

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Studie vedoucí k rostlinnému sekundárnímu metabolitu  
syzysmalaktonu**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Anna Hanzlíková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Hanzlíková
Název práce	Studie vedoucí k rostlinnému sekundárnímu metabolitu syzysamalaktonu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce se zabývá vývojem syntetického přístupu k rostlinnému sekundárnímu metabolitu syzysamalaktonu. Látce, která vykazuje zajímavé neuroprotektivní vlastnosti. V rámci práce jsou v literární části diskutovány sekundární metabolity a jejich biologická aktivita s hlavním zaměřením na syzymalakton a jí podobné látky. Provedením a optimalizací syntetických kroků námi navrženého syntetického přístupu k této látce je pak věnována experimentální část.</p>
Klíčová slova	Sekundární metabolity; syzymalakton; neuroprotektce; syntéza; přírodní látky;
Počet stran	58
Počet příloh	2
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Anna Hanzlíková
Title of thesis	Study leading towards plant secondary metabolite syzysamalactone
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the development of a synthetic approach to the plant secondary metabolite syzysamalactone. A substance that exhibits interesting neuroprotective properties. The literature section of the thesis discusses secondary metabolites and their biological activity with a focus on syzimalactone and its derivatives. The experimental part is then devoted to the implementation and optimization of the synthetic steps of our proposed synthetic approach for this compound.</p>
Keywords	Secondary metabolites; syzimalactone; neuroprotection; synthesis; natural substances;
Number of pages	58
Number of appendices	2
Language	Czech

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

V Olomouci dne 17. 5. 2024

*Anna Hanzlíková*

#### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat panu doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za jeho, trpělivost, cenné rady, ochotu, obrovské množství času, které mi věnoval při vypracovávání této práce a v neposlední řadě za jeho věčně dobrou náladu i při situacích, které veselé nebyly.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu naší výzkumné skupiny, jmenovitě pak Mgr. Markétě Fuksové a Mgr. Danielovi Chrenkovi za jejich trpělivost a pomoc v laboratoři. Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. bych pak ráda poděkovala za vedení při biologickém testování.

Chtěla bych také poděkovat Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého IGA\_PrF\_2024\_007 a IGA\_PrF\_2024\_013 za pomoc při financování výzkumu spojeného s touto závěrečnou prací.

# Obsah

Seznam zkratk .....	8
1 Úvod a cíle práce.....	9
2 Teoretická část .....	10
2.1 Sekundární metabolity rostlin .....	10
2.2 Fenylypropanoidy .....	14
2.2.1 Charakteristika .....	14
2.2.2 Struktura fenylypropanoidů .....	14
2.2.3 Biosyntéza fenylypropanoidů .....	18
2.2.3.1 Šikimátová dráha.....	18
2.2.3.2 Biosyntéza L-fenylalaninu a L-tyrosinu .....	20
2.2.3.3 Fenylypropanoidová a fenylyprapanoid-acetátová dráha .....	21
2.2.4 Biologická aktivita fenylypropanoidů.....	24
2.2.4.1 Antimikrobiální aktivita.....	24
2.2.4.2 Antioxidační aktivita.....	26
2.2.4.3 Protizánětlivá aktivita .....	27
2.2.4.4 Neuroprotektivní aktivita .....	28
2.2.4.5 Protirakovinná aktivita.....	29
2.2.4.6 Léčba diabetu .....	30
2.3 <i>Syzygium samarangense</i> .....	31
2.3.1 Charakteristika .....	31
2.3.2 Bioaktivita látek v <i>S. samarangense</i> .....	32
2.3.3 6-pentyl- $\alpha$ -pyron (69).....	33
2.3.3.1 Struktura laktonu 69.....	33
2.3.3.2 Biologická aktivita laktonu 69 .....	33
2.3.4 Syzysamalakoton (70).....	34
2.3.4.1 Chemická struktura syzysamalaktonu.....	34

2.3.4.2	Biosyntéza syzysamalaktonu (70) .....	34
2.3.4.3	Biologická aktivita syzysamalaktonu (70).....	35
3	Experimentální část.....	36
3.1	Chemikálie .....	36
3.2	Metody a materiál .....	36
3.2.1	Obecné informace .....	36
3.2.2	Vizualizační roztoky pro TLC .....	37
3.3	Organická syntéza.....	37
3.3.1	Příprava aduktu 80 .....	37
3.3.2	Příprava kyseliny 81 .....	38
3.4	Biologické testování .....	38
4	Výsledky .....	40
4.1	Syntéza syzysamalaktonu .....	40
4.1.1	Syntéza syzysamalaktonu – jedeme podle plánu.....	40
4.1.2	Syntéza syzysamalaktonu – funguje cyklizace? .....	42
4.1.3	Syntéza syzysamalaktonu – alternativní přístup.....	43
4.2	Biologické testování připravených látek.....	44
5	Diskuse.....	46
5.1	Organická syntéza.....	46
5.2	Biologické testování .....	48
6	Závěr .....	49
7	Použitá literatura .....	50
8	Přílohy.....	57
8.1	Kopie $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spekter esteru 80 .....	57
8.2	Kopie $^1\text{H}$ NMR spektra kyseliny 81 .....	58

## Seznam zkratek

6-OHDA	6-hydroxidopamin	MIC	minimální inhibiční koncentrace
AD	Alzheimerova choroba	HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
ADCS	<i>aminodeoxychorismát synthasa</i>	NBS	N-bromsukcimidin
AS	<i>anthranilát synthasa</i>	NF $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
ATP	adenosintrifosfát	NMR	nukleární magnetická rezonance
AZT	azidothymidin	PAL	<i>fenylalanin amonium liasa</i>
C4H	<i>cinamát-4-hydroxylasa</i>	PD	Parkinsonova choroba
CDCl <sub>3</sub>	deuterovaný chloroform	PEP	fosfoenylpyruvát
CM	<i>chorismát mutasa</i>	ppm	parts per milion
CoA	koenzym A	ROS	reaktivní formy kyslíku
COSY	korelační spektroskopie	RT	laboratorní teplota
DABCO	1,4-diazobicyklo[2.2.2]oktan	RVO	rotační vakuová odparka
DAHP	3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát	S3P	šikimát-3-fosfát
DAHPS	<i>DAHPS synthasa</i>	TFAA	anhydrid kyseliny trifluoroctové
DCM	dichlormethan	THF	tetrahydrofuran
DHS	3-dehydrošikimát	TLC	tenkovrstvá chromatografie
DMF	dimethylformamid	TNF $\alpha$	tumor nekrotický faktor $\alpha$
EC <sub>50</sub>	polovina efektivní koncentrace	$\delta$	chemický posun
EGCG	epigallokatechin-3-galát		
ekviv.	počet ekvivalentů		
EPSP	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát		
EPSPS	<i>EPSP synthasa</i>		
EtOAc	ethylacetát		
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti		
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace		
ICS	<i>isochorismát synthasa</i>		
MeOH	methanol		



# 1 Úvod a cíle práce

Neduhy a různá onemocnění jsou neodmyslitelně spojena s lidským životem, a tak lidé odnepaměti hledali různé způsoby, jak si od nich pomoci. Brzy si všimli, že zvířata v okolní přírodě využívají okolních bylin k sebeléčbě. Začali se tak obracet na přírodní zdroje, a především pak na zástupce v rostlinné říši. S rozvojem vědy se podařilo objasnit původ a vlastnosti některých léčivých látek v rostlinách což nám umožnilo vyvinout efektivnější přínosy a užití těchto látek.

Skupinou přírodních látek, které jsou zodpovědné za léčivé účinky a kvůli kterým byly některé rostliny pěstovány a sbírány, jsou sekundární metabolity. V rostlině hrají sekundární metabolity důležitou roli zejména při adaptaci na okolní prostředí. Ačkoliv nejsou přímo zodpovědné za základní fyziologické funkce jako růst a rozmnožování, úzce souvisejí s metabolismem primárních metabolitů a do jisté míry ho mohou i ovlivňovat.

Sekundární metabolity se dělí do třech základních skupin, které se od sebe liší jak chemickými vlastnostmi, tak funkcemi v rostlinách. Jednou z těchto skupin jsou fenylypropanoidy, kterými se podrobněji zabývají následující stránky této práce. Fenylypropanoidy vychází z aromatické aminokyseliny L-fenylalaninu. V rostlinách hrají důležitou roli při ochraně rostlin před patogeny, ve velké míře jsou uvolňovány při zvýšeném stresu, a jsou tak významnými stresovými faktory. S blahodárnými vlivy na rostlinu jsou spojené i nepopíratelné výhody pro člověka. Fenylypropanoidy jsou pro nás významnými antioxidanty, ale také napomáhají při léčbě zánětu a v boji s mikroby.

V současnosti jsou objevovány a identifikovány nové a nové látky rostlinného původu, a u některých z nich je pak prokázána zajímavá biologická aktivita. Mezi takové látky patří i syzysmalakton, nově izolovaný lakton ze zralého plodu hřebíčkovce jávského (*S. samarangense*).<sup>1</sup> U této látky byla totiž prokázána její neuroprotektivní aktivita. To nasvědčuje tomu, že syzysmalakton může být významným hráčem v boji proti demencím, které patří k významným civilizačním chorobám.

Cílem této bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zabývající se tématem sekundárních metabolitů, zejména pak fenylypropanoidů, a stručně popsat jejich vlastnosti, a to jak z hlediska chemického, tak i biologického. V experimentální části bylo mým cílem vyvinout postupy vedoucí v budoucnosti k laboratorní syntéze syzysmalaktonu, následně otestovat cytotoxicitu připravených intermediátů, a zároveň charakterizovat připravené látky pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

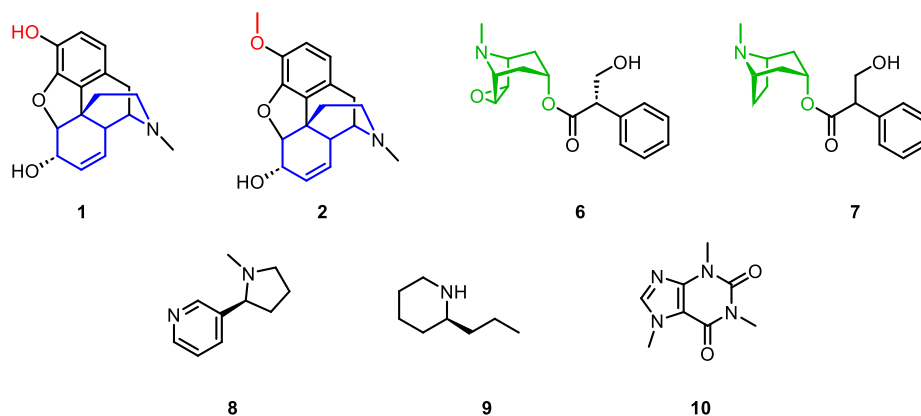
## 2 Teoretická část

### 2.1 Sekundární metabolity rostlin

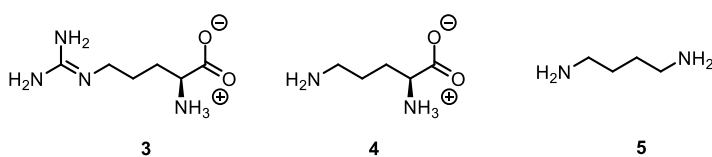
Sekundární metabolity jsou látky produkované přisedlými organismy, zejména pak rostlinami. Zatímco primární metabolity jsou malé organické látky, jež jsou nezbytné pro přežití každého živého organismu, sekundární metabolity naopak zvyšují kvalitu života těchto organismů (obrana před herbivory, reakce na stres, interakce s ostatními organismy v okolí apod.) V převážné většině případů námi uvažovaných jde pak o rostliny. V tomto kontextu je také důležité si uvědomit, že výskyt sekundárních metabolitů (množství a typy) je úzce spjata s jejich geografickým výskytem. Tedy složení a výskyt jednotlivých sekundárních metabolitů v rostlinách nezávisí pouze na typu (čeleď, rod, druh) rostliny, ale i na tom, kde roste a kdy daný vzorek zkoumáme. Odpověď rostliny na lokální podmínky (stres, atak herbivorů, vegetativní období atd.) je totiž lokálně specifická. Produkce a účinek sekundárních metabolitů pak obecně zvyšuje kvalitu života rostlin a tyto látky pak mimo jiné plní funkci atraktantů a repelentů, dále funkci ochranou, stres redukující a komunikační (dorozumívání se s ostatními rostlinami v okolí či se symbiotickými organismy).<sup>2</sup> V současnosti je popsána široká škála přírodních látek tohoto typu a jejich biologických účinků. Obecně lze sekundární metabolity rozdělit do tří základních skupin: alkaloidy, terpeny a fenylypropanoidy. Poslední zmiňované skupině je pak věnována tato práce jak z pohledu teoretického, tak praktického.

#### Alkaloidy

Alkaloidy tvoří zhruba 20 % všech rostlinných sekundárních metabolitů, a z pohledu jejich vlastností to jsou látky, jež obsahují alespoň jeden „bazický“ atom dusíku navázaný v heterocyklu.<sup>3</sup> Biosyntéza alkaloidů je velice rozličná, alkaloidy jsou klasifikovány podle prekurzorů, z kterých jsou následně biosyntetizovány. Pro představu zmíním prekurzory jako L-tryptofan (**Trp**), který je výchozím produktem pro syntézu indolových alkaloidů (tzv. námelové alkaloidy), zatímco isochinolinové alkaloidy jako např. morfin (**1**) a kodein (**2**) (Obr. 1) vycházejí z L-tyrosinu (**Tyr**). **Trp** a **Tyr** jsou v rostlině biosyntetizovány šikimátovou dráhou, která je konkrétněji popsána dále v této kapitole (Obr. 13).<sup>4</sup> Z aminokyselin L-argininu (**3**) a L-ornithinu (**4**) vychází společný prekurzor putrescin (**5**) (Obr. 2), z kterého jsou následnými enzymatickými reakcemi biosyntetizovány tropanové alkaloidy, jako např. skopolamin (**6**) a atropin (**7**), nebo pyridinové alkaloidy, např. nikotin (**8**).<sup>5,6</sup>



Obr. 1. Alkaloidy: isochinolinové alkaloidy morfin (1) a kodein (2) s modře vyznačeným isochinolinovým systémem, tropanové alkaloidy skopolamin (6) a atropin (7) se zeleně vyznačeným tropanovým kruhem, koniin (8), nikotin (9) a kofein (10)

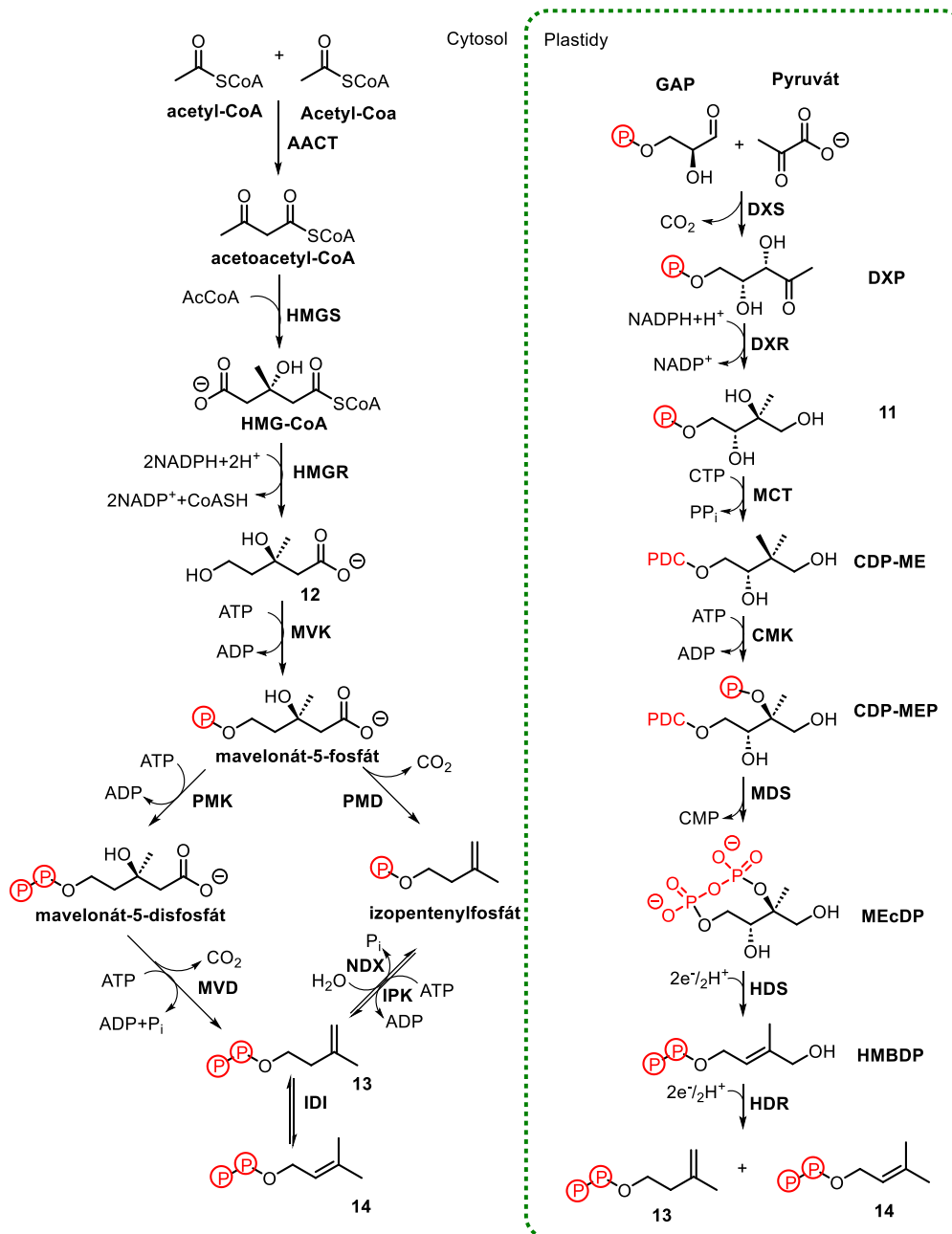


Obr. 2. Aminokyseliny L-arginin (3) a L-ornithin (4) a z nich vycházející prekurzor putrescin (5) pro biosyntézu tropanových alkaloidů

V rostlinách alkaloidy obecně zastávají nejčastěji obrannou funkci proti herbivorům. Biologické účinky alkaloidů na člověka jsou známe už tisíce let. Již ve 14. století př. n. l. byl ve východním Středozeří používán odvar z máku setého obsahující morfinové alkaloidy jako např. morfin (1) a kodein (2).<sup>7</sup> Roku 399 př. n. l. Sokrates vypil extrakt bolehlavu plamatého, obsahující mimo jiné alkaloid koniin (9), který byl zodpovědný za jeho smrt.<sup>8</sup> Kleopatra pro zvětšení očních zornic používala extrakt blínu černého. Blín černý patří do čeledi lilkovitých, u kterých se vyskytují tropanové alkaloidy jako skopolamin (6) a atropin (7). V současnosti jsou alkaloidy využívány zejména jako narkotika (již zmiňovaný morfin (1)), stimulanty, např. kofein (10) a nikotin (8), či jedy.

### Terpeny a terpenoidy

Terpeny a terpenoidy jsou největší skupinou sekundárních metabolitů a v rostlinách jsou biosyntetizovány dráhou 2-methyl-D-erythriol-4-fosfátu (11) v plastidech a dráhou kyseliny mevalonové (12) v cytosolu.<sup>9</sup> Obě dráhy jsou detailněji vyobrazeny na Obr. 3. Konečné produkty jsou v obou případech stejné – prekurzory izopentenylidifosfát (13) a dimethylallyldifosfát (14), které jsou následně enzymaticky kondenzovány a defosforylovány do C5 izoprenové jednotky.<sup>10</sup> Izoprenová jednotka, tedy 2-methylbuta-1,3-dien (15) (Obr. 4), je pak základní jednotkou, z které se skládají terpeny a terpenoidy.

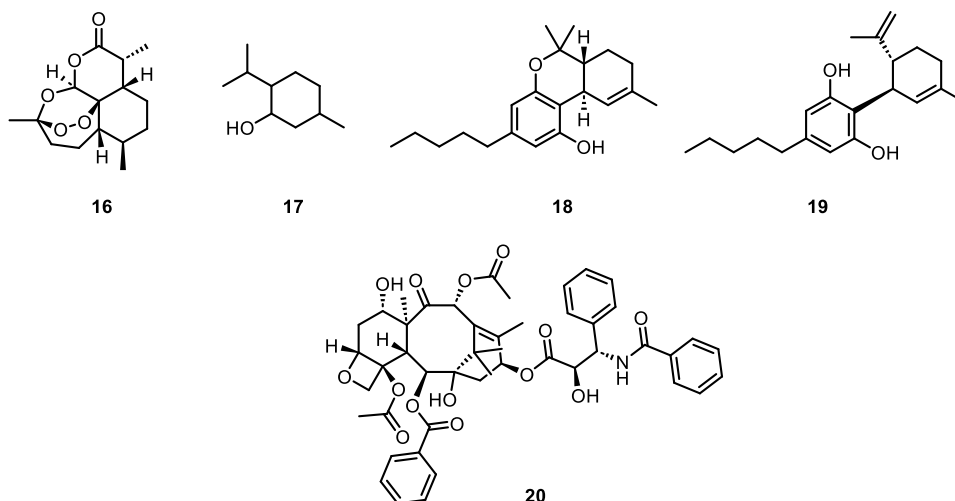


Obr. 3. Schematické znázornění biosyntézy hlavních prekurzorů pro syntézu terpenů a terpenoidů v rostlinách: v plastidech via dráhu 2-methyl-D-erythriol-4-fosfátu (11). Glycerinaldehyd-3-fosfát GAP, 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát DXP, 4-(cytidin-5'-difosfo)-2C-methyl-D-erythritol CDP-ME, 4-(cytidin-5'-difosfo)-2C-methyl-D-erythritol-2-fosfát CDP-MEP, 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát MEcDP, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát HMBDP. Enzymy: 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát syntáza DXS, 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát reduktóizomerasa DXR, 2C-methyl-D-erythritol-4-fosfát cytidyltransferasa MCT, 4-(cytidin-5'-difosfo)-2C-methyl-D-erythritol kinasa CMK, 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyklodifosfát syntáza MDS, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát syntáza HDS, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldifosfát reduktasa HDR. V cytosolu via dráhu kyseliny mevalonové (12) – koenzym A CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA HMGCoA. Enzymy: acetoacetyl-CoA thiolasa AACT, hydroxymethylglutaryl-CoA syntáza HMGS, hydroxymethylglutaryl-CoA reduktasa HMGR, mevalonát kinasa MVK, fosfomevalonát dekarboxyláza PMD, mevalonát-5-fosfát dekarboxyláza MVD, nudix hydrolasa NDX, isopentylfosfát kinasa IPK, izopentylfosfát kinasa IDI. V obou případech konečné produkty izopentenyldifosfát (13) a dimethylallyldifosfát (14).



Obr. 4. 2-methyl-1,3-dien (15)

Počet izoprenových jednotek a způsob jejich skládání je pak odražen v jejich klasifikaci. Terpeny jsou látky, jež obsahují pouze vazby C–H vycházející přímo z biosyntézy. Jako terpenoidy pak značíme látky následné (mono)oxidace, jež mají alespoň jednu vazbu C–O. S počtem izoprenových jednotek souvisí i jejich biosyntéza – dráhou 2-methyl-D-erythriol-4-fosfátu (**11**) jsou syntetizovány monoterpeny (obsahují dvě izoprenové jednotky), diterpeny (čtyři izoprenové jednotky) a tetraterpeny (osm izoprenových jednotek), zatímco seskviterpeny (tři izoprenové jednotky), steroly a triterpeny (šest izoprenových jednotek) vychází z dráhy kyseliny mevalonové (**12**).<sup>11</sup>



Obr. 5. Strukturální znázornění artemisininu (16), mentholu (17), tetrahydrokannabinolu (18), kanabidiolu (19) a paklitaxelu (20)

Terpeny a terpenoidy vykazují rozmanité biologické vlastnosti. U rostlin se pak některé terpenoidy podílejí jak na růstu, tak na antimikrobiální či antifungální funkci.<sup>7</sup> Izoprenové jednotky se nachází i v některých fytohormonech, např. v gibberelinech (diterpeny) či brassinosteroidech (triterpeny). Ve farmacii se terpeny a terpenoidy využívají jako antimalarika (artemisinin (**16**), za jehož objev byla udělena Nobelova cena čínské vědkyni Tchu Jou-jou), analgetika (menthol (**17**), kanabinoidy jako tetrahydrokannabinol (THC, **18**) a kanabidiol (CBD, **19**)) a cytostatika, např. paklitaxel (**20**) izolovaný z tisu tichomořského, obchodně prodáván pod jménem Taxol (Obr. 5).<sup>11</sup> Terpeny jsou také charakteristické výraznou vůní, díky čemuž jsou hojně využívány v kosmetice a potravinářském průmyslu.

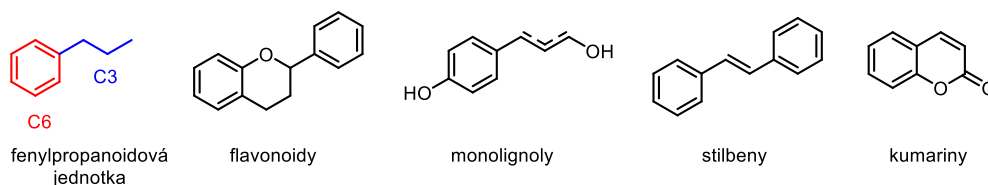
## 2.2 Fenylpropanoidy

### 2.2.1 Charakteristika

Fenylpropanoidy jsou podskupinou fenolických sloučenin, jsou významnou a velice rozmanitou skupinou sekundárních metabolitů, a to již z pohledu jejich struktury, zastoupení v rostlinné říši nebo z pohledu jejich biologické aktivity. Uvádí se, že zhruba 40 % uhlíku nacházejícího se v rostlinách v organických sloučeninách je vázáno právě ve fenolických sloučeninách.<sup>7</sup> Fenylpropanoidy jsou, co se týká jejich variability, velice rozmanitou skupinou, ale všechny ve své struktuře obsahují aromatické jádro (C6) s alespoň jednou hydroxylovou skupinou a postranní propylový řetězec (C3), anebo alespoň obsahují fenolickou skupinu.<sup>12</sup> Hydroxylová skupina na benzenu je v porovnání s alifaticky vázanými hydroxylovými skupinami „kyselejší“, respektive má nižší disociační konstantu  $pK_a$ , protože aromatické jádro stabilizuje vzniklý anion – konjugovanou formu původního fenolu. Fenolické látky pak obecně snadno podléhají oxidačním reakcím (oxidace pomocí vzdušného kyslíku) a v případě fenylpropanoidů pak tato vlastnost těmito molekulám umožňuje díky postrannímu řetězci ještě další typy reaktivity – dimerizaci spojenou s následnou oligo- a polymerizací.<sup>13</sup> A tak si rostliny vytvářejí svoji ligninovou opěrnou soustavu.

### 2.2.2 Struktura fenylpropanoidů

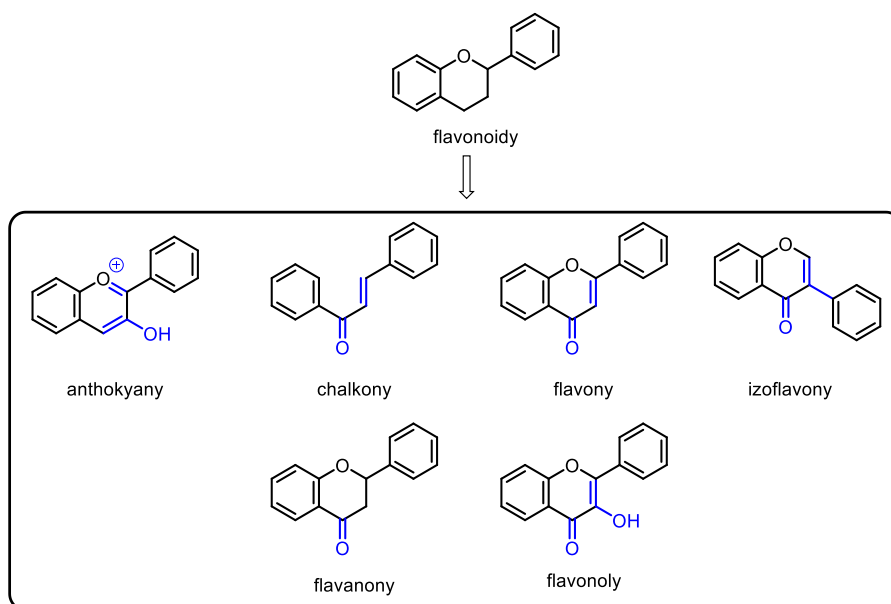
Z hlediska struktury se v základní fenylpropanoidové jednotce nachází fenyl, jak bylo již dříve předestřeno, na kterém je připojen propanový řetězec, jedná se o tzv. C6-C3 skeleton (Obr. 6). Biologická aktivita fenylpropanoidů je pak úzce spjata s pozicí propylového řetězce vůči přítomné hydroxylové skupině, stupněm nasycenosti tohoto řetězce stejně jako s přítomnými funkčními skupinami a dalšími substituenty na fenylovém jádře.<sup>12</sup> Právě na základě těchto modifikací lze rozdělit do několika podskupin jako jsou flavonoidy, monolignoly, stilbeny a kumariny.



Obr. 6. Obecné strukturní vyobrazení základní fenylpropanoidové jednotky C6-C3 a podskupin fenylpropanoidů

## Flavonoidy

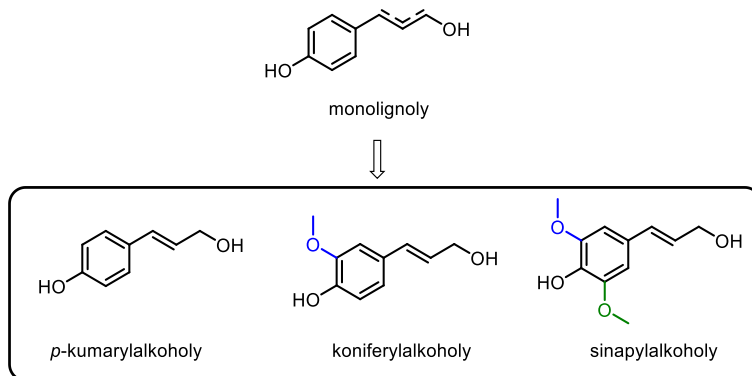
Flavonoidy jsou nejrozšířenější skupinou fenyylpropanoidů v rostlinách.<sup>12</sup> Strukturně jsou založeny na uhlíkovém řetězci o patnácti uhlících členěných do dvou benzenových jader spojených heterocyklickým pyranovým kruhem (C6-C3-C6). Flavonoidy se dále dělí do podskupin, jimiž jsou anthokyany, proantokyanidy (kondenzované taniny), chalkony, flavony, isoflavony, flavanony a flavonoly.<sup>14</sup> O jakou podskupinu se jedná, rozhoduje poloha, ve které je připojen druhý benzenový kruh, ale také stupeň nasycení a oxidace heterocyklického kruhu (Obr. 7). Flavonoidy jsou ve formě glykosidů skladovány ve vakuolách, běžně se vyskytují v květech, listech a semenech. Mezi jejich hlavní funkce v rostlinách patří zbarvování květů a plodů, čímž plní roli atraktantů, neméně důležité jsou při absorpci UV světla a ochraně rostliny před abiotickým stresem.<sup>7</sup>



Obr. 7. Obecné strukturální vzorce flavonoidů a podskupin flavonoidů

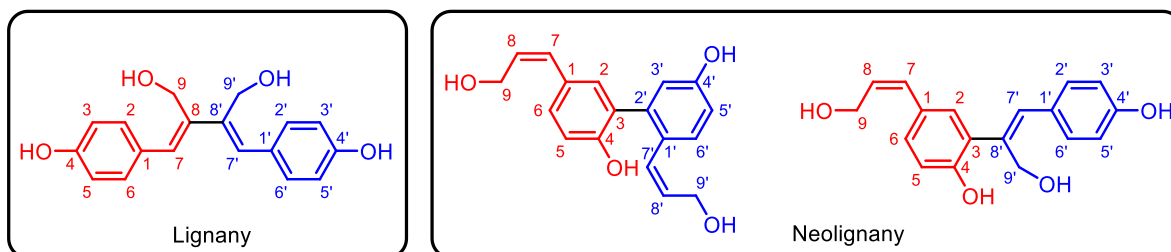
## Monolignoly

Monolignoly jsou charakteristické C6-C3 strukturálním prvkem obsahujícím alespoň jednu hydroxylovou skupinu a propionový postranní řetězec zakončený alifatickým uhlíkem s navázanou hydroxylovou skupinou.<sup>12</sup> Rozlišují se tři základní typy monolignolů, a to *p*-kumarylalkoholy, koniferylalkoholy a sinapyalkoholy (Obr. 8).



Obr. 8. Obecné strukturální vzorce monolignolů a podskupin monolignolů

Monolignoly jsou důležitými sekundárními metabolity, a to nejen z hlediska jejich biologické aktivity, ale především protože slouží jako základní stavební kameny pro syntézu lignanů a neolignanů (dimery monolignolů) a zejména ligninu (polymer).<sup>7,12</sup> Lignin je po celulóze druhým nejvíce zastoupeným biopolymerem v přírodě a ve své struktuře váže okolo třiceti procent fixovaného uhlíku v rostlině. Ze strukturálního pohledu pak tvoří dlouhé řetězce monolignolů a v rostlině zastává důležitou roli při jejím růstu, hlavně pak dřevin. Lignin totiž zpevňuje stěnu buněk cévního svazku. Lignany nedosahují takového stupně polymerizace jako ligniny, jedná se primárně o dimery, jež se skládají ze dvou jednotek monolignolu, které jsou navzájem spojeny v pozici C8-C8' (Obr. 9).<sup>13</sup> V případě jiného typu vázání se pak takové látky nazývají neolignany.

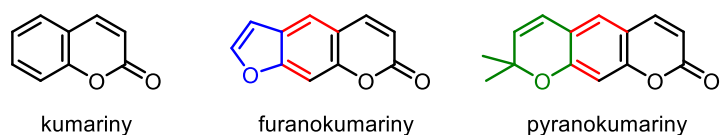


Obr. 9. Obecné strukturální vzorce lignanů a neolignanů

## Kumariny

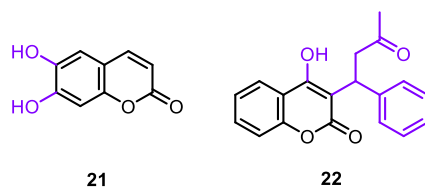
Základní struktura kumarinů je založena na kondenzovaném benzenovém a  $\alpha$ -pyronovém kruhu (tzv.  $\alpha$ -benzopyran se strukturou C6-C3, Obr. 10).<sup>12</sup> Mezi základní kumariny se řadí např. eskuletin (21, Obr. 11), vyskytující se mimo jiné ve *Fraxinus ornus* (jasan zimnář), u kterého byla prokázána antioxidační a protizánětlivá aktivita skrze inhibici *cyklooxygenáz* a *lipoxygenáz*.<sup>15</sup> Dále mohou být na benzenovém kruhu nakondenzovány pyran či furan. Takové sloučeniny jsou pak nazývány pyranokumariny a furanokumariny (Obr. 10). Poslední podskupinou jsou kumariny se substituční skupinou přímo v pyronovém kruhu.





Obr. 10. Základní struktura kumarinů, furanokumarinů a pyranokumarinů

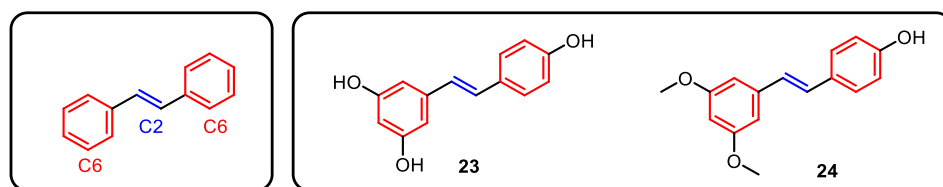
V rostlinných buňkách jsou kumariny skladovány ve vakuolách v podobě glykosylovaných konjugátů. Z hlediska jejich biologické aktivity jsou kumariny skupinou fenylypropanoidů, u kterých byla prokázána jejich schopnost vázat a mobilizovat železo, čehož rostliny využívají hlavně v půdách s nedostatkem železa.<sup>16</sup> Kumariny jsou z tohoto důvodu lokalizovány převážně v kořenovém systému, avšak jejich výskyt byl potvrzen i v ostatních rostlinných orgánech. Mezi kumariny se řadí např. warfarin (**22**) využívaný jako antikoagulant.<sup>7</sup>



Obr. 11. Strukturní vzorce kumarinů eskuletinu (21) a warfarinu (22)

## Stilbeny

Stilbeny, také nazývané 1,2-difenylethyleny, obsahují dvě benzenová jádra spojena dvouuhlíkatým ethenovým řetězcem (C6-C2-C6).<sup>12</sup> Dále se odlišují počtem a pozicí hydroxylových skupin na nich připojených. Podílí se na ochraně rostliny před patogeny, herbivory a oddalují klíčení semen.<sup>7</sup> Významným zástupcem je např. resveratrol (**23**), který je využíván jako doplněk stravy kvůli svým antioxidačním, kardioprotektivním a protirakovinným vlastnostem.<sup>17</sup> Dalším hojně testovaným stilbenem je pterostilben (**24**) s podobnými vlastnostmi jako resveratrol (**23**) (Obr. 12). Hlavní zdrojem stilbenů je ovoce jako hrozny, borůvky, kokos a arašídy.



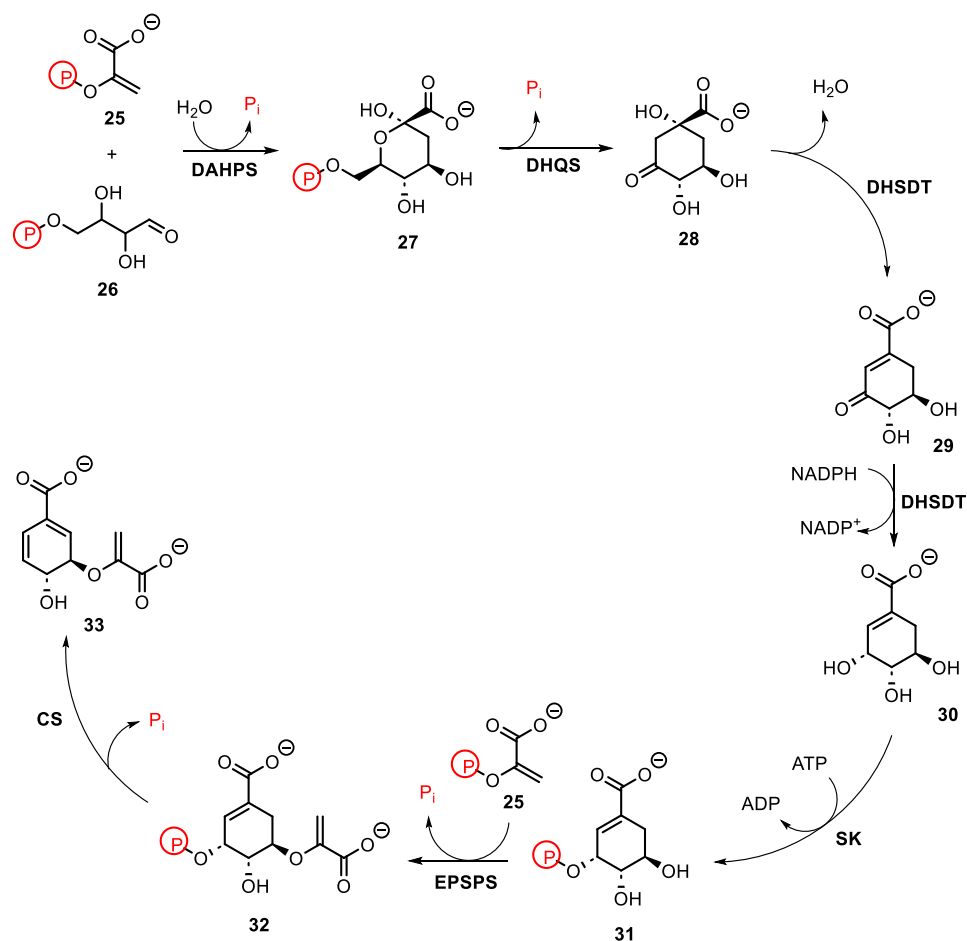
Obr. 12. Základní strukturní vzorce stilbenů se strukturou C6-C3-C6 a stilbenů resveratrolu (23) a pterostilbenu (24)

## 2.2.3 Biosyntéza fenylpropanoidů

### 2.2.3.1 Šikimátová dráha

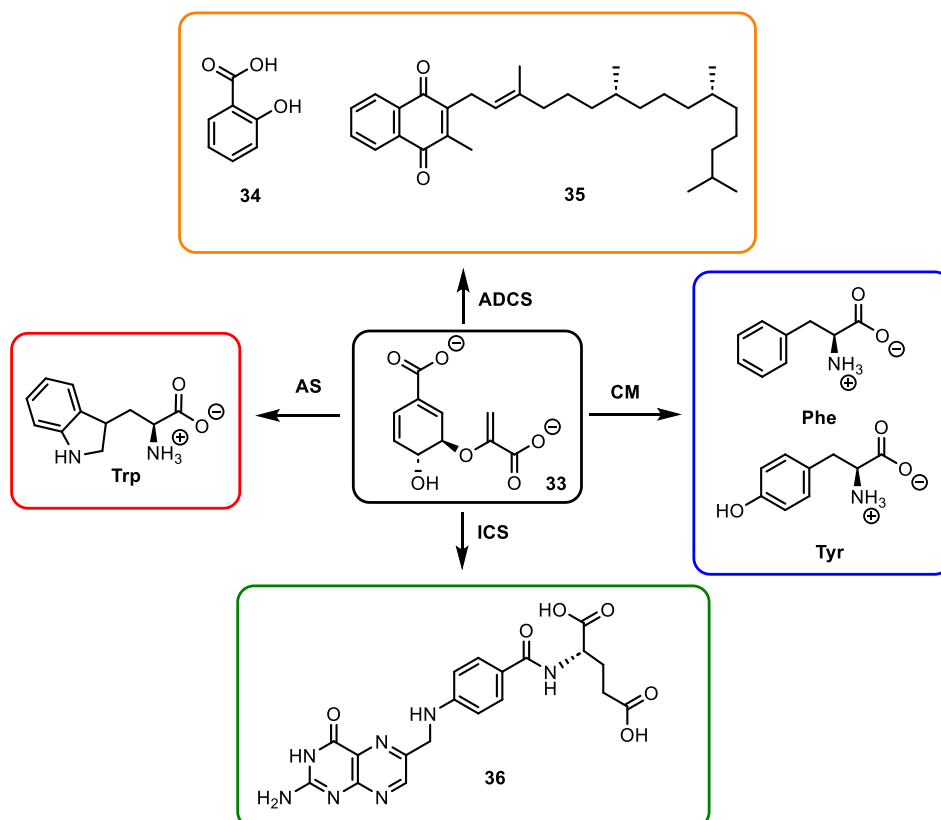
Fenylpropanoidy vycházejí z aromatických aminokyselin syntetizovaných prostřednictvím šikimátové dráhy, která tvoří součást metabolismu společnou pro mikroorganismy a rostliny.<sup>18,19</sup> Z aromatických aminokyselin jsou v rostlinách dále syntetizovány mnohé sekundární, a i některé primární metabolity. Z pohledu rostlin pak vypíchněme zejména fytohormony: auxiny, kyselinu indol-3-acetátovou a kyselinu salicylovou. Klíčovou roli v šikimátové dráze hrají chloroplasty, kde se odehrávají všechny reakce této dráhy.

Šikimátová biosyntetická dráha je souborem sedmi enzymatických reakcí (Obr. 13).<sup>19</sup> V první z nich dochází ke kondenzaci fosfoenylpyruvátu (PEP, **25**) a erythrosa-4-fosfátu (E4P, **26**) za vzniku 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu (DAHP, **27**) a anorganického fosfátu. Této reakce se účastní enzym *DAHP synthasa* (DAHPS), u rostlin konkrétně DAHPS druhého typu. V následujícím kroku dochází za přítomnosti enzymu *3-dehydrochinát synthasy* (DHQS) k eliminaci fosfátu z DAHP a k cyklizaci za vzniku 3-dehydrochinátu (DHQ, **28**), jenž tvoří jádro konečných aromatických aminokyselin. Při třetí reakci je látka **28** dehydratován na 3-dehydrošikimát (DHS, **29**) a dochází ke vzniku první dvojné vazby v kruhu. Enzym katalyzující tuto reakci se nazývá *3-dehydrochinát dehydratasa* nebo také *šikimát dehydratasa* a účastní se i čtvrté reakce. DHS **29** je následně v další reakci redukován za vzniku šikimátu (**30**). V pátém kroku dochází díky *šikimát kinase* k fosforylaci šikimátu (**30**) a vzniku šikimát-3-fosfátu (S3P, **31**) za spotřeby ATP. V následující šesté reakci je třeba přítomnost druhé molekuly PEP (**25**), která kondenzuje S3P (**31**) za vzniku 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu (EPSP, **32**) a fosfátu, přičemž i tato reakce probíhá za enzymové katalýzy, konkrétně se jedná o *EPSP synthasu* (EPSPS). V poslední sedmé reakci dochází v přítomnosti *chorismát synthasy* (CS) k 1,4-*trans*-eliminaci fosfátu a molekuly vodíku z EPSP (**31**).



Obr. 13. Schematické vyobrazení šikimátové dráhy. Fosfoenylpyruvát (25), erythrosa-4-fosfát (26), 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát (27), 3-dehydrochinát (28), 3-dehydrošikimát (29), šikimát (30), šikimát-3-fosfát (31), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (32), chorismát (33). Enzymy: DAHP synthasa DAHPS, DHQ synthasa DHQS, 3-dehydrochinát dehydratasa DHSdT, šikimát kinasa SK, EPSP synthasa EPSPS, chorismát synthasa CS.

Konečným produktem dráhy je chorismát (33), který dále vstupuje do čtyř různých metabolických drah, vedoucí k syntéze L-tryptofanu (**Trp**), L-fenylalaninu (**Phe**), L-tyrosinu (**Tyr**), kyseliny salicylové (34), fylochinonu (35), a naposled kyseliny listové (36) (Obr. 14).<sup>4</sup> Enzymy vázající se v této fázi na chorismát jsou *chorismát mutasa* (CM), *anthranilát synthasa* (AS), *isochorismát synthasa* (ICS) a *aminodeoxychorismát synthasa* (ADCS). AS katalyzuje první ze sedmi reakcí vedoucí k syntéze **Trp**, z kterého jsou následně syntetizovány např. indolové alkaloidy. Z ICS je syntetizován fylochinon (35) a kyselina salicylová (34). ADCS vede k syntéze kyseliny listové (36).



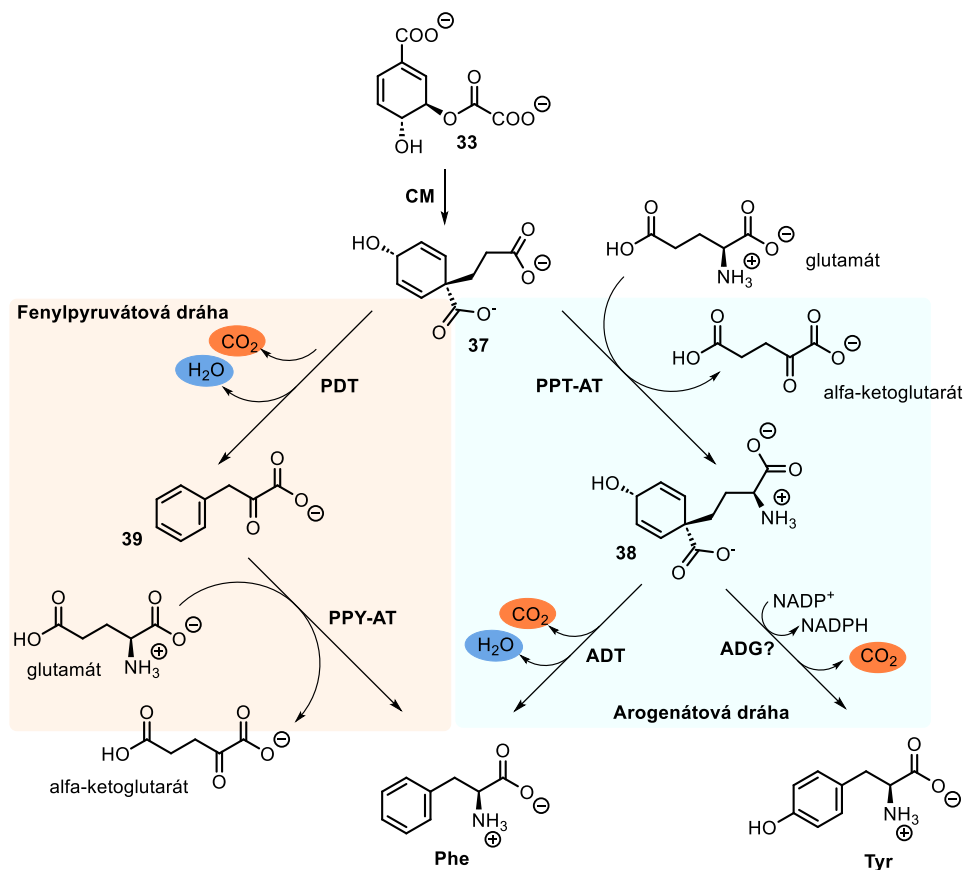
Obr. 14. Schematické znázornění syntézy L-tryptofanu Trp, L-fenylalaninu Phe, L-tyrosinu Tyr, kyseliny salicylové (34), ftylochinonu (35) a kyseliny listové (36) z chorismátu (33). Enzymy: aminodeoxychorismát synthasa ADCS, chorismát mutasa CM, anthranilát synthasa AS, isochorismát synthasa ICS

### 2.2.3.2 Biosyntéza L-fenylalaninu a L-tyrosinu

Syntéza **Phe** a **Tyr** se stejně jako šikimátová dráha odehrává v chloroplastech (Obr. 15). Po vazbě CM na chorismát (33) vzniká prefenát (37), z něhož je arogenátovou nebo fenylpyruvátovou (popřípadě 4-hydroxyfenylpyruvátovou) cestou syntetizován **Phe** a **Tyr**.<sup>4</sup> U rostlin převažuje arogenátová dráha, čímž se liší od enterobakterií a kvasinek, v nichž probíhá syntéza sekundárních metabolitů vycházející z **Phe** a **Tyr** skrze dráhu fenylpyruvátovou.<sup>7</sup>

V arogenátové dráze dochází k transaminaci prefenátu na L-arogenát (38) za účasti enzymu *prefenát aminotransferasy* (PPT-AT).<sup>4</sup> Tímto enzymem je přenášena aminoskupina z L-glutamátu či L-asparátu. Arogenát (38) je dále dehydratován a dekarboxylován na **Phe**. Této reakce se účastní *arogenát dehydratasa* (ADT). Ve fenylpyruvátové dráze se reversně odehrávají stejné reakce. Prefenát (37) je nejprve *prefenát dehydratasou* (PDT) dehydratován/dekarboxylován za vzniku fenylpyruvátu (39), poté až následuje transaminace na **Phe**. Tato reakce je katalyzována *fenylpyruvát aminotransferasou* (PPY-AT).

Syntéza **Tyr** probíhá shodně a liší se až od fáze vzniku arogenátu (**38**). Zde dochází vlivem *arogenát dehydrogenasy* k dekarboxylaci arogenátu (**38**) za redukce  $\text{NADP}^+$  na  $\text{NADPH}$  a vzniku **Tyr**. Ačkoliv **Tyr** obsahuje reaktivní hydroxylovou skupinu a mohl by se tak jevit jako výhodnější prekurzor pro pokračující syntézu sekundárních metabolitů, bylo prokázáno, že u rostlin je ve většině případech jako prekurzor upřednostňován **Phe**.<sup>7</sup> Biosyntetická dráha je následně autoregulována tvorbou **Phe**, neboť jeho vysoká hladina pak inhibuje tvorbu prefenátu (**37**) a arogenátu (**38**).<sup>20</sup>



Obr. 15. Schematické znázornění biosyntézy *L*-tyrosinu (**Tyr**) a *L*-fenylalaninu (**Phe**) via fenylpyruvátovou a arogenátovou dráhu v chloroplastu v rostlinách. Chorismát (**33**), prefenát (**37**), arogenát (**38**), fenylpyruvát (**39**). Enzymy: chorismát mutasa CM, prefenát aminotransferasa PPT-AP, arogenát dehydrogenasa ADG, arogenát dehydratasa ADT, prefenát dehydratasa PDT, fenylpyruvát aminotransferasa PPY-AT

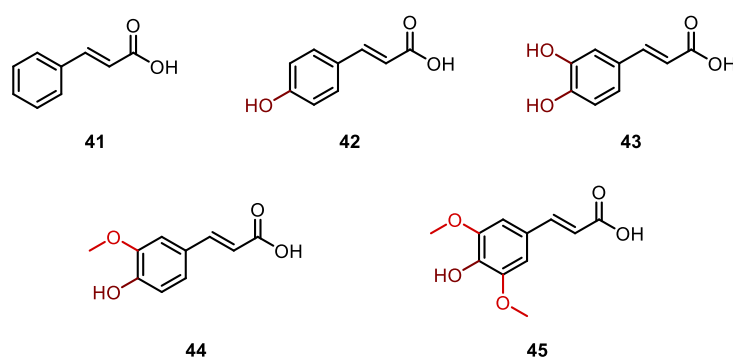
### 2.2.3.3 Fenylpropanoidová a fenylprapanoid-acetátová dráha

Metabolická dráha vedoucí k syntéze fenylpropanoidů je lokalizována v cytosolu. Valná většina fenylpropanoidů je syntetizována fenylpropanoidovou a fenylpropanoid-acetátovou dráhou, které jsou do určité míry propojeny, shodují se v procesech syntézy hlavního produktu *p*-kumaroyl-CoA (**40**) z **Phe**.<sup>7,20</sup> Z *p*-kumaroyl-CoA (**40**) jsou následně syntetizovány ostatní fenylpropanoidy, a to ať již s C6-C3-C6 strukturním motivem (via fenylpropanoid-acetátovou dráhu), anebo s C6-C3 motivem (via fenylpropanoidovou dráhu). Produktem fenylpropanoid-acetátové dráhy jsou pak flavonoidy a stilbeny.

V případě fenylypropanoidové dráhy dochází k biosyntéze monolignanů (lignanů a neolignanů), kumarinů a následně i ligninu (polymer).

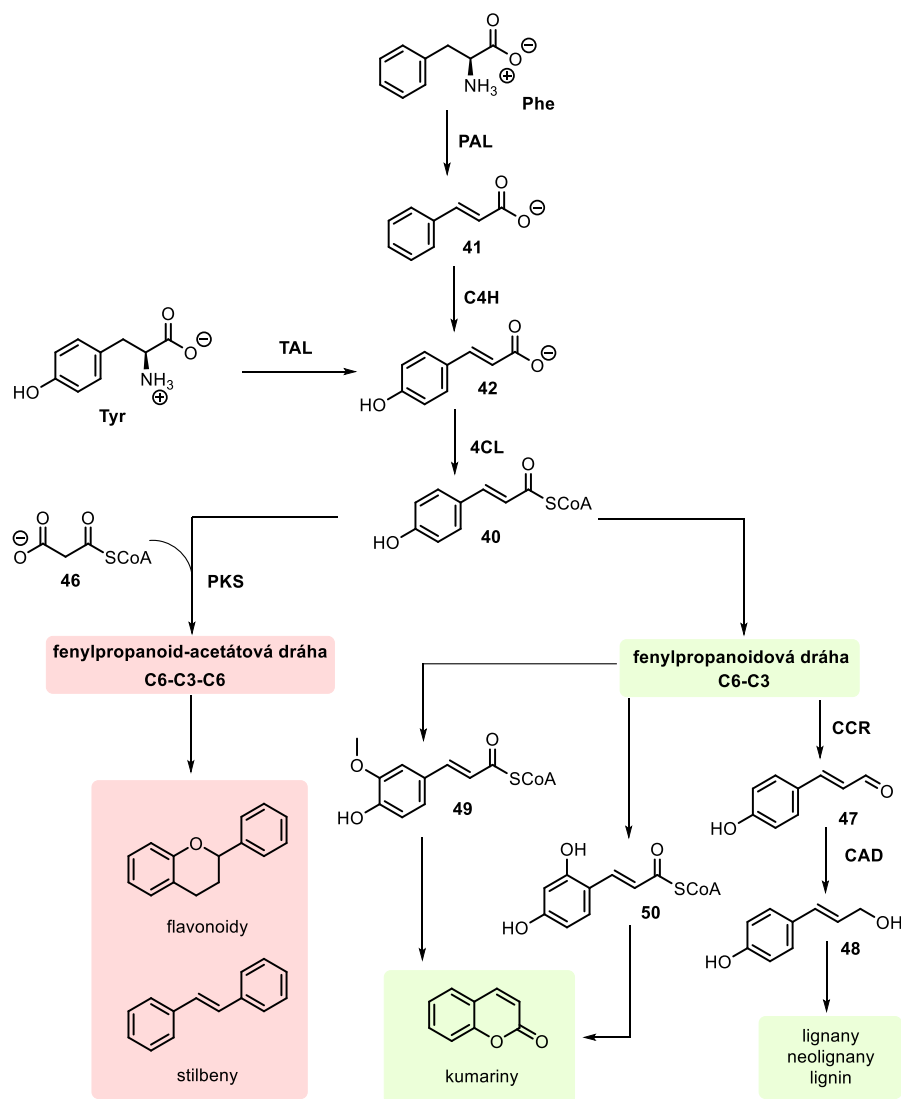
Schematické znázornění biosyntézy fenylypropanoidů je pak zachyceno na Obr. 17. Biosyntéza vychází z L-fenylalaninu (**Phe**), který je v prvním kroku konvertován na *trans*-cinamát (**41**) pomocí *fenylalanin amonium liasy* (PAL).<sup>21</sup> Při této reakci dochází k deaminaci za uvolnění amoniaku, který je pomocí PAL transportován do cytosolu, kde dochází k jeho uvolnění ve formě přeměně amonného kationtu.

Následuje hydroxylace cinamátu (**41**) působením *cinamát-4-hydroxylasy* (C4H) za vzniku *p*-kumarátu (4-kumarátu) (**42**), ten je mj. syntetizována i z **Tyr** deaminací pomocí *tyrosin amonium liasy* (TAL). C4H patří do rodiny monooxygenas P450 a pro svoji funkci vyžaduje přítomnost molekulárního kyslíku.<sup>7</sup> C4H pak z enzymů vykazuje největší afinitu vůči cinamátu (**41**) jako substrátu a v případě jeho potlačení pak dochází k syntéze dalších obecně minoritních látek. Enzym *4-kumarát-CoA ligasa* (4CL) katalyzuje transformaci *p*-kumarátu (**42**) na *p*-kumaroyl-CoA (**40**) za spotřeby ATP.



Obr. 16. Strukturní vzorce kyseliny skořicové (**41**) a jejích derivátů kyseliny kumarové (**42**), kávové (**43**), ferulové (**44**) a sinapové (**45**).

Kyselina skořicová (**41**) je pak transformována následujícími enzymatickými oxidačními reakcemi mimo kyseliny kumarové (**42**) také postupně i na kyselinu kávovou (**43**), ferulovou (**44**) a sinapovou (**45**). Tyto kyseliny se od sebe liší počtem navázaných hydroxylů, respektive jejich methylovaných forem (Obr. 16). Tyto deriváty kyseliny skořicové (**41**) slouží jako mezikroky při biosyntéze některých fenylypropanoidů (např. monolignanů).<sup>7,21</sup> Nejedná se ovšem o intermediáty přítomné ve všech rostlinách, většina rostlin syntetizuje pouze cinamát (**41**) a *p*-kumarát (**42**).



Obr. 17. Schematické znázornění průběhu biosyntézy fenylopropanoidů. L-fenylalanin (Phe), L-tyrosin (Tyr), cinamát (41), p-kumarát (42), p-kumarát-CoA (40), malonyl-CoA (46), p-kumaroylaldehyd (47), p-kumarylalkohol (48), p-feruoyl-CoA (49), 2,4-dihydroxycinamoyl-CoA (50). Enzymy: fenylalanin amonium lyasa PAL, tyrosin amonium lyasa TAL, cinamát-4-hydroxylasa C4H, 4-kumarát-CoA ligasa 4CL, polyketid synthasa PKS, cinamoyl-CoA oxidoreduktasa CCR, cinamylalkohol dehydrogenasa CAD

Fenylpropanoid-acetátová dráha je napojená na metabolismus mastných kyselin.<sup>7</sup> p-Kumaroyl-CoA (40) následně reaguje s malonyl-CoA (46) a vznikají jednoduché polyketidy, z nichž jsou následně syntetizovány flavonoidy a stilbeny. Syntéza polyketidů je umožněna enzymem *polyketid synthasou* (PKS), která zužitkovává p-kumaroyl-CoA namísto acetyl-CoA. Ve fenylopropanoidové dráze je v přítomnosti *cinamoyl-CoA oxidoreduktasy* (CCR) z p-kumaroyl-CoA (40) vytvořen p-kumaroylaldehyd (47), který je následně zredukován *cinamylalkohol dehydrogenasou* (CAD) na p-kumarylalkohol (48). Z tohoto monolignolu jsou dále syntetizovány lignany a neolignany, respektive lignin. Kumariny jsou syntetizovány přímo z p-kumaroyl-CoA (40) konverzí na p-feruoyl-CoA (49) či 2,4-dihydroxycinamoyl-CoA (50).

## 2.2.4 Biologická aktivita fenylpropanoidů

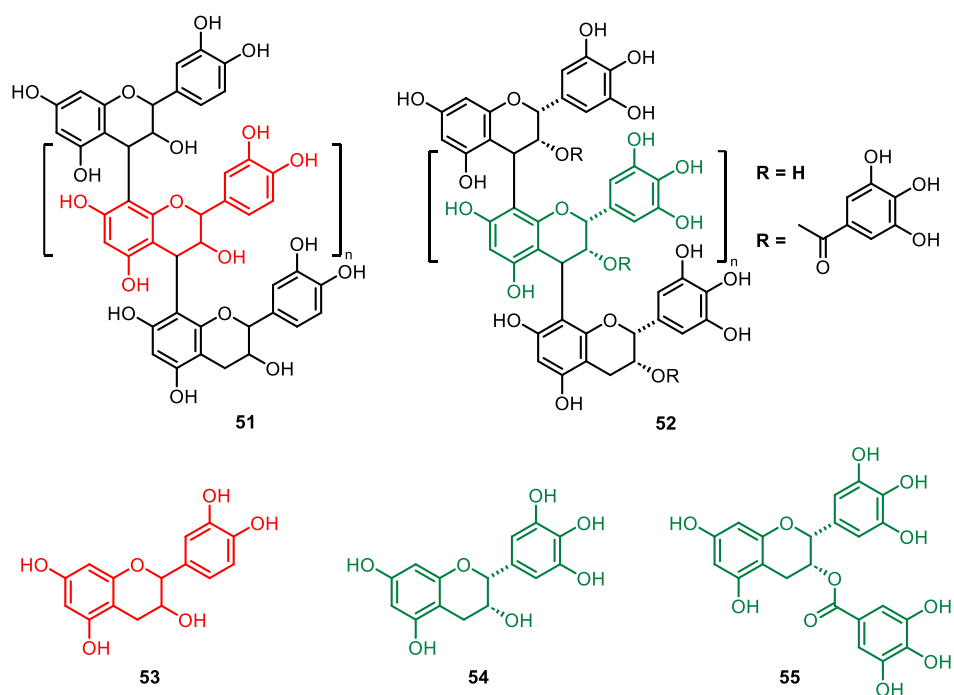
Z definice se biologicky aktivní látkou rozumí taková látka přírodního anebo syntetického charakteru, jenž je schopná interakce s buňkou, tkání (pletivem) či organismem bez ohledu na to, jestli je tento efekt pozitivní anebo negativní.<sup>22</sup> Doposud bylo objeveno mnoho fenylpropanoidů s rozličnou biologickou aktivitou, jež se pohybuje od antiproliferačních, mykotoxických, antivirotických až po fungicidní účinky, a proto nelze získat ucelený obraz o jejich vlastnostech a účincích. Dále platí, že účinek různých fenylpropanoidů je specifický a nelze tak přikládat konkrétní vlastnost celé třídě látek. V následujících odstavcích jsou zmíněny pouze nejvýznačnější z doposud objasněných funkcí fenylpropanoidů. Mezi nejzajímavější účinky fenylpropanoidů pro člověka patří jejich antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivý a neuroprotektivní účinek, mimo jiné byl také prokázán vliv na ledviny, játra, proti rakovině a *diabetes mellitus*.

### 2.2.4.1 Antimikrobiální aktivita

Jak již bylo zmíněno výše, fenylpropanoidy plní v rostlinách mj. obranou funkci vůči rozličným patogenům a plísním, jejich účinek byl pak potvrzen jejich inhibičním účinkem vůči některým bakteriím, houbám a kvasinkám.<sup>21</sup> Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou infekční onemocnění způsobena mikroorganismy stále globální hrozbou, a to hlavně v rozvojových zemích, což spolu s problémy s pojenými s rostoucí rezistencí vůči antibiotikům tvoří z látek s těmito vlastnostmi zajímavý cíl pro jejich studium.<sup>23</sup>

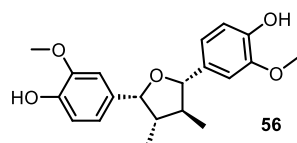
Jako první skupinu s antimikrobiální aktivitou je nutné zmínit skupinu flavonoidů; taniny, neboli třísloviny, které primárně chrání rostlinu před patogeny, a to hlavně houbami.<sup>14</sup> Nízké minimální inhibiční koncentrace (MIC) v rozmezí 0,012 až 1 g/L vykazovaly taniny vůči zástupcům *Bacillus subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Proteus vulgare*, *Staphylococcus aerus* a dalším. Taniny se ve velkém množství nacházejí v čaji, kakau, čiroku a karobových luscích. V přítomnosti kyslíku podléhají taniny autooxidaci, přičemž vzniká velké množství peroxidu vodíku, které zapříčiňuje usmrcení bakteriálních buněk. Velký rozsah hodnot MIC je pak způsoben různými mechanismy oprav oxidativního stresu v prokaryotních buňkách. Mezi taniny se řadí i prokyanidin (**51**) a prodelfinidin (**52**), jedná se o kondenzované taniny neboli tzv. proanthokyanidiny (Obr. 18).<sup>24</sup> Proanthokyanidin **51** se skládá konkrétně z kyanidinu (**53**), proanthokyanidin **52** se pak skládá z jednotek katechinů, a to epigallokatechinu (**54**) a epigallokatechin-3-galátu (EGCG, **55**).<sup>7,25</sup>





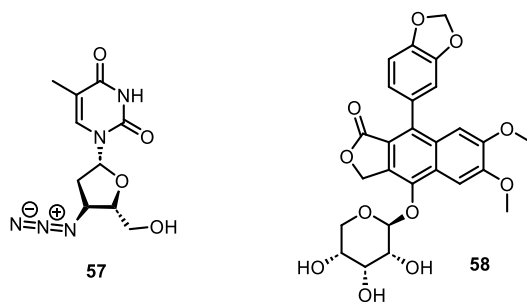
Obr. 18. Struktura anthokyanidinů prokyanidinu (51) a prodelpinidinu (52) skládajících se z jednotek kyanidinu (53) v případě látky 51 a z epigallokatechinu (54) či epigallokatechin-3-galátu (55) v případě látky 52.

Ani výzkum antimikrobiální aktivity lignanů a neolignanů nezůstává upozaděn. Z běžně dostupného koření stojí za zmínku např. muškátový oříšek z muškátovníku vonného (*Myristica fragrans*), v němž se nachází lignan verrukosin (56) (Obr. 19.), který vykazuje aktivitu proti *Streptococcus pneumoniae* způsobujícímu zápal plic a meningitidu.<sup>13</sup> Mechanismem účinku je v tomto případě inhibice sialidázy, jež v konečném důsledku vede k zabránění adhezce, a tudíž i kolonizace.



Obr. 19. Strukturní vzorec verrukosinu (56).

Závažným nevy léčitelným virovým onemocněním je AIDS, které je způsobeno HIV, jímž bylo podle WHO ke konci roku 2022 nakaženo 29 milionů lidí. V současnosti jsou HIV pozitivní pacienti léčeni azidothymidinem (AZT, 57) (Obr. 20), jenž inhibuje reverzní transkriptázu a díky tomu zabraňuje množení viru v těle.<sup>26</sup> Avšak stále neustává výzkum látek, které by vykazovaly stejnou či vyšší aktivitu, případně i s méně závažnými vedlejšími účinky. Mezi takové látky patří například patentiflorin A (58) izolovaný z *Justicia gendarussa*, který vykazuje vyšší aktivitu než AZT proti kmenu HIV-1.<sup>27</sup>

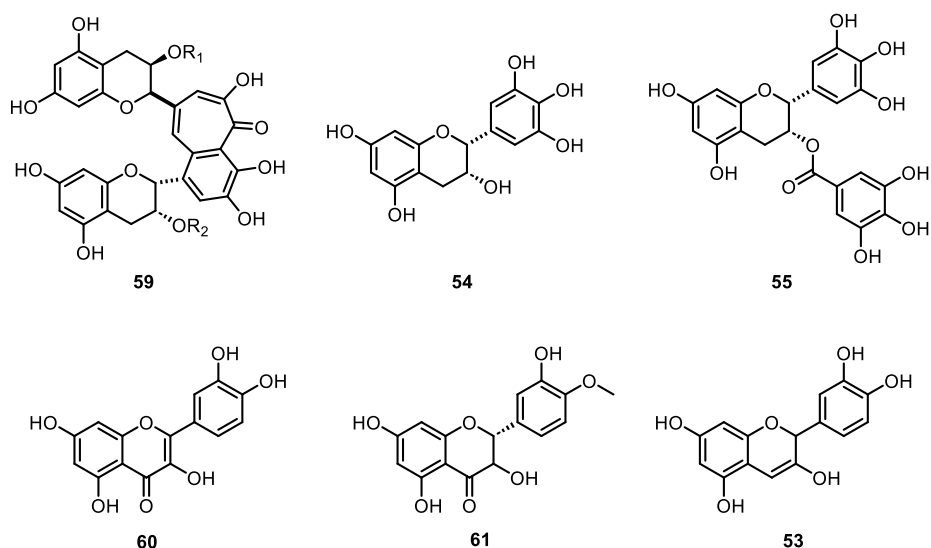


Obr. 20. Strukturní vzorec azidothymidinu (57) a patentiflorinu A (58).

#### 2.2.4.2 Antioxidační aktivita

Akumulace oxidačního stresu v těle může nejenom v pokročilém věku vést k degenerativním onemocněním jako rakovina, kardiovaskulární onemocnění, osteoporóza a nemoci spojené se stárnutím.<sup>28</sup> Při oxidačním stresu se v buňce nachází reaktivní formy kyslíku (ROS), méně reaktivní formy dusíku (NOS), které dále poškozují membránu a způsobují i poškození v DNA či aktivují onkogeny.<sup>23,14</sup> ROS mohou mít podobu singletního molekulárního kyslíku, superoxidu, peroxidu, a hydroxylového radikálu. Antioxidanty vychytávají volné radikály několika způsoby, mezi něž patří přímé vychytávání ROS, inhibice peroxidace lipidů, chelace kovových iontů a vázání proteinu.<sup>21</sup> Antioxidační potenciál fenylypropanoidních lignanů pak závisí na více faktorech, jako je počet hydroxylových skupin, přítomnost aromatického jádra apod.

Významnými antioxidanty z řad flavonoidů jsou theaflaviny (**59**) přítomné v černém čaji a katechiny přítomny v zeleném čaji, ale i v mnoha druzích ovoce (Obr. 21). Jejich vysoká antioxidační aktivita je zapříčiněna přítomností velkého počtu hydroxylových skupin. Výše byly již zmiňovány katechiny epigallokatechin (**54**), jenž se hojně vyskytuje v kakau a EGCG (**55**), jenž je hlavním katechinů v zeleném čaji.<sup>7</sup> Dále pak např. kvercetin (**60**), jenž je jedním z nejběžnějších flavonoidů nacházejícím se v dostupných potravinách; cibuli, jablku a čaji. Hesperetin (**61**) je obsažen v citrusech a kyanidin (**53**) v barevných plodech jako rybíz, borůvky, maliny a jahody.<sup>14,28</sup>

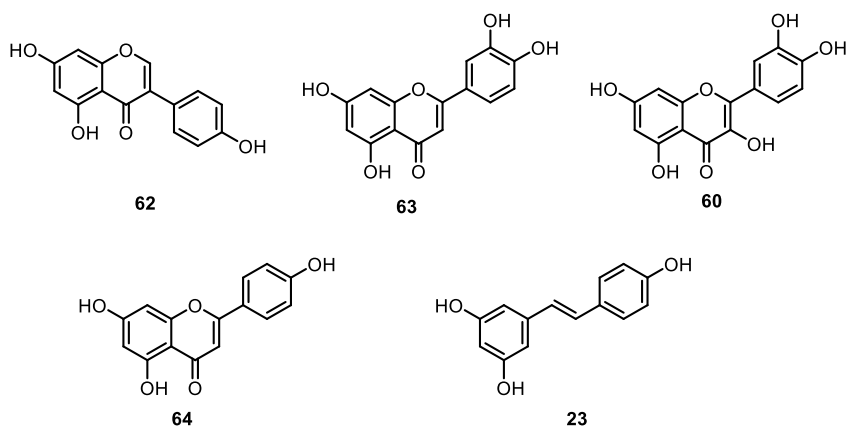


Obr. 21. Obecná struktura theaflavinů (59), struktury epigallokatechinu (54), epigallokatechin-3-galátu (55), kvercetin (60), hesperetinu (61) a kyanidinu (53).

### 2.2.4.3 Protizánětlivá aktivita

Zánět je odpovědí imunitního systému na infekci způsobenou mikroby, zraněním nebo např. iritací UV radiací.<sup>15</sup> Chronické záněty mohou vést k vážným degenerativním onemocněním jako je například Alzheimerova choroba nebo ke vzniku rakoviny. Látky s protizánětlivou aktivitou bývají často zároveň významnými antioxidanty, jelikož k zánětu značně přispívá přítomnost ROS, které aktivují transkripční faktor nukleárního faktoru kappa B (NFκB).<sup>14</sup> NFκB je důležitý při regulaci zánětu a tím také pro adaptivní a vrozenou imunitu. Je aktivován prozánětlivými mediátory, mezi něž se řadí látky indukované lipopolysacharidem přítomným v buněčné stěně gramnegativních bakterií; např. oxid dusnatý, prozánětlivé cytokiny jako tumor nekrotický faktor TNFα, interleukin-1, interleukin-6 a cyklooxygenasa-2.<sup>21,14</sup>

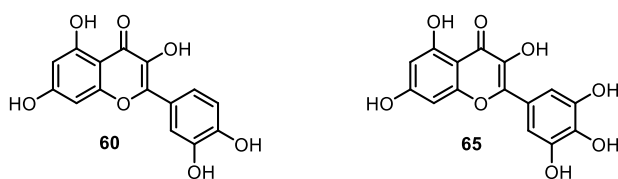
Mezi látky dostupné jako doplňky stravy patří flavonoidy genistein (**62**), luteolin (**63**), kvercetin (**60**) a apigenin (**64**), které inhibují primárně prozánětlivý cytokin TNFα (Obr. 22). V červeném víně je přítomen stilben resveratrol (**23**), který v první řadě zabraňuje translokaci NFκB do jádra a tím expresi prozánětlivých mediátorů.<sup>14</sup>



Obr. 22. Struktura genisteinu (62), luteolinu (63), kvercetin (60), apigeninu (64) a resveratrolu (23).

#### 2.2.4.4 Neuroprotektivní aktivita

V pokročilém věku dochází k neurodegenerativním procesům vedoucím k rozvoji některých závažných nemocí jako např. Parkinsonova choroba (PD), Alzheimerova choroba (AD), stařecká demence a jiné. K rozvoji neurodegenerativních onemocnění značně přispívá oxidační stres, který se kumuluje zejména v mozkové tkáni. U mnoha neurodegenerativních onemocnění, včetně PD a AD, byly prokázány některé společné znaky v mozku nemocných, a to zvýšený oxidační stres a defekt v mitochondriální funkci.<sup>29</sup> U myši, kterým byl podáván extrakt z *Ginkgo biloba* obsahující flavonoidy včetně kvercetin (60) a myricetin (65) (Obr. 23), byla prokázána vyšší ochrana proti toxicitě  $\beta$ -amyloidního peptidu podílejícího se na vzniku AD. Další studie naznačují vliv v podávání ovoce a zeleniny bohatých na polyfenoly a antokyany s antioxidační aktivitou na zlepšení kognitivních funkcí a transdukcí neuronových signálů u potkanů.<sup>28</sup>

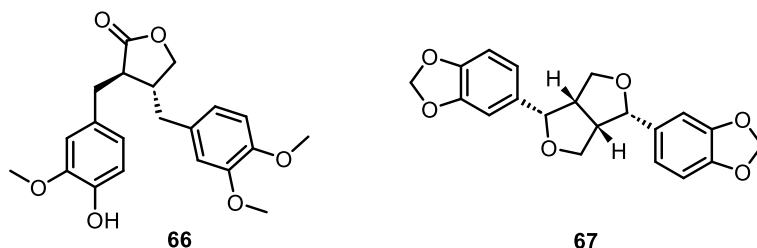


Obr. 23. Struktura flavonoidů kvercetin (60) a myricetin (65).

Alzheimerova choroba je nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění. Uvádí se, že až osmdesát procentům pacientů trpících nějakým typem demence bylo diagnostikováno právě toto onemocnění.<sup>30</sup> AD není v současnosti vyléčitelná, projevuje se poruchou kognitivních funkcí, charakteristická je ztráta paměti, porucha osobnosti a chování. Patologický stav je způsoben ztrátou cholinergních neuronů, která je zapříčiněna ukládáním  $\beta$ -amyloidu (a tím vzniku senilního plaku) a agregací neurofibrilárního klubka hyperfosforylovaného proteinu  $\tau$ . Mnohé studie naznačují, že neurotoxicita  $\beta$ -amyloidního proteinu je způsobena ROS.<sup>29</sup> Neuroprotektivní aktivita byla prokázána mj. u lignanu

arctigeninu (**66**) vyobrazeného na Obr. 24, konkrétně u myši bylo pozorování zmírnění deficitu paměti a učení.<sup>31</sup>

Parkinsonova choroba je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním, jedná se o typ demence s poruchami motorických funkcí, typicky se u pacientů objevuje neovladatelný třas. Patologicky dochází ke ztrátě dopaminergních neuronů.<sup>32</sup> Lignan sesamin (**67**) (Obr. 24) vykazuje neuroprotektivní aktivitu u potkanů s lézemi 6-hydroxydopaminu, a to snížením oxidačního stresu a potlačením apoptózy.<sup>33</sup>



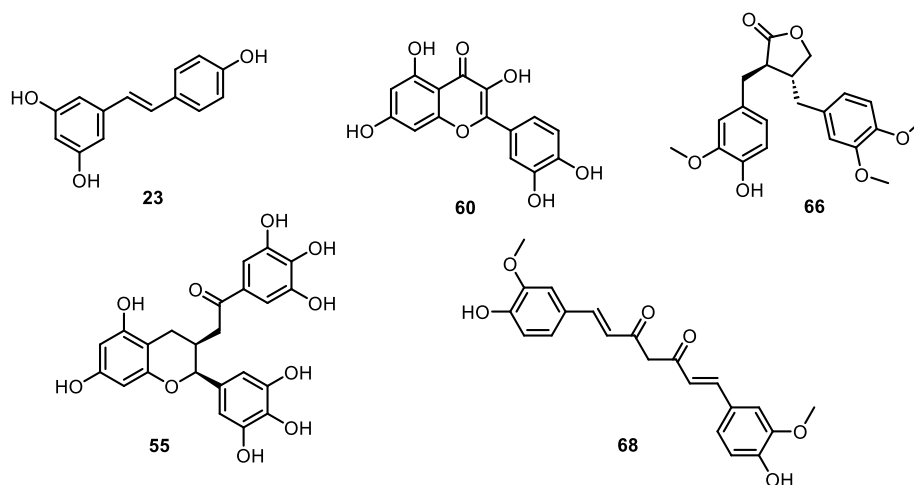
Obr. 24. Strukturální vzorce lignanů arctigeninu (**66**) a sesaminu (**67**).

#### 2.2.4.5 Protirakovinná aktivita

Rakovinné bujení je specifické nadměrnou a nekontrolovatelnou proliferací abnormálních buněk bez diferenciací, které jsou dále schopny napadat okolní tkáň a orgány. V současné době je rakovina léčena různými přístupy, avšak v pokročilém stádiu, kdy v těle dochází k tvorbě metastáz se stává většina současných chemoterapií neaktivních. Rakovinné bujení vzniká v těle z mnohých na sobě naprosto nezávislých příčin, jako např. vystavování se karcinogenům či chemickým látkám nebo např. působením ionizačního záření nebo některých mikroorganismů (HPV aj.), z čehož vyplývá, že látky pro léčbu rakoviny jsou nejrůznějšího charakteru. Protirakovinná aktivita byla prokázána u isoflavonoidů, lignanů, kumarinů a jiných fenylypropanidů.<sup>21</sup>

Dříve byla již zmíněna antioxidační a s tím související protizánětlivá aktivita katechinů v zeleném čaji, avšak mnohé studie naznačují jejich vliv i při prevenci rakoviny a její léčbě. Nejvýrazněji zastoupeným katechinem v zeleném čaji, jak bylo již zmiňováno, je EGCG (**55**), jehož protirakovinné účinky byly testovány i v klinických studiích a v *in vitro* testech byl prokázán jeho cytotoxický vliv při prevenci, ale i při rozvoji rakoviny různého typu, a to indukci apoptózy a pozastavením buněčného cyklu rakovinných buněk.<sup>34</sup> Dále byly s pozitivním výsledkem testovány polyfenoly jako kvercetin (**60**), polyfenoly z červeného vína, resveratrol (**23**) či kurkumin (**68**) (Obr. 25).<sup>28</sup> Mezi možné mechanismy účinku patří inhibice iniciace ovlivněním metabolismu prokarcinogenů skrze cytochromy P450 (rodiny CYP1 a CYP2), inhibice buněčné proliferace a tím omezení růstu a tvorby

nádorů, vyvolání apoptózy nádorových buněk aj. Mezi lignany s protirakovinnou aktivitou patří výše zmíněný arctigenin (**66**), lignany obsaženy v druzích lnu a jalovce, v ořešáku mandžuvském a další.<sup>13</sup>

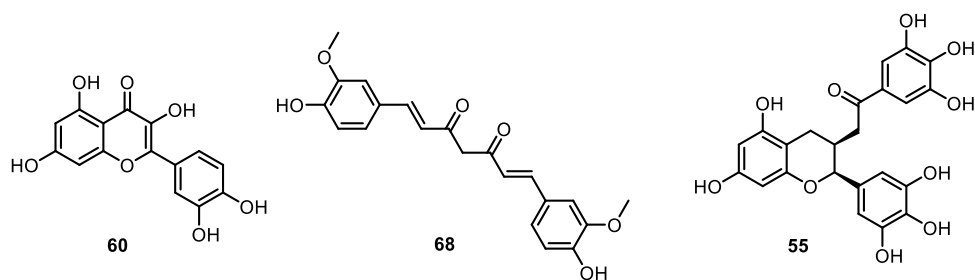


Obr. 25. Strukturální vzorce stilbenu resveratrolu (23), epigallokatecin-3- galátu (55), kvercetin (60), arctigeninu (66) a kurkuminu (68).

#### 2.2.4.6 Léčba diabetu

*Diabetes mellitus* je onemocnění dvojího typu. Cukrovka prvního typu je autoimunitním onemocněním, které je způsobeno nefunkčností  $\beta$ -buněk pankreatu produkujících insulin. Cukrovka druhého typu je populační onemocnění způsobené získanou rezistencí vůči insulinu kvůli jeho vysoké koncentraci v krvi při časté hyperglykémii.<sup>35</sup>

Některé sekundární metabolity fenylpropanoidního typu vykazují snížení glykémie v krvi, a to buďto inhibicí funkce pankreatického transportéru glukózy GLUT-2, supresi enzymů glukoneogeneze v játrech či zabránění absorpce glukózy ve střevě. Dochází také ke snížení glykovaného hemoglobinu a snížení resistance vůči insulinu.<sup>21,35</sup> Látky se značnou antidiabetickou aktivitou byly izolovány např. z plodu hořké okurky, listu bazalky posvátné, citronu, kari a skořice. Ovoce jako ananas, dýně, olivy, dále pak batáty, zelený čaj, a jiné obsahují látky snižující rezistenci vůči insulinu. Mezi látky s antidiabetickou aktivitou patří také kvercetin (**60**), kurkumin (**68**) a katechiny v čaji, jako např. EGCG **55** (Obr. 26).



Obr. 26. Struktura kvercetinu (60), kurkuminu (68) a epigallokatechin-3.galátu (55).

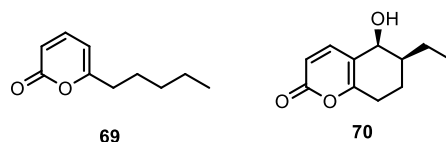
## 2.3 *Syzygium samarangense*

### 2.3.1 Charakteristika

*S. samarangense* neboli hřebíčkovce jávský je zástupcem rodu *Syzygium* z čeledě myrtovité (*Myrtaceae*). Myrtovité jsou dvouděložné stálezelené stromy a keře vyskytující se v subtropickém a tropickém pásmu. Ačkoliv je rod *Syzygium* původně z Afriky, byl rozšířen do Asie a Jižní Ameriky a v současné době dosahuje největší diverzity v Malajsii a v Austrálii. Tato čeleď je v zemích jižní Asie velmi oblíbená, a to nejen pro chutné plody, ale i pro široké využití v tradiční medicíně. Nejznámějším zástupcem je bezpochyby hřebíčkovce kořený (*S. aromaticum*), jehož nerozvitá sušená poupata se do Evropy začala dovážet po hedvábné stezce jako koření a nyní je hřebíček využíván snad v každé kuchyni, a to nejen kvůli svému příjemnému aroma. Aromatickým olejem ze *S. aromaticum* jsou totiž léčeny např. spáleniny a drobné ranky, v zubním lékařství ulevuje od bolesti při infekci a bolesti zubů.<sup>36</sup>

*S. samarangense* je nejvíce rozšířen v Malajsii a Indii. Na Taiwanu je hojně využíván v tradičním léčení, a to hlavně pro léčbu diabetu, dysentérie, zánětu, horečky a průjmu.<sup>35</sup> Přítomnost sekundárních metabolitů s biologickou aktivitou byla prokázána u kořene, kůry, listu a plodu. Z pohledu zastoupení biologicky aktivních sekundárních metabolitů byly z hřebíčkovce jávského izolovány mnozí zástupci sekundárních metabolitů fenylypropanoidního typu (flavonoidy, chalkony), ale i další látky jako seskviterpeny, diterpeny a terpenoidy.

Nedávno byly z čerstvého plodu *S. samarangense* izolovány dvě látky, u nichž byla detekována neuroprotektivní aktivita.<sup>1</sup> Jedná se o již známý 6-pentyl- $\alpha$ -pyron (**69**) a lakton pojmenovaný syzysamalakton (**70**) (Obr. 27).

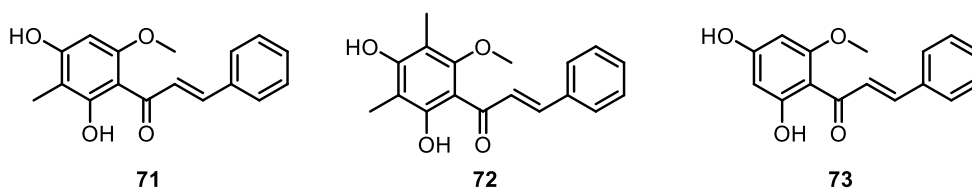


Obr. 27. Strukturní vzorec 6-pentyl- $\alpha$ -pyronu (69) a syzysmalaktonu (70)

### 2.3.2 Bioaktivita látek v *S. samarangense*

Z extraktu listu v methanolu bylo charakterizováno asi devadesát dva flavonoidů, u čtyř z nich byla v hexanovém extraktu zjištěna spasmolytická aktivita (s poměrně velkým rozpětím minimální hodnoty koncentrace) a to potvrzuje využití hřebíčkovce jávského při léčbě průjmu.<sup>36</sup> Spasmolytická aktivita je způsobena ovlivněním proudění draselných a vápenatých kationtů. Dále jsou v listu hojně zastoupeny katechiny, včetně (EGCG **55**), u nichž, jak bylo uvedeno dříve, byla zjištěna antioxidační, protizánětlivá, cytotoxická a antidiabetická aktivita. Esenciální olej z listů vykazoval antibakteriální aktivitu vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Hepatoprotektivní aktivita byla potvrzena na jaterní poškození indukované tetrachlormetanem u krys.<sup>37</sup>

Významnou roli hrají chalkony přítomné v plodech *S. samarangense*. Ty totiž obsahují hydroxylové skupinu a několik nenasycených vazeb, jež způsobují jejich vysokou antioxidační a cytotoxickou aktivitu.<sup>38</sup> Dále byla z extraktů prokázána protizánětlivá aktivita a antidiabetická aktivita skrze vychytávání insulinu v plasmě u krys a snížení insulinové resistance u na insulin-resistentních myši.<sup>35,36</sup> Významná biologická aktivita byla prokázána například u chalkonů 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalkonu (**71**), stercurensinu (**72**) a kardamoninu (**73**) izolovaných z dužiny a semen plodu, a které byly prokazatelně cytotoxické konkrétně proti lidské buněčné linii rakoviny střeva SW-480 s hodnotami  $IC_{50} = 10 \mu M$  pro **71**,  $35 \mu M$  pro **72**, a  $35 \mu M$  pro **73** (Obr. 28).<sup>38</sup>



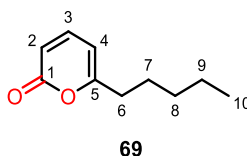
Obr. 28. Struktura chalkonů 2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalkonu (71), stercurensinu (72) a kardamoninu (73)

Květy *S. samarangense* jsou používány k léčbě horečky a průjmu.<sup>39</sup> U extraktu z kůry byla potvrzena významná anthelmintická aktivita vůči vlasovce slezové (*Haemonchus contortus*).<sup>40</sup>



### 2.3.3 6-pentyl- $\alpha$ -pyron (69)

Z čerstvého plodu hřebíčkovce jávského byl nově izolován 6-PAP (**69**), který byl poprvé izolován z broskvoně typu Red Globe a později také z *Trichoderma viride* neboli zelenatky obecné a vyznačuje se svým charakteristickým aroma podobné máslovému dortu či kokosu.<sup>41,42</sup> Následně byl objeven lakton **69** i u jiných zástupců rodu *Trichoderma*. U broskví je pak spolu s jinými laktony, estery a monoterpeny zodpovědný za chuť a aroma.<sup>43</sup>



Obr. 29. Chemická struktura 6-pentyl- $\alpha$ -pyronu

#### 2.3.3.1 Struktura laktonu 69

Základem této látky je  $\alpha$ -pyronový kruh vycházející z pyranu, heterocyklické sloučeniny obsahující atom kyslíku. Pyron se přirozeně vyskytuje ve dvou izomerických formách, buďto 2- $\alpha$ -pyron, nebo 4- $\alpha$ -pyron, přičemž u laktonu **69** se nachází právě ve své 2- $\alpha$ -pyronovém stavu ( $\delta$ -laktonový kruh). Laktony jsou cyklické deriváty karboxylových kyselin. Řecké písmeno značí velikost laktonového kruhu; nejmenšími laktony jsou tříčlenné kruhy, tzv.  $\alpha$ -laktony,  $\beta$ -laktony obsahují čtyřčlenný kruh a tak dále. Dále je na laktonovém kruhu připojen pentyl na uhlíku C5. Struktura je vyobrazena na Obr. 29.

#### 2.3.3.2 Biologická aktivita laktonu 69

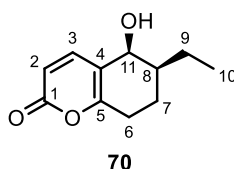
Laktonu **69** jsou přičítány biologické vlastnosti jež předurčují mikroorganismy rodu *Trichoderma* jako ideální partnery pro využití v zemědělství.<sup>44</sup> Různé druhy rodu *Trichoderma* jsou pak využívány jako biokontrolní činidla protože mají významnou antifungální aktivitu, kterou si zachovávají i v kompetitivním prostředí s jinými mikroorganismy a zároveň nejsou fyto toxické.<sup>45</sup> Konkrétně přítomnost *T. viride*, *T. harzianum* a *T. koningii* v půdě prokazatelně stimuluje růst rostlin a chrání je před některými plísněmi.

Lakton **69** pak v případě člověka má zajímavý potenciál hned z několika pohledů. Lakton **69** vykazuje totiž baktericidní aktivitu proti rodu *Enterobacterales*, jež způsobuje záněty močových cest.<sup>46</sup> Dále byl lakton **69** úspěšně podroben testu na neuroprotektivní aktivitu proti neurotoxinu 6-hydroxidopaminu (6-OHDA) v buněčné linii lidského neuroblastomu SH-SY5Y. Lakton **69** je pak spolu s nedávno izolovaným

syzysamalaktonem **70** prvním laktonovým derivátem s prokazatelnou neuroprotektivní aktivitou.<sup>1</sup> Efektivní koncentrace EC<sub>50</sub>, tedy koncentrace nutná k 50% inhibici růstu či usmrcení, byla stanovena na 1,28 ± 0,06 μM. Buněčná linie SH-SY5Y je využívána k *in vitro* testování Parkinsonovy choroby, ale v menším měřítku také např. Alzheimerovy choroby, neurotoxicity, amyotrofni laterální sklerózy a ischemie.<sup>47</sup>

### 2.3.4 Syzysamalakoton (70)

Jak již bylo zmíněno, spolu s laktonem **69** byl ze zralého jablka jávského izolován i nově popsán fenylypropanoid syzysamalakton (**70**). Jméno této nově izolované látky je složeno z prvních dvou slabik latinského rodového a druhového jména rostliny, z které byla tato látka izolována, a připojením ke slovu lakton, který odkazuje na dominantní chemickou funkční skupinu ve struktuře této látky.



Obr. 30. Chemická struktura syzysamalaktonu<sup>1</sup>

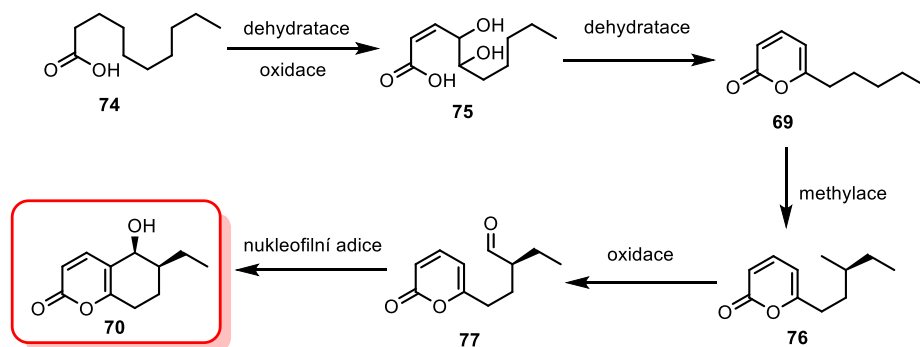
#### 2.3.4.1 Chemická struktura syzysamalaktonu

Ze strukturního hlediska je látka **70** derivát  $\delta$ -laktonu o jedenácti atomech uhlíku (Obr. 30). Yan-Ping Liu a jeho výzkumný tým z Hainan Normal University v Číně určili chemickou strukturu syzysamalaktonu pomocí dvoudimenzionální nukleární magnetické rezonance (2D NMR) s využitím HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC a ROESY 2D korelačních spekter.<sup>1</sup> Bylo zjištěno, že lakton **70** se skládá z jednoho šestičlenného laktonového kruhu a z kondenzovaného šestičlenného kruhu společného s laktonovou částí na *d* straně mezi uhlíky C4 a C5. Pomocí <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY byla zjištěna přítomnost další dvojné vazby mezi atomy uhlíku C2 a C3 a přítomnost etylu na uhlíku C8 a hydroxylové skupiny na uhlíku C11. Na atomech C8 a C11 jsou přítomny dvě chirální centra, z čehož vyplývá, že by teoreticky mohly existovat právě čtyři prostorové stereoizomery laktonu **70**. Po porovnání naměřených ECD-spekter izolovaného laktonu **70** s vypočítanými (DFT) byla určena absolutní konfigurace laktonu **70** jako (8*S*,11*S*)-syzysamalakton.

#### 2.3.4.2 Biosyntéza syzysamalaktonu (70)

Z pohledu biosyntézy (Obr. 31) je syzysamalakton **70** pravděpodobně připraven z 6-pentyl- $\alpha$ -pyronu **69**.<sup>1</sup> Je předpokládáno, že kondenzací pěti jednotek acetyl-CoA

vznikne kyselina kaprinová (**74**), jež je následně podrobena sérii dehydratačních a oxidačních kroků, jež přes dihydroxylový intermediát (**75**) poskytnou lakton **69**. Tento aromatický lakton **69** by pak měl podlehnout stereoselektivní methylaci na lakton **76**, oxidací methylové jednotky na aldehyd **77**, jež po stereoselektivní nukleofilní adici poskytne kýžený syzysamalakton **70**. Doposud nejsou známy enzymy účastníci se těchto výše zmíněných kroků biosyntézy vedoucí laktonu **70**.



**Obr. 31.** Schematické znázornění biosyntézy syzysamalaktonu (**70**).<sup>1</sup>

#### 2.3.4.3 Biologická aktivita syzysamalaktonu (**70**)

Jak již bylo zmíněno výše, u laktonu **70** byla prokázána neuroprotektivní aktivita. Z pohledu mechanismu u látky **70** bylo prokázáno, že inhibuje 6-OHDA, jež indukuje buněčnou smrt v SH-SY5Y.<sup>1</sup> U syzysamalaktonu **70** pak byla prokázána na stejném systému

$EC_{50} = 0,29 \pm 0,03 \mu\text{M}$ . V případě laktonu **69** byla  $EC_{50} = 1,28 \pm 0,06 \mu\text{M}$  (jako pozitivní kontrola byl zvolen kurkumin **68**, u nějž  $EC_{50} = 5.29 \pm 0.12 \mu\text{M}$ ). Další testování laktonu **70** však zatím nebylo provedeno z důvodu jeho malé dostupnosti z přírodních zdrojů. Toto je důvod proč se o tuto konkrétní látku zajímáme: má relativně značný potenciál z pohledu její biologické aktivity (neuroprotektce) a navíc její struktura potenciálně umožňuje další strukturální modifikace, jež by umožňovaly jak vývoj dalších aktivních látek, tak studium mechanismu neuroprotektce.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla byly použity ve stavu v jakém byly zakoupeny. U žádné nebylo využito dodatečného čištění a ani čistota nebyla dodatečně stanovována.

### 3.2 Metody a materiál

#### 3.2.1 Obecné informace

Všechny reakce citlivé na vzdušnou vlhkost byly prováděny v předem vyžíhaných baňkách pod tlakem inertního plynu (argon). Použitá rozpouštědla byla komerční kvality a nebyla přečišťována.

Průběžné TLC analýzy (*thin layer chromatography* = chromatografie na tenké vrstvě) byly prováděny na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F<sub>254</sub> značky Merck. K detekci bylo využíváno UV záření ( $\lambda = 256 \text{ nm}$ ) a vizualizačních roztoků.

K čištění látek bylo využíváno sloupcové chromatografie s využitím silikagelu jako stacionární fáze a směsi hexan:EtOAc (*V/V*) jako mobilní fáze. Frakce byly eluovány pomocí koncentračního gradientu, který spočíval ve zvyšování procentuálního zastoupení polárnější složky směsi (EtOAc). Jednotlivé frakce byly sbírány do zkumavek, jejichž obsah byl monitorován pomocí TLC analýzy. Zkumavky obsahující stejné produkty byly spojené a přebytečné rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky.

K měření NMR spekter byly použity spektrometry JEOL 400II (1H: 400 MHz; 13C: 101 MHz) a JEOL 500 JNM-ECA 500 MHz (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz). Vzorky byly rozpouštěny a měřeny buď v deuterovaném CDCl<sub>3</sub> či DMSO. Spektra byly kalibrována na střed signálu použitého zbytkového nedeuterovaného rozpouštědla (CDCl<sub>3</sub> 7,26 ppm pro <sup>1</sup>H; DMSO 2,50 ppm pro <sup>1</sup>H) nebo na střed použitého rozpouštědla (CDCl<sub>3</sub> 77,16 ppm pro <sup>13</sup>C; DMSO 39,52 ppm pro <sup>13</sup>C).<sup>48</sup>

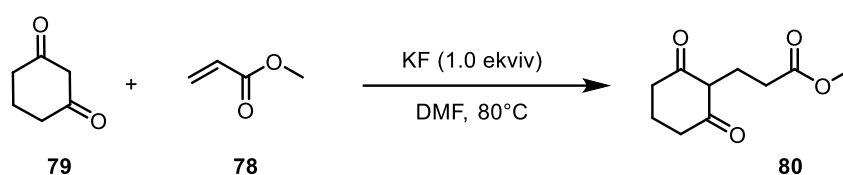
Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru TSQ Quantum ACCES (Thermo Fisher Scientific, USA) s APCI jako ionizačním zdrojem. K měření HRMS byl použit spektrometr Agilent 6230 s ionizačním zdrojem Dual AJS ESI s módem Full scan v rozsahu 100-1700 *m/z*.

### 3.2.2 Vizualizační roztoky pro TLC

- Zásaditý roztok KMnO<sub>4</sub> byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO<sub>4</sub> a 20 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 150 ml 10% NaOH.
- Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 ml EtOH obsahující 1 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 3.3 Organická syntéza

### 3.3.1 Příprava aduktu 80



Diketon **79** (10 g; 89,1 mmol, 1.0 ekviv.) a methyl akrylát **78** (8.83 mL, 98,1 mmol, 1.1 ekviv.) byly rozpuštěny v DMF (590 mL, 0.15M). Do výsledného roztoku byl přidán KF (5.18 g, 89.1 mmol, 1.0 ekviv.) a výsledný roztok byl míchán při 80 °C po dobu 26 h. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C (led/voda) a následně nalit do studeného (0 °C, led/voda) roztoku vody (600 mL). pH roztoku bylo upraveno na pH = 6 pomocí 1.0M aq. HCl (přidáno opatrně po kapkách; detekce pomocí pH papírku) a celý roztok byl extrahován pomocí EtOAc (3x50 mL). Spojené organické vrstvy byly promyty solankou (50 mL), sušeny nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 1:1->0:100) za vzniku kýženého produktu **80** (8.9 g, 50%).

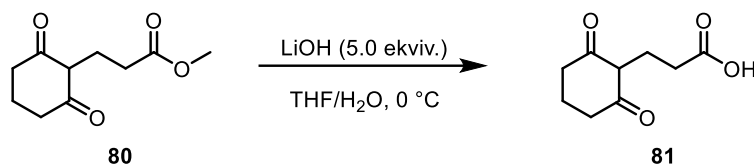
*Produkt je přítomen ve formě obou keto/enol tautomerů.*

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 9.45 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 2.61 – 2.55 (m, 2H), 2.54 – 2.49 (m, 2H), 2.47 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.36 – 2.31 (m, 2H), 1.95 – 1.87 (m, 2H).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 209.48, 206.10, 178.36, 177.32, 173.36, 173.29, 172.88, 89.12, 52.19, 52.01, 38.51, 37.48, 33.79, 33.02, 31.16, 29.27, 29.18, 28.96, 28.85, 27.59, 19.79, 18.69.

HRMS vypočteno pro C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 199.0965; nalezeno 199.0969.

### 3.3.2 Příprava kyseliny 81



Roztok esteru **80** (200 mg, 1.01 mmol, 1.0 ekviv.) v THF (10 mL, 0.1M) byl ochlazen na 0 °C (voda/led) a H<sub>2</sub>O (2 mL, 0.5M) byla přidána. Po 5 min, LiOH (212 mg, 5.04 mmol, 5.0 ekviv.) byl přidán a výsledný roztok byl míchán při RT po dobu 1,5 h. 1.0M aq. HCl (7 mL) byl přidán tak aby výsledné pH roztoku bylo pH = 2. Celá směs byla následně extrahována pomocí EtOAc (3x25 mL) a spojené organické vrstvy byly sušeny nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrvány, odpařeny na RVO a poskytly surovou kyselinu **81** (141 mg) ve výtěžku 76 %. Výsledný produkt byl okamžitě použit v dalším kroku.

*Produkt přítomen v enol formě*

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 9.37 (broad s, 2H), 2.69 – 2.63 (m, 2H), 2.56 – 2.49 (m, 2H), 2.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 1.93 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H).

HRMS vypočteno pro C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 185.0808; nalezeno 185.0812.

Elementární analýza vypočtena pro C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>: C, 58.69 %; H, 6.57 %; O, 34.74 %; nalezeno C, 58.69 %; H, 6.61 %; O, 34.70 %.

### 3.4 Biologické testování

Testování bylo provedeno v laboratoři Dr. Lucie Rárové (katedra Experimentální biologie, UPOL) pod jejím vedením.

Cytotoxicita vybrané látky byla testována *in vitro* na buněčné linii lidských epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku HeLa. Ty byly kultivovány v Petriho miskách s kultivačním médiem DMEM. Nejdříve byly promyty 3 ml EGTA a poté byl pro uvolnění buněk ze dna jamek přidán 1 ml roztoku enzymu trypsinu (0,5 g.l<sup>-1</sup>) v EGTA. Následně byly buňky propláchnuty médiem a poté přeneseny do zkumavky, ve které byly posléze při pokojové teplotě centrifugovány po dobu 5 minut při otáčkách 1200 rpm. Vzniklý supernatant byl odsán a usazený pelet, obsahující buňky, byl resuspendován pomocí 5 ml DMEM média. Dalším krokem bylo umístění buněk do Bürkerovy komůrky, ve které byly pod mikroskopem spočítány. Tato směs byla poté přenesena do 96jamkové mikrotitrační destičky v objemu 80 μl při přibližné koncentraci 5000 buněk na jamku. Následovala kontrola přítomnosti buněk pod světelným

mikroskopem, načež byly destičky ponechány do dalšího dne v inkubátoru s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou při teplotě 37,5 °C.

Následující den byla k buňkám přidána testovaná látka ve formě předem připravené sestupné koncentrační řady, jejíž jednotlivé koncentrace byly 50 μM; 16,6 μM; 5,5 μM; 1,9 μM; 0,6 μM a 0,2 μM. Zásobní roztok látky, ze které byla tato řada připravena, měl koncentraci 10 mmol·L<sup>-1</sup>. Testování možných účinků bylo prováděno v triplikátu po dobu 72 hodin.

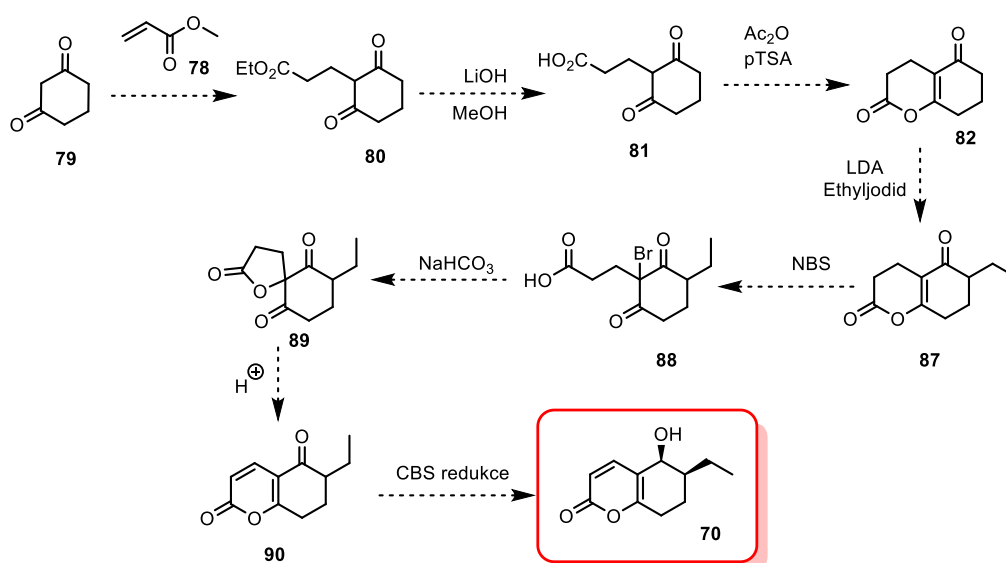
K vyhodnocení cytotoxicity bylo využito alamarBlue assay. Po uplynutí testovací doby bylo do jamek s buňkami přidáno 10 μl roztoku resazurinu (4 mg v 16 ml 10% DMEM). Resazurin, komerčním názvem alamarBlue, je modré nefluorescenční barvivo, které je živými buňkami oxidováno na růžový resorufin. Vzniklý resorufin je fluorescenční a po ozáření světlem o specifické vlnové délce emituje záření.

Mikrodestičky byly poté umístěny do inkubátoru a po třech hodinách byla měřena fluorescence pomocí spektrofotometru Tecan. Vlnové délky byly zvoleny jako 544 nm pro excitační spektrum a 590 nm pro emisní. K vyhodnocení hodnot IC<sub>50</sub> byla použita získaná data a program Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie, USA).

## 4 Výsledky

### 4.1 Syntéza syzysamalaktonu

V literární části je zmíněna pouze izolace syzysamalaktonu **70** ze zralého plodu hřebíčkovce jávského a jeho biosyntéza, doposud ale nebyl připraven laboratorně. V experimentální části jsme se tedy zaměřili na jeho laboratorní syntézu a zároveň optimalizaci jednotlivých kroků. Postupovala jsem dle syntézy navržené doc. Pospíšilem (Obr. 32). V této části jsou shrnuty veškeré dosažené výsledky. V následující podkapitole jsou uvedeny výsledky biologického testování připravených intermediátů.

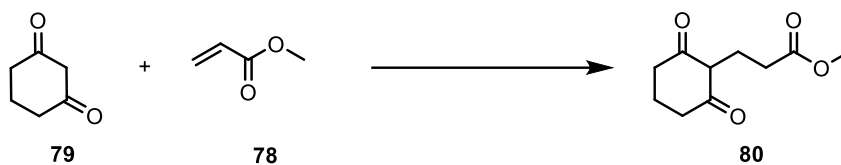


Obr. 32. Navržená syntéza vedoucí k syzysamalaktonu (**70**).

#### 4.1.1 Syntéza syzysamalaktonu – jedeme podle plánu

Na základě tohoto návrhu tedy syntéza začíná adicí methylakrylátu (**78**) na komerčně dostupný cyklohexan-1,3-dion (**79**). Nejprve jsem postupovala podle literárních postupů, ale již zde jsem narazila na problém, neboť literární poznatky se mi nedařilo reprodukovat, respektive moje výtěžky nedosahovali těch publikovaných. V Tab. 1 jsou zaznamenány jednotlivé kroky optimalizace této adice, kde maximální výtěžek mého cílového produktu, látka **80**, byla v nejlepší případě izolována s výtěžkem 50 %.

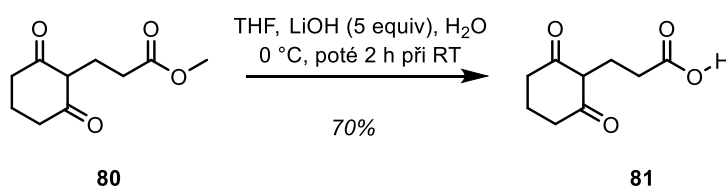


**Tab. 1.** Optimalizace adiční reakce diketonu **79** na ester **80**.

Řádek	Látka 78 (ekviv.)	Podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup> (%)	Navážka látky 79 (g)	Ref.
1	1	NaH (2,0 ekviv.), DMF, 4 hod 80 °C, 12 h RT	>5	2	49
2	1	NaH (1,0 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 16 h 80 °C	>5	0,5	50
3	1	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,6 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 16 h 80 °C	>5	0,2	—
4	1	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,1 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 16 h 80 °C	>5	0,2	—
5	1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,1 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 16 h 80 °C	20	0,2	51
6	1,1	KF (1,0 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 24 h 80 °C	44	0,2	49
7	1,1	KF (1,0 ekviv.), DMF, 1 hod RT, 24 h 80 °C	50	10	49

<sup>a)</sup> Jedná se o izolovaný výtěžek po přečištění pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu.

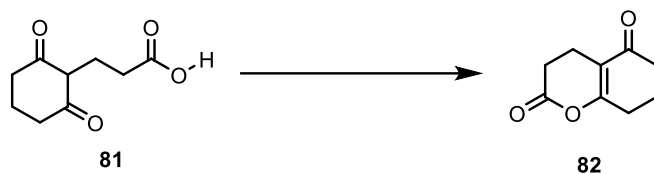
S esterem **80** k dipozici následovala jeho bazická hydrolyza (Obr. 33), jež nám měla poskytnout příslušnou kyselinu (**81**). Reakce byla nasazena při teplotě 0 °C z důvodu zamezení možných nechtěných vedlejších produktů a reakční směs byla poté ponechána reagovat po dobu 2,5 hodiny při laboratorní teplotě. Po zpracování reakční směsi jsem získala cílovou molekulu v 76% výtěžku.



Obr. 33. Bazická hydrolyza esteru **80** na jeho kyselinu **81**.

Cyklizace látky **81** na bicyklus **82** byla konečným krokem v navržené syntéze (Obr. 32). Látka **81** byla rozpuštěna v anhydridu kyseliny trifluoroctové, reakce byla zahřívána pod zpětným chladičem při 38 °C nejprve 2,5 hod, v následujícím pokusu po dobu 72 hodin, avšak  $\delta$ -lakton **82** se nepodařilo izolovat. Další testované experimenty (viz Tab. 2) také nevedly ke kýženému cíli.

**Tab. 2.** Pokusy o cyklizaci diketo kyseliny **81**.

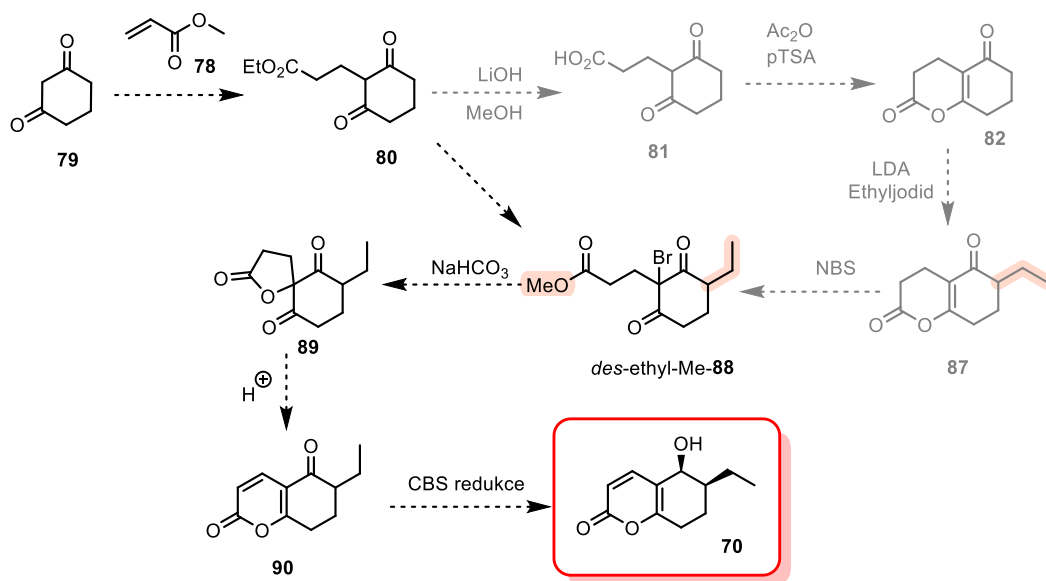


Řádek	Podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup> (%)
1	TFAA (0.1M), 38 °C, 2,5 h	>5
2	TFAA (0.1M), 40 °C, 2 dny	>5
3	TFAA (0.1M), 60 °C, 2 dny	>5
4	Ac <sub>2</sub> O (0.1M), 60 °C, 2 dny	>5
5	PPTS (3 ekviv.), toluen, 100 °C, 2 dny	>5
6	Ac <sub>2</sub> O (0.1M), PPTS (5 ekviv) 60 °C, 2 dny	>5
7	Ac <sub>2</sub> O (20 ekviv.), PPTS (3 ekviv.), toluen, 100 °C, 2 dny	>5
8	TFAA (100 ekviv.), PPTS (3 ekviv.), toluen, 100 °C, 2 dny	>5

<sup>a)</sup> Založeno na analýze <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi.

#### 4.1.2 Syntéza syzysmalaktonu – funguje cyklizace?

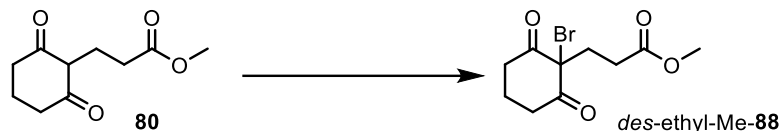
V následujícím kroku jsem odstoupila od navržené syntézy a snažila jsem se připravit ekvivalent intermediátu **88**, jež by byl ve formě methyl esteru a bez postranního ethylového řetězce (látka *des*-ethyl-Me-**88**), abych mohla otestovat, zdali cyklizace bude fungovat (Obr. 34).



Obr. 34. Alternativní přístup k cílovému laktonu **70**.

Byla tedy vyzkoušena transformace esteru **80** na *des*-ethyl-Me-**88** pomocí *N*-bromsukcinimidu. Bohužel ani tato transformace neprobíhala a cílová látka *des*-ethyl-Me-**88** nebyla izolována.

**Tab. 3.** Pokusy o přípravu bromo-derivátu *des*-ethyl-Me-**88**.

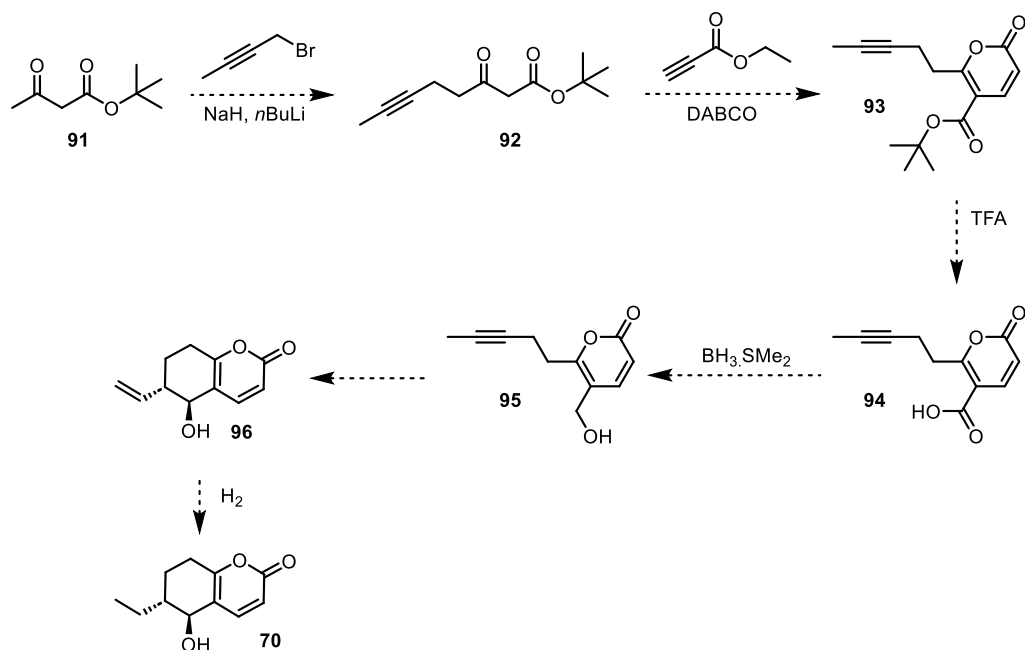


Řádek	Podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup> (%)
1	NBS (1,2 ekviv.), DCM, RT, 2,5 h	>5
2	NBS (3,5 ekviv.), DCM, RT, 2,5 h	>5
3	NBS (1,2 ekviv.), CHCl <sub>3</sub> , RT, 2,5 h	>5
4	NBS (3,5 ekviv.), CH <sub>3</sub> CN, RT, 5 h	>5
5	NBS (5,5 ekviv.), CH <sub>3</sub> CN, 0 °C, 15 h	>5

a) Založeno na analýze <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi.

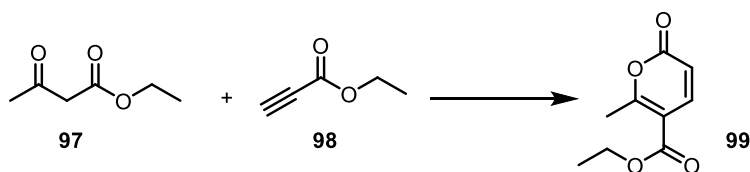
#### 4.1.3 Syntéza syzysamalaktonu – alternativní přístup

Po těchto neúspěšných pokusech jsme se tedy rozhodli změnit strategii a navrhli jsme jiný přístup k syzysamalaktonu **70**, jež byl založen na dvou klíčových krocích, tvorbě pyranového kruhu<sup>52</sup> a následné reduktivní cyklizaci.<sup>53</sup> První klíčový krok, syntéza pyranového skeletu, byl nejprve testován na zkušebních substrátech, ketoesteru **97** a alkyne **98** (Tab. 4). Bohužel se ukázalo, že za daných podmínek, a to ani při jemné optimalizaci reakčních podmínek, klíčový produkt **99** nevzniká.



Obr. 35. Alternativní přístup k syzyllaktonu 70.

Tab. 4. Testování prvního klíčového kroku – syntéza modelového pyranového heterocyklu 86.



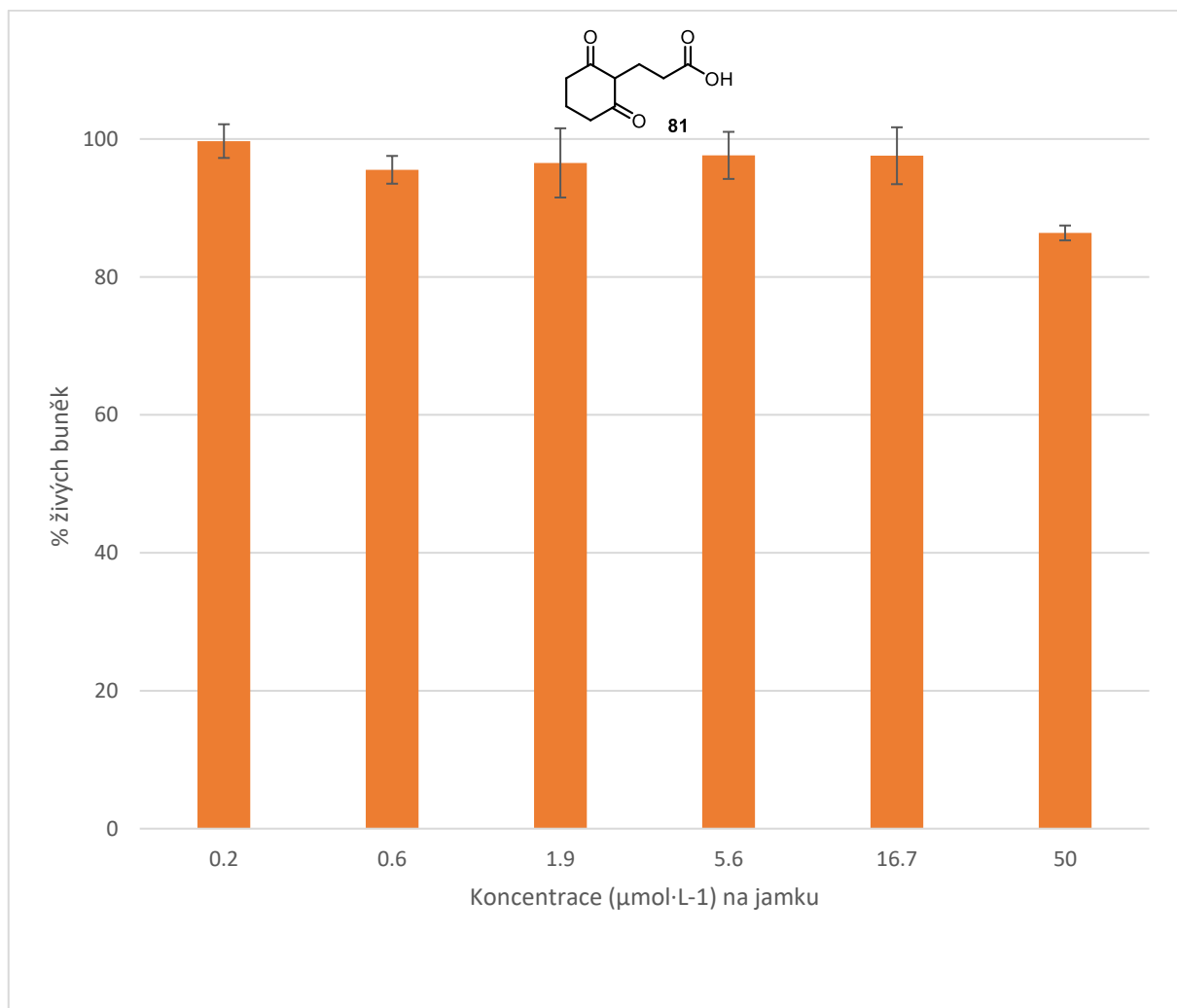
Řádek	Podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup> (%)
1	DABCO (0,02 ekvív.), DMF -20 °C, 2 h	>5
2	DABCO (0,1 ekvív.), DMF -20 °C, 5 h	>5

a) Založeno na analýze <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi.

## 4.2 Biologické testování připravených látek

Bohužel jsem neměla svoje vlastní látky k testování, ale i tak jsem si chtěla vyzkoušet biologické testování látek. Otestovala jsem tedy pod dozorem Dr. Lucie Rárové látku **81** připravenou v rámci naší výzkumné skupiny (Graf 1). Molekula **81** nevykazovala žádnou cytotoxicitu.

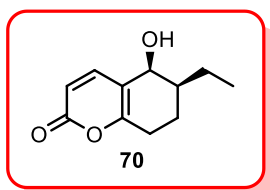
**Graf 1.** Výsledek biologického testování látky **81**.



Směrodatná odchylka byla vypočtena ze tří různých hodnot viability, jelikož měření pro každou koncentraci bylo provedeno v triplikátu. Jde o technický triplikát.

## 5 Diskuse

Cílem této bakalářské práce bylo připravit syzysamalakton (**70**) (Obr. 36) a zároveň optimalizovat jednotlivé korky vedoucí k jeho přípravě. V kontextu práce nás následně zajímala biologická aktivita připravených látek, a to konkrétně neuroprotektivní a anthelmintická.

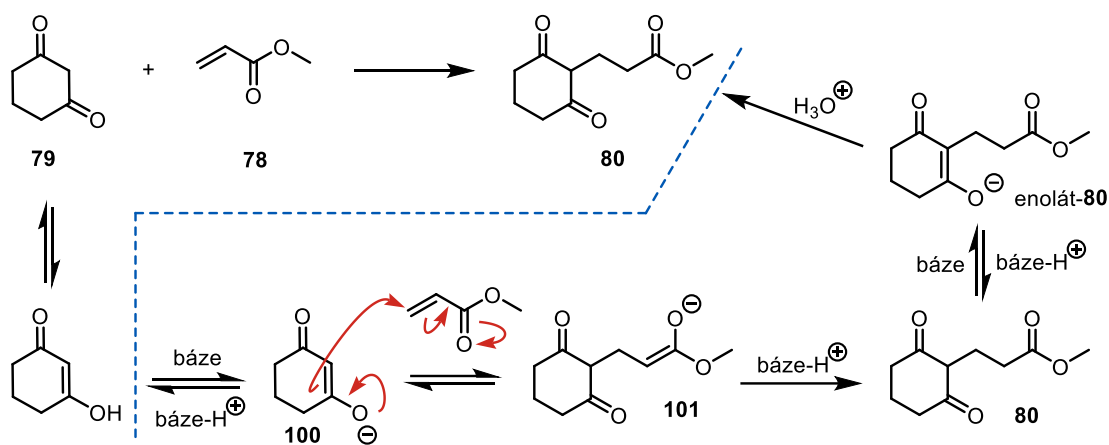


Obr. 36. Struktura syzysamalaktonu **70**

Ačkoliv se syzysamalakton povedlo izolovat z čerstvého plodu *S. samarangense*, v literatuře není znám postup jeho laboratorní přípravy. Ani v našich podmínkách, a přes značné úsilí, se nepovedlo takový postup prozatím objevit a optimalizovat. Pro následné testování tak mohlo být využito pouze jediné látky, a to látky **81**. V této části budou podrobněji diskutovány výsledky uvedené v předchozí kapitole.

### 5.1 Organická syntéza

Jako výchozí produkt syntézy byl zvolen cyklohexa-1,3-dion (**79**), který je vhodný kvůli své komerční dostupnosti. Už v prvním kroku syntézy, adici methylakrylátu (**78**) na výchozí látku, kolidovaly výsledky s použitou literaturou.<sup>49</sup> Nejprve byl jako katalyzátor použit hydrid sodný, který v organické syntéze slouží jako silná báze. I po pozměnění reakčních podmínek<sup>50</sup> (Tab. 1, řádky 1 a 2) byl výtěžek cílové látky pod limitem detekce. Vliv množství výchozí látky na průběh reakce nebyl pozorován. Lepšího výsledky nebylo dosaženo ani po výměně anorganické báze slabší uhličitán cesný či draselný (řádky 3 až 5). Předpokládali jsme, že využitím těchto bazí dojde k ustavení rovnováhy mezi enolátem a enol etherem (Obr. 37) a tím spíše dojde k adici na akrylát, která je vratná. Ukázalo se však, že pouze za použití 1,1 ekvivalentu uhličitánu draselného došlo k tvorbě cílového produktu **80** a to při výtěžku 20 %. Pozorování tvorby produktu při využití ještě slabší báze, než Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> invokovalo, že je třeba použít slabší bázi, jež umožňuje ustanovení termodynamické rovnováhy mezi jednotlivými reaktanty reakce. Tudíž jsem vyzkoušela ještě slabší bázi, fluorid draselný. V tomto případě probíhala reakce s výtěžkem 44 % (řádek 6) a při použití vyšší navážky výchozího diketonu **79** (10 g) pak 50 % (řádek 7).



Obr. 37. Reakční mechanismus adice enolátu **100** generovaného z diketonu **79** s esterem kyseliny akrulové **78**.

Spokojená s tímto výsledkem jsem přistoupila k dalšímu kroku syntézy, kde bylo záměrem transformovat esterovou skupinu látky **80** na karboxylovou kyselinu **81**. Hydrolyza esteru **80** na kyselinu **81** probíhala s využitím LiOH (standartní reakční podmínky<sup>55</sup>) v MeOH za výtěžku 76 %.

S karboxylovou kyselinou **81** v ruce jsem pak zkoušela cyklizaci kyseliny na  $\delta$ -laktón **82**. Jak se ukázalo, tato cyklizace probíhala, ale bohužel jsem nebyla schopna izolovat cílový produkt, bicyklus **82**. Při jakékoliv formě ukončení reakce, která byla vyzkoušena, to vedlo k jeho hydrolyze. Tuto hypotézu prokázal jednoduchý experiment, kdy jsem ponechala reakci reagovat dle podmínek Tab. 2, řádek 2 a reakční směs jsem pouze odpařila. Analýza surového odparku reakční směsi prokázala, že zde již není žádná výchozí látka **81**. Jakmile však došlo k přidání vody anebo k purifikaci produktu s využitím sloupcové chromatografie na silikagelu, tak se okamžitě veškerý (s největší pravděpodobností) produkt **82** hydrolyzoval zpět na výchozí kyselinu **81**. Jak jsme později zjistili, toto pozorování je v souladu s literaturou, kde velmi podobný substrát<sup>56</sup> je také velmi nestabilní a snadno podléhá rozkladu. Bez bicyklu **82** však nebylo možné dále pokračovat v syntéze vyobrazené na Obr. 32.

I přesto jsme se ale rozhodli pokračovat v mírně poupraveném schématu (Obr. 34). Rozhodli jsme přeskóčit cyklizaci a následnou ethylaci a zkusili jsme přímo ester **80** nabromovat abychom následně mohli vyzkoušet spirocyklizační krok. Bromace měla probíhat pomocí *N*-bromsukcinimidu.<sup>57</sup> Bohužel všechny naše kroky směřující k tomuto produktu se ukázali jako marné a cílový produkt **83** nebyl za žádných testovaných podmínek detekován.

Nezbývalo tedy než navrženou syntézu opustit a zkusit jiný postup (Obr. 35). Navrhli jsme alternativní přístup k látce **70**, jež využívá dvou klíčových kroků, tvorby

pyranového kruhu<sup>52</sup> a následné reduktivní cyklizace.<sup>53</sup> Jak první, tak druhý krok jsou založeny na dvou formálně (jednodušší substráty) známých krocích. Abychom si ale dopředu ověřili, že fungují (majíce špatnou zkušenost s předcházejícími reprodukcemi literatury), snažila jsem se nejprve připravit ester s laktonovým kruhem **99** (Tab. 4). Bohužel ani po opakovaných pokusech se mi nepodařilo tento publikovaný výsledek zopakovat (reakce je publikována s 49 % výtěžkem).

## 5.2 Biologické testování

Karboxylová kyselina **81** byla následně vybrána jako intermediát, u kterého byla *in vitro* otestována biologická aktivita (cytotoxicita) na nádorové buněčné linii lidských epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku HeLa. Látka však cytotoxicitu vůči těmto nádorovým buňkám nevykazovala, její hodnota IC<sub>50</sub> byla zjištěna jako vyšší než 50 μmol/L v jamce (Graf 1).



## 6 Závěr

V průběhu své bakalářské práce jsem se zaměřila na vývoj syntetických metod, jež měly za úkol nám pomyslně vydláždít cestu k látce **70**, syzylaktonu. Tato látka, jež byla nedávno izolována z hřebíčkovce jávského, totiž vykazovala značnou neuroprotektivní aktivitu na modelových substrátech. Mým cílem tak bylo pokusit se vyvinout syntetickou cestu, jež by nám umožnila přípravu nejenom této látky, ale také jejích potenciálních derivátů.

Bohužel se ukázalo, že námi navržená syntéza není schůdná. Již první krok byl obtížně optimalizovatelný a cílový adukt **80** byl získán až po dlouhodobé optimalizaci primárně literárních protokolů, které se mi nedařilo reprodukovat. V okamžiku, kdy jsem připravila ester **80** a následně z něj vytvořila odpovídající karboxylovou kyselinu **81**, jsme pozorovali, že produkt intramolekulární cyklizace, bicyklus **87**, je nestabilní, a i když se tvoří, tak při pokusech o jeho izolaci dochází k jeho znovutevření na výchozí látku. Po důkladném zkoumání literatury jsme zjistili, že u obdobného substrátu bylo pozorováno to samé. Následné pokusy, jak zachránit danou retrosyntézu (testování přístupu přes odpovídající bromovaný intermediát), resp. návrh nového přístupu založeného také na literárním precedentu, který nešel reprodukovat, pak již nevedl k žádnému cíli a projekt tak zůstal ve slepé uličce. Jinými slovy, námi navržené přístupy k **70** se ukázaly jako zcestné.

Z pohledu biologické aktivity jsem tak mohla otestovat pouze látku **81**, která nevykazovala žádnou cytotoxicitu na buňkách nádorové buněčné linie lidských epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku HeLa.

## 7 Použitá literatura

- (1) Liu, Y.-P.; Xie, Z.; Guan, R.-Q.; Du, M.-R.; Qiao, Z.-H.; Suo, X.-Y.; Liu, Z.-Y.; Bian, Y.; Qiang, L.; Fu, Y.-H. Syzysmalactone, an Unusual 11-Carbon  $\delta$ -Lactone Derivative from the Fresh Ripe Fruits of *Syzygium Samarangense* (Wax Apple). *Journal of Natural Products* **2022**, *85*, 2100–2103. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01114>.
- (2) Teoh, E. S. Secondary Metabolites of Plants BT - Medicinal Orchids of Asia; Teoh, E. S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 59–73. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5).
- (3) Ziegler, J.; Facchini, P. J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual review of plant biology* **2008**, *59*, 735–769. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>.
- (4) Maeda, H.; Dudareva, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **2012**, *63*, 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>.
- (5) Kohnen-Johannsen, K. L.; Kayser, O. Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *24*, 796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>.
- (6) Kutchan, T. M. Alkaloid Biosynthesis – The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant cell* **1995**, *7*, 1059–1070. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1059>.
- (7) Kutchan, T. M.; Gershenzon, J.; Møller, B. L.; Gang, D. R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed.; Buchanan, Bob B., Wilhelm Gruissem, R. L. J., Ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, 2015.
- (8) Hotti, H.; Rischer, H. The Killer of Socrates: Coniine and Related Alkaloids in the Plant Kingdom. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2017**, *22*, 1962. <https://doi.org/10.3390/molecules22111962>.

- (9) Masyita, A.; Mustika Sari, R.; Dwi Astuti, A.; Yasir, B.; Rahma Rumata, N.; Emran, T. Bin; Nainu, F.; Simal-Gandara, J. Terpenes and Terpenoids as Main Bioactive Compounds of Essential Oils, Their Roles in Human Health and Potential Application as Natural Food Preservatives. *Food Chemistry: X* **2022**, *13*, 100217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>.
- (10) Sommano, S. R.; Chittasupho, C.; Ruksiriwanich, W.; Jantrawut, P. The Cannabis Terpenes. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25*, 5792. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>.
- (11) Bergman, M. E.; Davis, B.; Phillips, M. A. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *24*, 3961. <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>.
- (12) Deng, Y.; Lu, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **2017**, *36*, 257–290. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852>.
- (13) Zálešák, F.; Bon, D. J.-Y. D.; Pospíšil, J. Lignans and Neolignans: Plant Secondary Metabolites as a Reservoir of Biologically Active Substances. *Pharmacological Research* **2019**, *146*, 104284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.
- (14) Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of Flavonoids and Other Phenylpropanoid-Derived Natural Products. Part I: Chemical Diversity, Impacts on Plant Biology and Human Health. *Biotechnology Journal* **2007**, *2*, 1214–1234. <https://doi.org/10.1002/biot.200700084>.
- (15) Fylaktakidou, K. C.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Litinas, K. E.; Nicolaidis, D. N. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, *10*, 3813–3833. <https://doi.org/10.2174/1381612043382710>.
- (16) Bhat, Z. S.; Rather, M. A.; Maqbool, M.; Lah, H. U. L.; Yousuf, S. K.; Ahmad, Z.  $\alpha$ -Pyrone: Small Molecules with Versatile Structural Diversity Reflected in Multiple Pharmacological Activities-an Update. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *91*, 265–277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.012>.

- (17) Krawczyk, H. The Stilbene Derivatives, Nucleosides, and Nucleosides Modified by Stilbene Derivatives. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *90*, 103073. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103073>.
- (18) Zabalza, A.; Orcaray, L.; Fernández-Escalada, M.; Zulet-González, A.; Royuela, M. The Pattern of Shikimate Pathway and Phenylpropanoids after Inhibition by Glyphosate or Quinate Feeding in Pea Roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2017**, *141*, 96–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.12.005>.
- (19) Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Biology* **1999**, *50*, 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- (20) Vogt, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **2010**, *3*, 2–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>.
- (21) null, N.; Khatkar, A.; Sharma, K. K. Phenylpropanoids and Its Derivatives: Biological Activities and Its Role in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, *60*, 2655–2675. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1653822>.
- (22) Guaadaoui, A.; Benaicha, S.; Elmajdoub, N.; Bellaoui, M.; Hamal, A. What Is a Bioactive Compound? A Combined Definition for a Preliminary Consensus. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **2014**, *3*, 17–179. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.16>.
- (23) Ruwizhi, N.; Aderibigbe, B. A. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, 5712. <https://doi.org/10.3390/ijms21165712>.
- (24) Scalbert, A. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
- (25) Taguri, T.; Tanaka, T.; Kouno, I. Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27*, 1965–1969. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1965>.
- (26) Hirsch, M. S. Azidothymidine. *The Journal of Infectious Diseases* **1988**, *157*, 427–431. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.427>.

- (27) Zhang, H.-J.; Rumschlag-Booms, E.; Guan, Y.-F.; Wang, D.-Y.; Liu, K.-L.; Li, W.-F.; Nguyen, V. H.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Fong, H. H. S.; Rong, L. Potent Inhibitor of Drug-Resistant HIV-1 Strains Identified from the Medicinal Plant *Justicia Gendarussa*. *Journal of Natural Products* **2017**, *80*, 1798–1807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00004>.
- (28) Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2005**, *45*, 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>.
- (29) Halliwell, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. *Drugs & aging* **2001**, *18*, 685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>.
- (30) Crous-Bou, M.; Minguillón, C.; Gramunt, N.; Molinuevo, J. L. Alzheimer's Disease Prevention: From Risk Factors to Early Intervention. *Alzheimer's research & therapy* **2017**, *9*, 71. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0297-z>.
- (31) Qi, Y.; Dou, D.-Q.; Jiang, H.; Zhang, B.-B.; Qin, W.-Y.; Kang, K.; Zhang, N.; Jia, D. Arctigenin Attenuates Learning and Memory Deficits through PI3k/Akt/GSK-3  $\beta$  Pathway Reducing Tau Hyperphosphorylation in A  $\beta$  -Induced AD Mice. *Planta Medica* **2017**, *83*, 51–56. <https://doi.org/10.1055/s-0042-107471>.
- (32) Beitz, J. M. Parkinson's Disease: A Review. *Frontiers in Bioscience* **2014**, *6*, 65–74. <https://doi.org/10.2741/s415>.
- (33) Baluchnejadmojarad, T.; Mansouri, M.; Ghalami, J.; Mokhtari, Z.; Roghani, M. Sesamin Imparts Neuroprotection against Intrastratial 6-Hydroxydopamine Toxicity by Inhibition of Astroglial Activation, Apoptosis, and Oxidative Stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2017**, *88*, 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.123>.
- (34) Farhan, M. Green Tea Catechins: Nature's Way of Preventing and Treating Cancer. *International journal of molecular sciences* **2022**, *23*, 10713. <https://doi.org/10.3390/ijms231810713>.
- (35) Kazeem, M. I.; Davies, T. C. Anti-Diabetic Functional Foods as Sources of Insulin Secreting, Insulin Sensitizing and Insulin Mimetic Agents. *Journal of Functional Foods* **2016**, *20*, 122–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.013>.

- (36) Uddin, A. B. M. N.; Hossain, F.; Reza, A. S. M. A.; Nasrin, Mst. S.; Alam, A. H. M. K. Traditional Uses, Pharmacological Activities, and Phytochemical Constituents of the Genus *Syzygium*: A Review. *Food Science and Nutrition* **2022**, *10*, 1789–1819. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2797>.
- (37) Sobeh, M.; Youssef, F. S.; Esmat, A.; Petruk, G.; El-Khatib, A. H.; Monti, D. M.; Ashour, M. L.; Wink, M. High Resolution UPLC-MS/MS Profiling of Polyphenolics in the Methanol Extract of *Syzygium Samarangense* Leaves and Its Hepatoprotective Activity in Rats with CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatic Damage. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *113*, 145–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.031>.
- (38) Simirgiotis, M. J.; Adachi, S.; To, S.; Yang, H.; Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Gil, R. R.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J. Cytotoxic Chalcones and Antioxidants from the Fruits of a *Syzygium Samarangense* (Wax Jambu). *Food chemistry* **2008**, *107*, 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.086>.
- (39) Raga, D. D.; Cheng, C. L. C.; Lee, K. C. I. C.; Olaziman, W. Z. P.; de Guzman, V. J. A.; Shen, C.-C.; Franco Jr., F. C.; Ragasa, C. Y. Bioactivities of Triterpenes and a Sterol from *Syzygium Samarangense*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **2011**, *66*, 235–244. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-5-606>.
- (40) Gayen, P. R.; Hossain, A. S. M. M. Al; Saifuzzaman, M.; Faroque, A. B. M. Anthelmintic Activity of Ethanolic Extract of *Syzygium Samarangense* (Blume) Merrill & Perry. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *15*, 109–111. <https://doi.org/10.3329/dujps.v15i1.29204>.
- (41) Sevenants, M. R.; Jennings, W. G. Occurrence of 6-Pentyl-A-Pyrone in Peach Essence. *Journal of Food Science* **1971**, *36*, 536–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1971.tb06409.x>.
- (42) Collins, R. P.; Halim, A. F. Characterization of the Major Aroma Constituent of the Fungus *Trichoderma Viride* (Pers.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1972**, *20*, 437–438. <https://doi.org/10.1021/jf60180a010>.
- (43) Horvat, R. J.; Chapman, G. W. Jr.; Robertson, J. A.; Meredith, F. I.; Scorza, R.; Callahan, A. M.; Morgens, P. Comparison of the Volatile Compounds from Several Commercial Peach Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38*, 234–237. <https://doi.org/10.1021/jf00091a051>.

- (44) Stoppacher, N.; Kluger, B.; Zeilinger, S.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Identification and Profiling of Volatile Metabolites of the Biocontrol Fungus *Trichoderma Atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods* **2010**, *81*, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>.
- (45) Hanson, J. R. The Chemistry of the Bio-Control Agent, *Trichoderma Harzianum*. *Science progress* **2005**, *88*, 237–248. <https://doi.org/10.3184/003685005783238372>.
- (46) Kotb, A. M. E.; Abd El-Aziz, N. K.; Elariny, E. Y. T.; Yahya, R.; Alkhalifah, D. H. M.; Ahmed, R. M. Synergistic Antibacterial Potential of 6-Pentyl- $\alpha$ -Pyrone Lactone and Zinc Oxide Nanoparticles against Multidrug-Resistant Enterobacterales Isolated from Urinary Tract Infections in Humans. *Antibiotics* **2022**, *11*, 440. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040440>.
- (47) Xicoy, H.; Wieringa, B.; Martens, G. J. M. The SH-SY5Y Cell Line in Parkinson's Disease Research: A Systematic Review. *Molecular Neurodegeneration* **2017**, *12*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- (48) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- (49) Konno, M.; Nakae, T.; Sakuyama, S.; Imaki, K.; Nakai, H.; Hamanaka, N. An Efficient Method for the Synthesis of a Novel Leukotriene B<sub>4</sub> Receptor Antagonist, ONO-4057, via Michael Reaction of Dihydroresorcinol. *Synlett* **2000**, *12*, 1472–1474. <https://doi.org/10.1055/s-1997-1079>.
- (50) West, R. A.; O'Doherty, O. G.; Askwith, T.; Atack, J.; Beswick, P.; Laverick, J.; Paradowski, M.; Pennicott, L. E.; Rao, S. P. S.; Williams, G.; Ward, S. E. African Trypanosomiasis: Synthesis & SAR Enabling Novel Drug Discovery of Ubiquinol Mimics for Trypanosome Alternative Oxidase. *Eur J Med Chem* **2017**, *141*, 676–689. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.067>.
- (51) Mamboury, M.; Wang, Q.; Zhu, J. A-Oxo-Ketenimines from Isocyanides and  $\alpha$ -Haloketones: Synthesis and Divergent Reactivity. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23*, 12744–12748. <https://doi.org/10.1002/chem.201703458>.

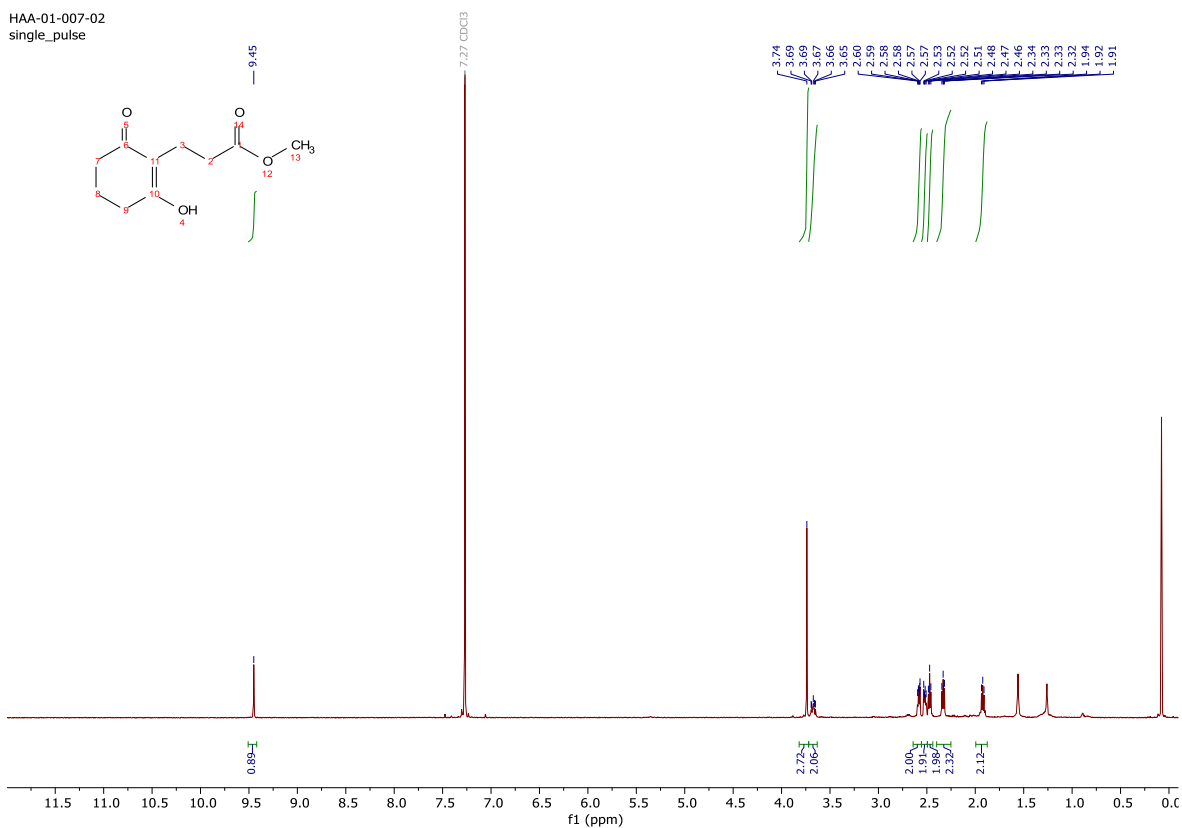
- (52) Cao, H.; Zhong, H.; Lin, Y.; Yang, L. DABCO-Catalyzed C-C Bond Formation Reaction between Electron-Deficient Alkynes and 1,3-Dicarbonyl Compounds. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4042–4047. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.047>.
- (53) Liang, T.; Nguyen, K. D.; Zhang, W.; Krische, M. J. Enantioselective Ruthenium-Catalyzed Carbonyl Allylation via Alkyne-Alcohol C-C Bond-Forming Transfer Hydrogenation: Allene Hydrometalation vs Oxidative Coupling. *J Am Chem Soc* **2015**, *137*, 3161–3164. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b00747>.
- (54) Nakhla, M. C.; Cook, C. D.; Wood, J. L. Synthetic Studies towards (±)-Isopalhinine A: Preparation of the Bicyclic Core via Nazarov Cyclization. *Tetrahedron Letters* **2021**, *74*, 153–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.153177>.
- (55) Toyota, M.; Wada, T.; Ihara, M. Total Syntheses of (–)-Methyl Atis-16-En-19-Oate, (–)-Methyl Kaur-16-En-19-Oate, and (–)-Methyl Trachyloban-19-Oate by a Combination of Palladium-Catalyzed Cycloalkenylation and Homoallyl–Homoallyl Radical Rearrangement. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 4565–4570. <https://doi.org/10.1021/jo000142b>.
- (56) Groutas, W. C.; Felker, D.; Magnin, D.; Meitzner, G.; Gavnor, T. Synthesis of Functionalized Alpha-Methylene Lactones. *Synthetic Communications* **1980**, *10*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/00397918008080047>.
- (57) Desmaeele, D.; d'Angelo, J. Stereocontrolled Elaboration of Quaternary Carbon Centers through the Asymmetric Michael Reaction Using Chiral Imines: Enantioselective Synthesis of (+)-Aspidospermidine. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 2292–2303. <https://doi.org/10.1021/jo00088a008>.



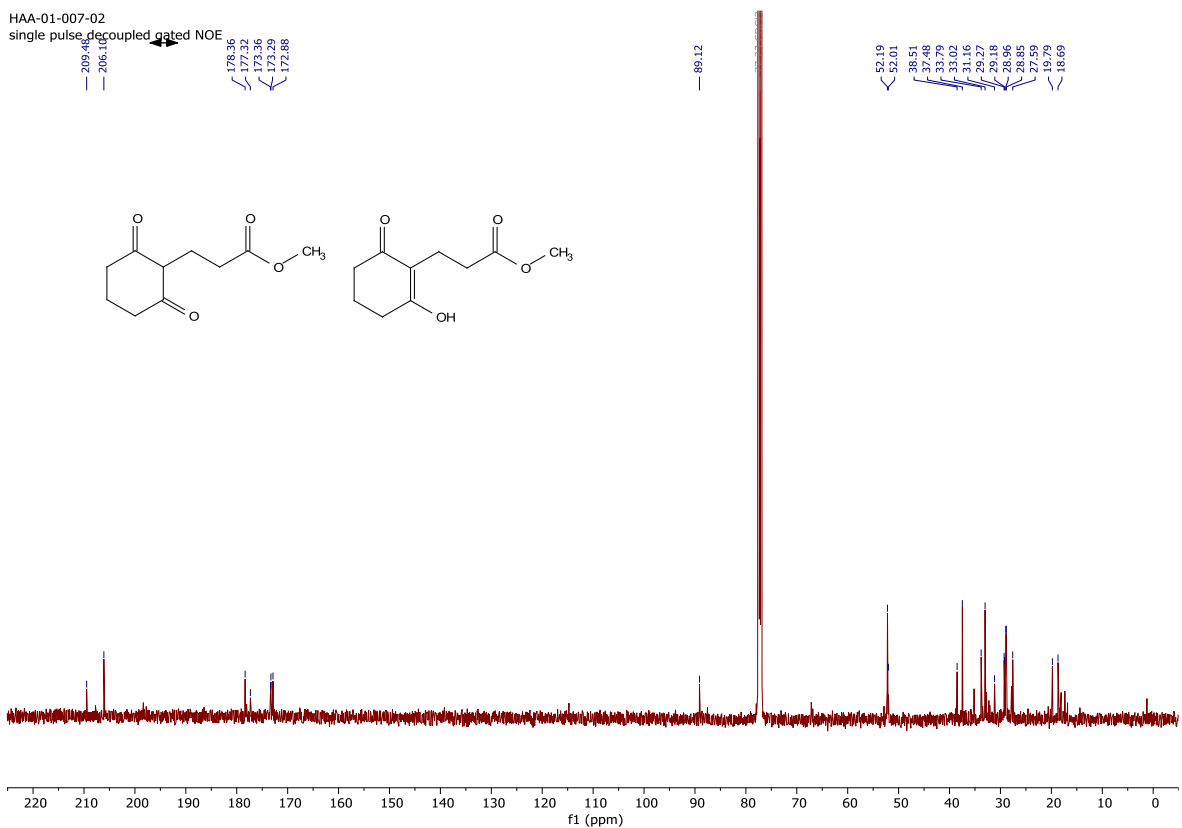
## 8 Přílohy

### 8.1 Kopie $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spekter esteru 80

HAA-01-007-02  
single\_pulse



HAA-01-007-02  
single\_pulse\_decoupled gated NOE



## 8.2 Kopie $^1\text{H}$ NMR spektra kyseliny 81

HAA-01-010-00  
single\_pulse

