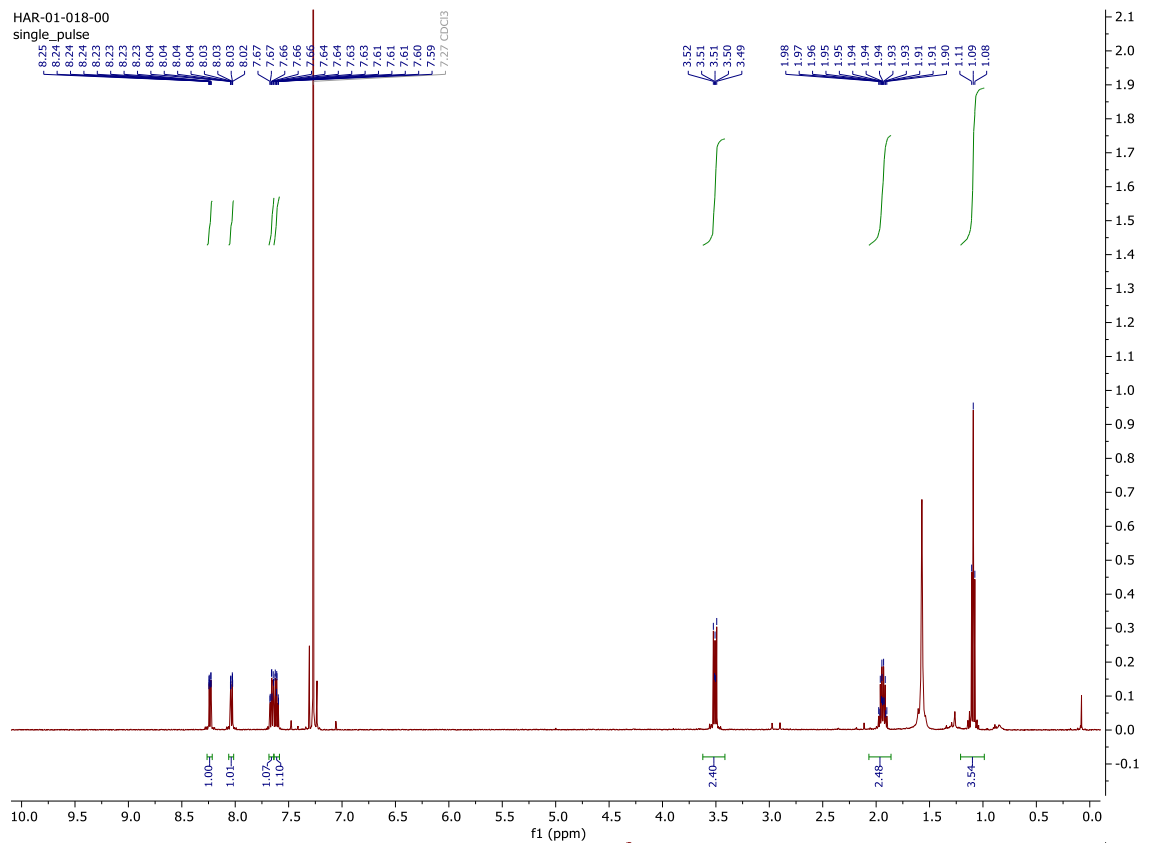
HAR-01-023-01
single_pulse



HAR-01-023-01 1
single pulse decoupled gated NOE

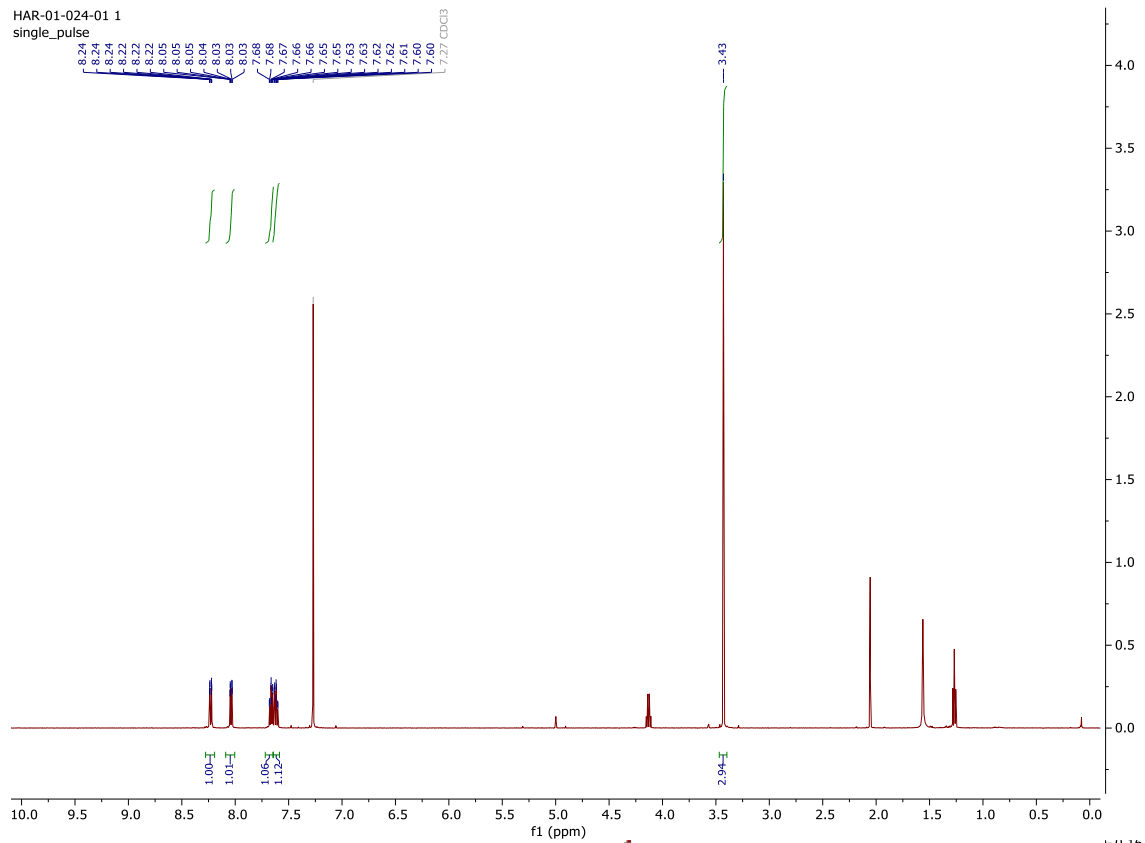


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **10b**

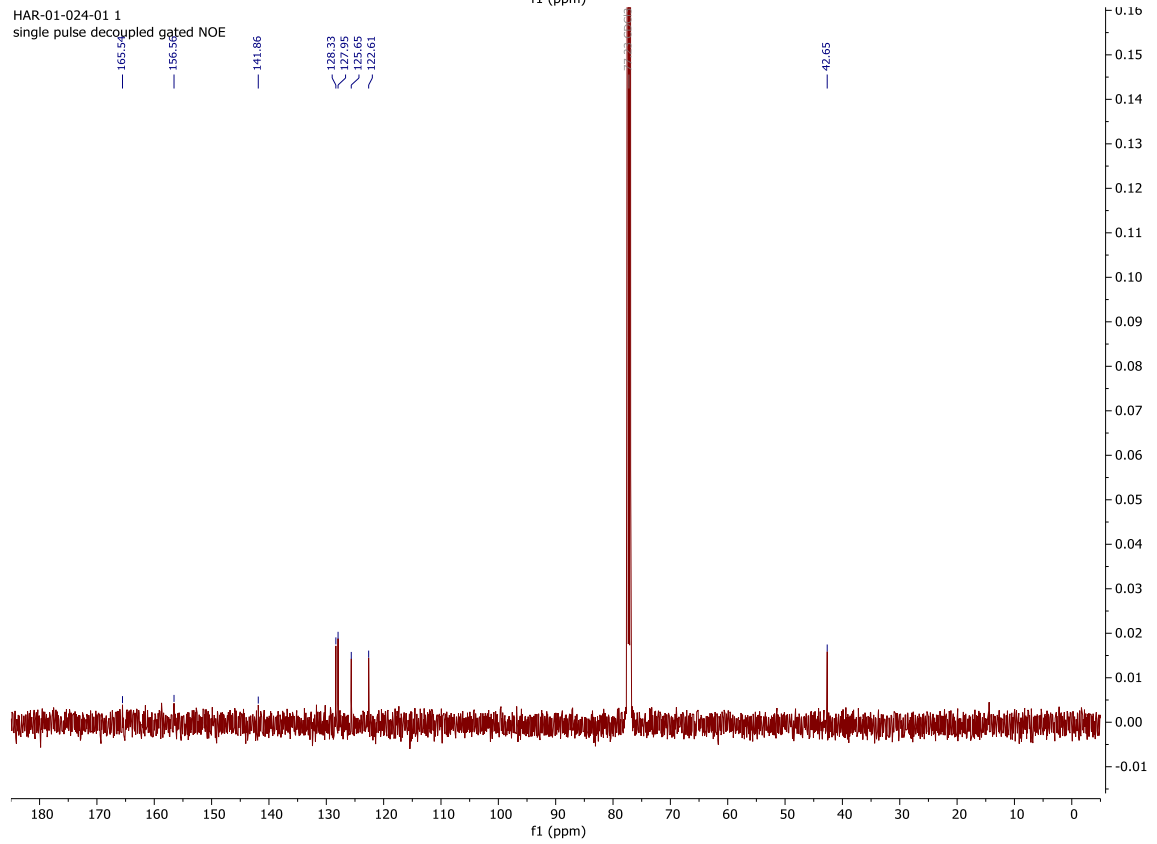


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **10c**

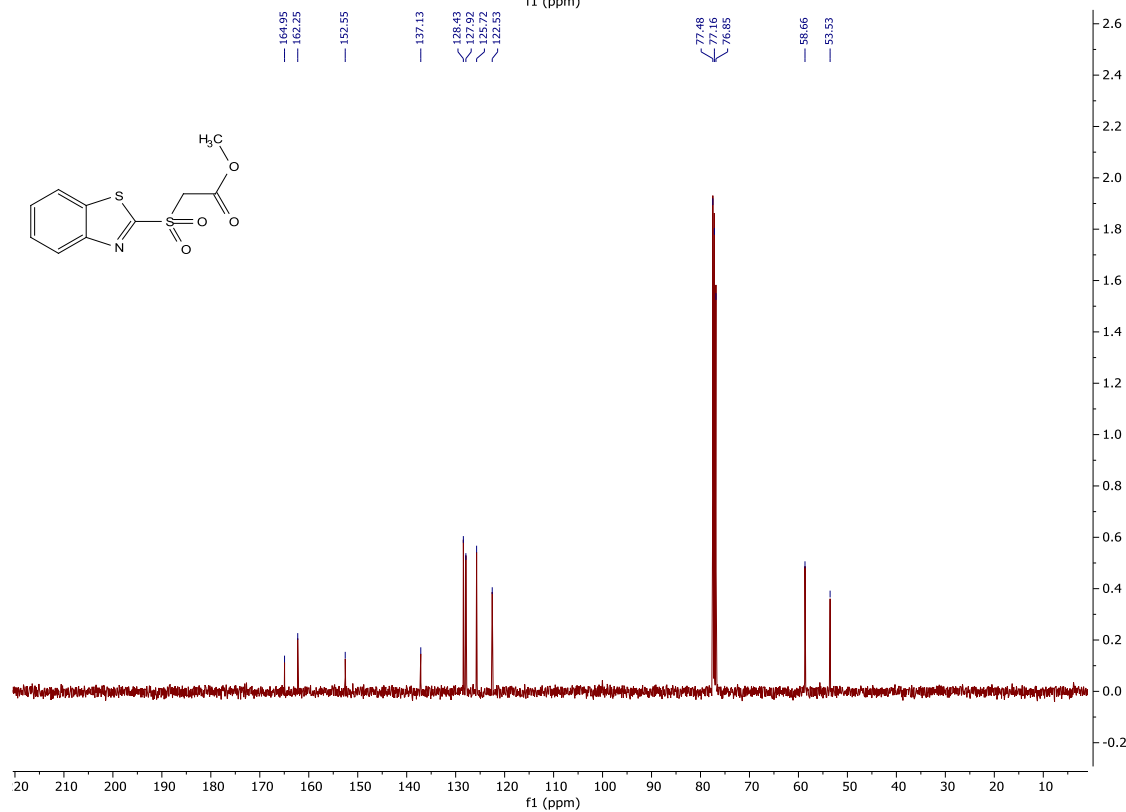
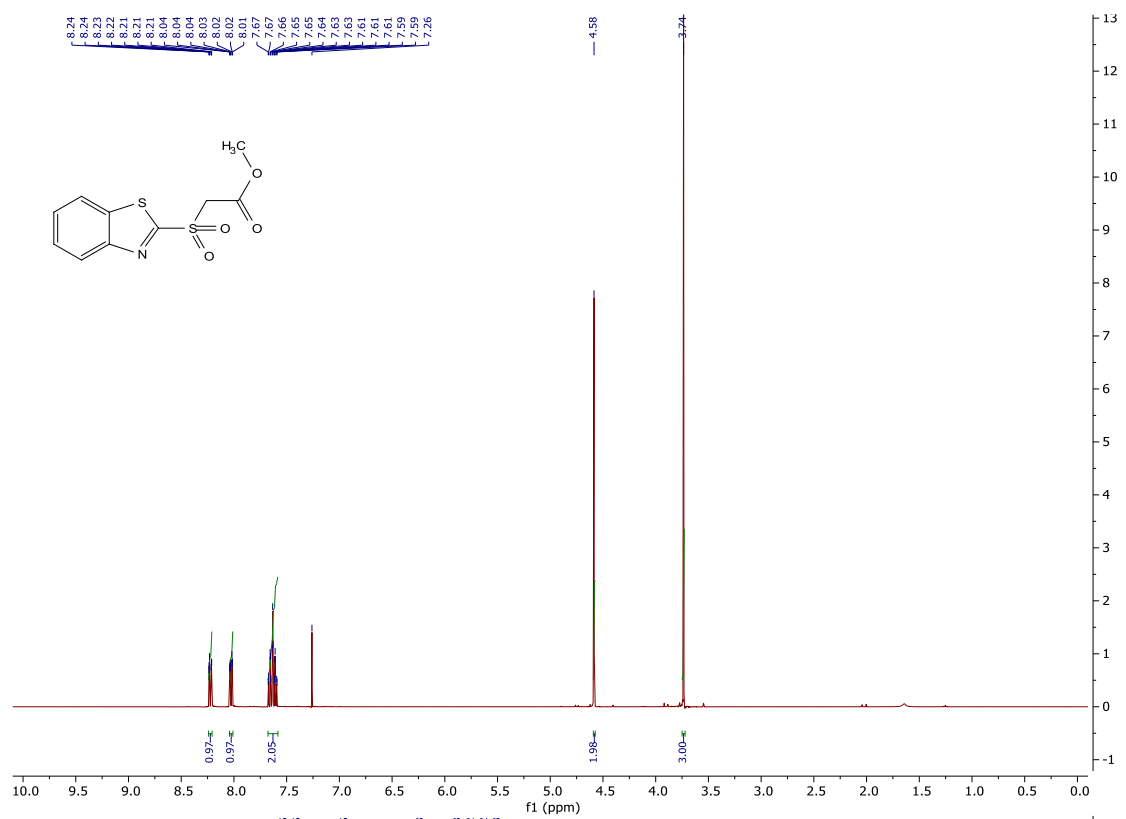
HAR-01-024-01 1
single_pulse



HAR-01-024-01 1
single_pulse decoupled gated NOE

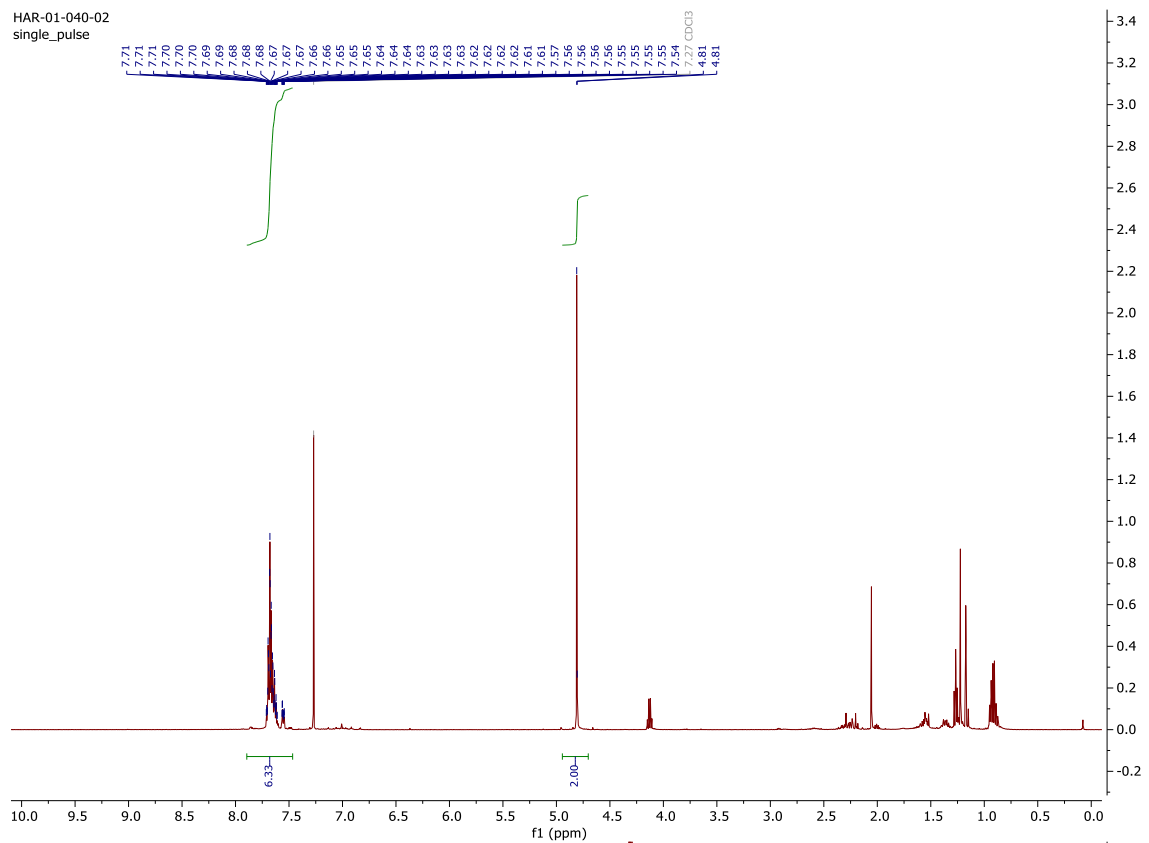


^1H a ^{13}C NMR spektra látky **10d**



^1H a ^{13}C NMR spektra látky **10f**

HAR-01-040-02
single_pulse



HAR-01-040-02 1
single pulse decoupled gated NOESY

