UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů kyseliny α-lipoové

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. **Lenka Janálová**
Studijní program:	N1406-Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne ..... *podpis*

Děkuji RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D., za poskytnutí cenných rad a pomoc s laboratorními experimenty. Mé poděkování patří také Františku Škařupovi, Ing. Janě Kočířové, Katce Faksové a Mgr. Lucii Slobodianové za pomoc a čas, který mi věnovali v laboratoři. Na neposledním místě děkuji své rodině, která mě podporuje po celou dobu mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lenka Janálová
Název práce	Syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů kyseliny α-lipoové
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP
Vedoucí práce	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Kyselina α-lipoová je zapojena v řadě metabolických procesů. Patří mezi významné antioxidanty a působí tak proti negativnímu vlivu volných radikálů. Proto našla využití v řadě terapeutických aplikací. V této práci byla provedena syntéza konjugátů kyseliny α-lipoové s vybranými aromatickými a isoprenoidními cytokininovými bázemi. Tyto sloučeniny byly charakterizovány standardními analytickými metodami. Metoda ORAC nepotvrdila antioxidační aktivitu nově připravených konjugátů. Testy na lidských nenádorových liniích prokázaly, že připravené konjugáty nejsou toxické. Látky chránily kožní fibroblasty odvozené z pacientů s Friedreichovou ataxií před stresem vyvolaným inhibitorem syntézy glutathionu L-buthionin-S,R-sulfoximinem a některé také proti působení citronanu amonno-železitého. U samotných cytokininů nebyl pozorován protektivní efekt.

Klíčová slova	Kyselina α-lipoová, cytokininové báze
Počet stran	78
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor’s first name and surname	Lenka Janálová
Title	Synthesis and study of the biological activity of novel α-lipoic acid derivatives
Type of thesis	Master
Department	Department of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, UP
Supervisor	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Consultant:	Mgr. Jiří Voller, Ph.D.
The year of presentation	2020

α-lipoic acid is involved in a number of metabolic processes. It is also a powerful antioxidant and thus can counteract the negative effects of free radicals. Thanks to this ability, it has been used in many therapeutic applications. In this thesis, the synthesis of conjugates of α-lipoic acid with selected aromatic and isoprenoid cytokinin bases is reported. The compounds were characterized by standard analytical methods. The ORAC method did not confirm the antioxidant activity of the newly prepared conjugates. Tests on human non-tumor cell lines have shown that the prepared conjugates are not toxic. The compounds protected skin fibroblasts derived from patients with Friedreich's ataxia against glutathion synthesis inhibitor L-buthionine-S,R-sulfoximine and some of them also against ammonium ferric citrate. No protective effects was observed for the free cytokinins.

Keywords	α-lipoic acid, cytokinin bases
Number of pages	78
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Obsah 10

1 ÚVOD 1

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 2

2.1 Kyselina α-lipoová 2

2.1.1 Vlastnosti kyseliny α-lipoové 3

2.2 Použití kyseliny α-lipoové v kosmetice a dermatologii 5

2.2.1 Deriváty kyseliny α-lipoové s vlivem na ochranu kůže 7

2.3 Cytokininy 14

2.3.1 Struktura cytokininů a jejich výskyt 14

2.3.2 Vliv cytokininů na stárnutí a ochranu buněk 15

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 18

3.1 Materiály 18

3.1.1 Seznam použitých přístrojů a vybavení 18

3.1.2 Chemikálie 18

3.1.3 Seznam použitých roztoků 19

3.1.4 Testované látky 19

3.1.5 Stresory 19

3.1.6 Biologický materiál 19

3.2 Metody 20

3.2.1 Syntéza 20

3.2.2 Analytické metody 35

3.2.3 Měření antioxidační aktivity (ORAC) 36

3.2.4 Kultivace fibroblastů 37

3.2.5 Vysetí buněk do mikrotitračních desek a přidání testovaných látek a stresorů 37

4 VÝSLEDKY A DISKUZE 40

4.1 Analýza připravených látek 47

4.1.1 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin 47

4.1.2 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (9-THP-*p*T) 47

4.1.3 (E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-ol (9-THP-*t*Z) 47
4.1.4 2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butan-1-ol (9-THP-DHZ) 48
4.1.5 Látka 1 (R-LA-THP-*p*T) 48
4.1.6 Látka 2 (R-LA-*p*T) 48
4.1.7 Látka 3 (S-LA-THP-*p*T) 49
4.1.8 Látka 4 (S-LA-*p*T) 49
4.1.9 Látka 5 (R-LA-THP-*t*Z) 49
4.1.10 Látka 6 (R-LA-*t*Z) 50
4.1.11 Látka 7 (S-LA-THP-*t*Z) 50
4.1.12 Látka 8 (S-LA-*t*Z) 50
4.1.13 Látka 9 (R-LA-THP-DHZ) 51
4.1.14 Látka 10 (R-LA-DHZ) 51
4.1.15 Látka 11 (S-LA-THP-DHZ) 52
4.1.16 Látka 12 (S-LA-DHZ) 52
4.2 Stanovení celkové antioxidační kapacity (ORAC) 53
4.3 Hodnocení toxicity připravených látek 55
4.4 Hodnocení protekce proti toxickému působení L-buthionin-S,R-sulfoximinu 55
4.5 Hodnocení protekce proti toxickému působení soli trojmocného železa 56
4.6 Hodnocení vlivu na koncentraci redukovaného glutathionu po expozici L-buthionin-R,S-sulfoximinu. 57
5 ZÁVĚR 60
6 LITERATURA 61
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 68

CÍLE

TEORETICKÁ ČÁST

Zpracování literární rešerše na téma kyselina α-lipoová a její deriváty se zaměřením na aplikaci v dermatologii a kosmetice.

Shrnutí vlivu vybraných cytokininů a jejich potenciálu v kosmetologii a dermatologii.

PRAKTICKÁ ČÁST

Příprava nových derivátů kyseliny α-lipoové. Charakterizace sloučenin standardními analytickými metodami.

Testovaní vlivu látek na viabilitu nenádorových linií.

Testování schopnosti látek chránit lidské buňky proti různým formám stresu.

Studium vlivu látek na parametry související s oxidativním stresem.

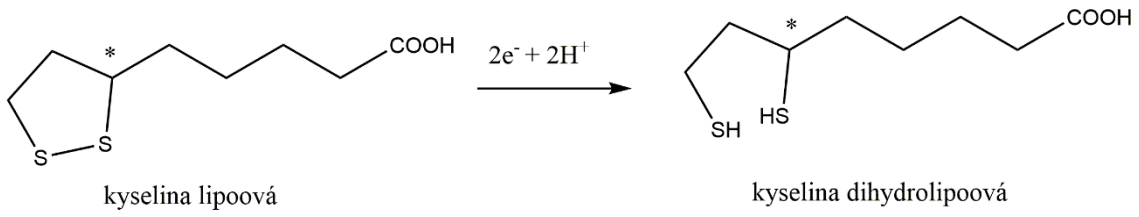
1 ÚVOD

Kyselina α-lipoová (LA) je karboxylová kyselina, která ve své struktuře obsahuje disulfidovou vazbu. Díky přítomnosti asymetrického uhlíku tvoří R- a S-izomery, avšak pouze R-forma je syntetizována živými organismy (Mulchand a Lester, 2008). V současné době je LA zkoumána především pro své antioxidační a cytoprotektivními účinky (Moura et al., 2015). Řada experimentálních a klinických studií prokázala účinnost léčby LA u nemocí, u nichž je narušena rovnováha pro- a antioxidantů. LA je také využívána jako účinná složka v kosmetických prostředcích pro regeneraci kůže poškozené slunečním zářením a pro zpomalení stárnutí (Rona et al., 2004). Pro zvýšení účinnosti byly navrženy hybridní sloučeniny, které obsahují v molekule LA a další biologicky aktivní látku. Například konjugáty s vlivem na melanogenzi jako je dihydrolipoylhistidinát sodno-zinečnatý, konjugát LA a pentapeptidu KTTKS nebo konjugáty LA s kyselinou kávovou (Tsuji-Naito et al., 2007; Lu et al., 2013; Micillo et al, 2017; Micillo et al, 2018). Dále pak trisulfidový derivát LA, který lze využit jako zdroj selenu (Alonis et al., 2006). V této práci byly připraveny konjugáty kyseliny lipoové zahrnující oba enantiomery s vybranými cytokininy. U zmíněné skupiny rostlinných hormonů byla prokázána antisenescenční aktivita nejen na rostlinných, ale i lidských buňkách. Například kinetin a *trans*-zeatin zpomalují stárnutí lidských kožních fibroblastů *in vitro* (Rattan a Clark, 1994, Rattan a Sodagam, 2005) a jsou aktivní složkou kosmetiky.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kyselina α-lipoová

Kyselina lipoová (LA) byla poprvé izolována a identifikována Lesterem Reedem v roce 1951 (Reed et al., 1951). Vyskytuje se jako dva enantiomery, avšak pouze R-forma je přirozeně syntetizována a využívaná v živých organismech (Mulchand a Lester, 2008) Jedná se o nasycenou mastnou kyselinu. Uhlíky 6, 7 a 8 tvoří se dvěma atomy síry ditiholanový kruh. Redukcí disulfidové vazby vzniká kyselina dihydrolipoová (DHLA), která ve své struktuře obsahuje dvě -SH skupiny (Obr. 1).



Obr. 1 – Reakční schéma redukce kyseliny lipoové na kyselinu dihydrolipoovou.

R-LA je kofaktorem mitochondriálních enzymových komplexů, hraje tedy významnou roli v energetickém metabolismu. Díky svým jedinečným antioxidačním vlastnostem je tato látka využívána nejen jako doplněk stravy ale i jako léčivo (Scott et al., 1994; Moini et al., 2002; Packer et. al., 2011) Objevují se publikace, které potvrzují pozitivní účinek LA při léčbě diabetu, aterosklerózy, degenerativních procesů v neuronech, chorob kloubů nebo syndromu získané imunodeficience (AIDS) (Smith et al., 2004). Tato sloučenina je zkoumána převážně pro její jedinečnou redukční sílu. Díky nízkému redoxnímu potenciál oxidované a redukované formy (LA/DHLA) se DHLA podílí na neutralizaci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a na redukci oxidovaných forem jiných antioxidantů, např. glutathion disulfidu na glutathion (Bilska a Włodek, 2005). Další funkcí LA je chelatace přechodných kovů, např. Cu^{2+} (Ou et al., 1995).

2.1.1 Vlastnosti kyseliny α-lipoové

2.1.1.1 Kyselina α-lipoová jako antioxidant

Antioxidační vlastnosti LA byly pozorovány již v roce 1959 Rosenbergem a Culikem. Podání LA potlačilo příznaky dlouhodobého nedostatku vitamínu C u morčat, a také předcházelo symptomům deficience vitamínu E u krys krmených potravou postrádající α-tokoferol (Rosenberg a Culik, 1959). Přítomnost disulfidové vazby ve struktuře LA ji činí unikátním antioxidantem, který zháší různé typy volných radikálů. LA neutralizuje hydroxylové, peroxylové, superoxidové, a také dusíkaté radikály. Je tak součástí obranného mechanismu buněk proti oxidativnímu stresu, který je příčinou mnoha nemocí. Nadprodukce volných radikálů může způsobit oxidativní poškození lipidů, proteinů a DNA. Dokonce může vést k chronickým nemocem, zejména neurodegenerativním. Nepřímá antioxidační funkce LA spočívá v regulaci transkripce genů, které jsou zapojeny v syntéze redukovaného glutathionu (GSH), regeneraci redukované formy vitamínů C, E a glutathionu z jejich oxidované formy (Packer et al., 1995; Biewenga et al., 1997).

Jedna z nejdůležitějších vlastností LA jako antioxidantu je regulace metabolickych drah. Redukce LA na DHLA může regulovat homeostázu v buňce. Příkladem je vliv LA na poměr redukované a oxidované fromy NAD(P)H/NAD(P)$^+$ (Roy et al., 1997). Po 24 hodinovém ošetření 0,5 mM LA byl u lidských T-lymfocytů pozorován pokles hladin NADH, NADPH, NADH/NAD$^+$, laktátu/pyruvátu a zvýšený příjem glukózy. Pokles poměru NADH/NAD$^+$ po aplikaci LA může mít přímé spojení s léčbou cukrovky, ischemicko-perfúzním onemocněním a dalšími patologickými stavy, kde jsou redukční (vysoký poměr NADH/NAD$^+$) a oxidační (přebytek ROS) nerovnováhy považovány za hlavní faktory přispívající k poruchám metabolismu. Za podmínek redukčního stresu LA snižuje vysokou hladinu NADH v buňce tím, že jej využívá jako kofaktor pro vlastní redukci. Naopak při oxidativním stresu LA a její redukovaná forma přispívají k ochraně buněk zhášením volných radikálů a regenerace dalších antioxidantů z jejich oxidované formy (Kagan et al., 1992). V buňkách je LA redukována na DHLA enzymatickými procesy, proto hraje důležitou roli i prostorové uspořádání této molekuly. Mezi enzymy redukující LA na DHLA patří lipoamid dehydrogenáza, která je vysoce specifická k R-enantiomeru, glutathion reduktáza vykazující větší specifitu k S-enantiomeru (Constantinescu et al., 1995; Pick et al., 1995) a thioredoxin reduktáza (Arner et al., 1996).

2.1.1.2 Kyselina α-lipoová jako kofaktor.

Produkce energie v mitochondriích primárně závisí na několika enzymatických dehydrogenázových komplexech, které využívají různé substráty pro redukci NAD^+ a FAD na NADH a $FADH_2$. Tyto molekuly dodávají elektrony do elektronového transportního řetězce, který je zakotven na vnitřní mitochondriální membráně (Cadenas a Packer, 2002). V lidských buňkách se LA nachází jako kofaktor, který je vázán amidickou vazbou na zbytek lysinu v aktivním místě pěti mitochondriálních proteinů, které hrají ústřední roli v oxidačním metabolismu (Reed, 1998). Patří zde acyltransferázová složka pyruvátového komplexu, α-ketoglutarátový komplex, dehydrogenázový komplex α-ketokyselin s rozvětveným řetězcem, protein X pyruvát dehydrogenázového komplexu a H-protein dráhy štěpení glycinu. Lipoyllysinový zbytek funguje jako nosič meziproduktů, a také jako redoxní činidlo interagující jinými redukčnímu ekvivalenty v aktivních místech komplexů. Rodina multienzymových komplexů dehydrogenáz 2-oxokyselin katalyzuje oxidativní dekarboxylaci 2-oxokyselin v glykolýze, citrátovém cyklu a v metabolismu rozvětvených aminokyselin (Patel a Roche, 1990; Perham, 1991).

Pyruvátdehydrogenázový komplex je tvořen 3 enzymy: E1 (pyruvát dehydrogenáza), E2 (dihydrolipoamidacetyl transferáza) a E3 (dihydrolipoamidacetyl dehydrogenáza). LA je kovalentně vázána na amino skupinu lysinu E2. Na LA se dále váže enzymem E1 dekarboxylovaný pyruvát, kdy dojde k oxidaci hydroxyskupiny pyruvátu na oxoskupinu za současné redukce lipoátu na dihydrolipoát. Pomocí enzymu E3 je dále acetyl z dihydrolipoátu přenesen na koenzym A a vzniká tak acetylkoenzym A (Reed et al., 1958; Loffelhardt et al., 1995; Biewenga et al., 1996). R-enantiomer LA je přirozeným substrátem pro zmíněné komplexy, avšak S-enantiomer je lepším substrátem pro savčí glutathion reduktázu (Pick et al, 1995).

Khanna et al. (1998) testovali, zda podání racemické LA krysám vede k inkorporaci LA do proteinů. Zvýšená koncentrace lipoyllysinu byla pozorována pouze po fyzické zátěži v játrech, ale ne v jiných orgánech/tkáních. (Khanna et al., 1998).

2.1.1.3 Chelatace kovů

Ionty těžkých kovů mohou katalyzovat tvorbu volných radikálů a indukovat tak oxidativní poškození. Dále mohou působit jako potencionální toxiny a způsobovat rakovinu (Valko et al, 2005). LA a DHLA disponují nejen přímými antioxidačními vlastnostmi, ale dokáží i vázat kationty kovů, jako jsou Co, Fe, Zn a Mg (Shay et al.,

2009). LA se používá v chelatační terapii k odstranění nadbytku kovů z tkání, a tím napomáhá k jejich vyloučení z organismu. K potvrzení těchto vlastností byla provedena studie, která hodnotila nejen schopnost LA vázat železité ionty, ale i účinek na toxicitu solí železa. Lidské kmenové mezenchymové buňky byly ošetřeny citrátem amonno-železitým (FAC) v koncentraci 120 $\mu g.ml^{-1}$ s přídavkem 20 $\mu g.ml^{-1}$ LA nebo bez LA. Výsledky experimentu ukázaly, že FAC zvyšuje akumulaci intracelulárního železa, což má za následek zhoršení mitochondriálního membránového potenciálu, integrity organel a tvorbu ROS. Po ošetření mezenchymálních kmenových buněk LA hladiny ROS postupně poklesly až na bazální hladinu. Dále došlo ke snížení intracelulárního železa a obnově potenciálu a integrity mitochondriální membrány (Camiolo et al., 2019).
Chelatační vlastnosti LA lze použít k tvorbě multifunkčních léčiv obsahujících komplex LA se zinkem. Tento komplex se může podílet na eliminaci aktivních forem kyslíku, inhibuje aktivitu tyrozinázy i elastázy a potlačuje produkci melaninu (Ogata, 2004). Dále byly u tohoto derivátu potvrzeny protizánětlivé účinky (Shoji et al., 2017).

2.2 Použití kyseliny α-lipoové v kosmetice a dermatologii

LA je hojně používána pro kosmetické účely. Využití našla například při oddálení stárnutí kůže a poškození následkem vystavení slunečnímu záření (Rona et al., 2004). Dále LA přispívá k tvorbě kolagenu (Han a Nimni, 2005), léčbě růžovky (Perricone, 2002) a akné (Perricone 2003). Tato látka byla použita při léčbě dermatitidy, xerózy, ekzému, psoriázy, spálení kůže vlivem vysoké teploty nebo radiace a dalších druhů kožního zánětu nebo změn kůže spojených se stárnutím (Perricone, 2004).
Stárnutí kůže je komplikovaný biologický proces zapříčiněný vnějšími i vnitřními vlivy, které vedou ke strukturním a fyziologickým změnám. Tyto změny jsou částečně způsobeny kumulativním ROS, které jsou generovány oxidativním buněčným metabolismem. Volné radikály jsou sloučeniny, které ve své valenční sféře mají lichý počet elektronů a jsou schopny samostatné existence. Jsou vysoce reaktivní, a proto jsou potenciálně nebezpečné pro živé organismy. Mohou poškodit buněčné složky, jako jsou membrány, enzymy a DNA. Tyto škodlivé reakce jsou regulovány antioxidačním obranným systémem, který eliminuje prooxidanty a zháší volné radikály (Yaar et al., 2003; Baumann et al., 2002). ROS jsou spojovány nejen s celkovým procesem stárnutí, ale jsou pravděpodobně zapojeny ve fotocitlivosti, karcinogenezi a zánětu kůže.

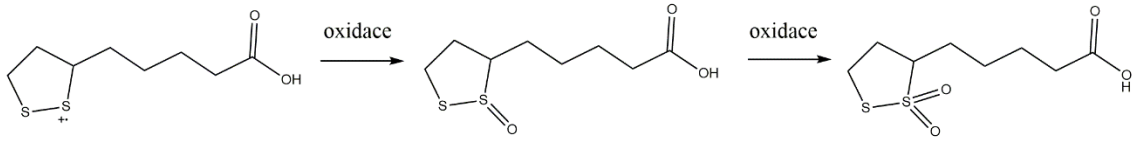
Kůže disponuje dvěma hlavními obrannými mechanismy před zářením. Melanin je obecně považován za ochranu kůže proti nebezpečným účinkům slunce. Tato fotoprotektivní role melaninu vyplývá z jeho schopnosti absorbovat záření v UV, viditelném a IR spektru. Zamezuje tak pronikání záření skrz epidermální vrstvy a zachycuje ROS. K obraně kůže rovněž přispívá bariéra kyseliny urokanové ve stratum corneum, která odráží a absorbuje významné množství UVB záření. Tloušťka vrstvy stratum corneum se jeví jako důležitý faktor při fotoprotekci kůže (Gniadecka et al., 1996). Mezi další obranné mechanismy patří antioxidanty, jejichž funkcí je neutralizace volných radikálů. Antioxidanty přirozeně se vyskytující v organismu jsou např. enzymy: superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, a také nízkomolekulární antioxidanty jako jsou α-tokoferol, kyselina askorbová a koenzym Q10 (CoQ10). Antioxidanty dále nalezneme v potravě nebo ve výživových doplňcích (Lobo et al., 2010). LA a DHLA efektivně zabraňují poškození ROS. DHLA redukuje oxidovanou formu CoQ10 (ubichinon) na ubichinol, a tak zvyšuje antioxidační kapacitu v membránách (Kozlov et al., 1999). Současné podání LA a CoQ10 je účinnější při snižování oxidativní mitochondriální dysfunkce (Liu, 2008).

Beitner (Beitner, 2003) uvedl, že ošetření krémem obsahující 5% LA zlepšilo klinické vlastnosti spojené s vystavením pokožky UV záření. Do této studie bylo zařazeno 33 žen, průměrného věku 54,4 let. Po dvou týdnech léčby bylo patrné výrazné zlepšení drsnosti kůže a jejího jasu. Další studie zkoumala účinnosti perorálního ošetření tabletou obsahující 100 mg LA a další antioxidanty u 40 žen s projevy stárnutí kůže. Na základě měření hrubosti a pružnosti kůže a hodnocení dalších klinických parametrů bylo pozorováno značné zlepšení uvedených parametrů po 6 měsících léčby (Thom, 2005).

Vystavení cigaretovému kouři vede k tvorbě ROS a generaci bioaktivních molekul, které mohou poškodit buňky pokožky. Yıldırım Baş et al. (2017) provedli výzkum, který se zabýval účinky LA na kůži krys ovlivněné kouřením. V této studii bylo testováno 28 krys, které byly rozděleny do tří skupin: kontrolní skupina (n = 8), kuřácká skupina (n = 10;12 cigaret za den, po dobu 8 týdnů) a kuřácká skupina, která přijímala LA (n = 10; 12 cigaret za den + 100 $mg.kg^{-1}$ LA, po dobu 8 týdnů). Ve skupině kuřáků byly zaznamenána degradace/ redukce svazků kolagenu, vlasových folikul a degradace potních žláz. Ve skupině ošetřené LA byly všechny tyto změny minimalizovány. Dále byl kvantifikován malondialdehyd (MDA), který slouží jako indikátor peroxidace lipidů. Hladina MDA byla značně vyšší u skupiny kuřáků v porovnání s kontrolní skupinou. U skupiny přijímající LA byla hladina MDA naopak nižší. Rovněž byla u testovaných skupin

porovnávána karbonylace proteinů. U skupiny kuřáků došlo k navýšení oproti kontrole, kdežto u skupiny ošetřené LA byla hladina nižší dokonce i v porovnání s kontrolní skupinou. Touto studií bylo prokázáno, že cigaretový kouř může u krys způsobit degeneraci kožní tkáně. Současné ošetření LA má pozitivní účinek na zmírnění následků poškození kůže vyvolané cigaretovým kouřem (Yıldırım Baş et al., 2017)

Navzdory velkému potenciálu, použití LA v kosmetických přípravcích je limitováno fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména chemickou nestabilitou (Ames, 2004; Segall et al., 2004; Souto et al., 2005). U LA dochází k snadné oxidaci za tvorby 1,2-dithiolan-3-ylového radikálového kationtu, thiosulfinátu nebo thiolsulfonátu (Obr. č. 2) (Fuchs et al., 1997).



Obr. 2 Reakční schéma oxidace kyseliny lipoové.

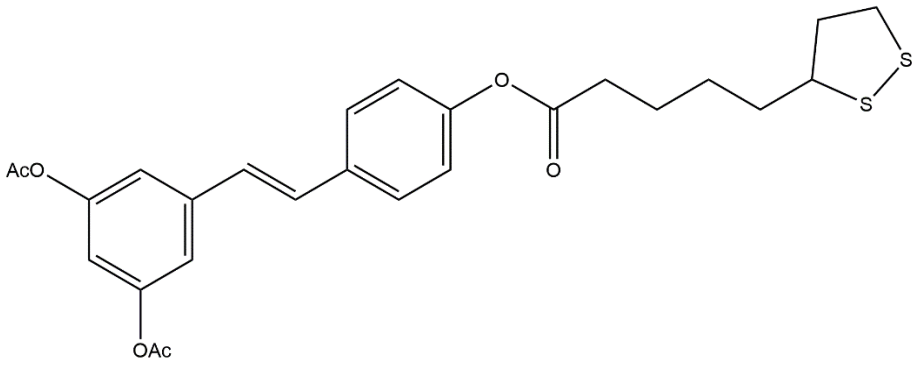
2.2.1 Deriváty kyseliny α-lipoové s vlivem na ochranu kůže

Vstřebávání řady léků pokožkou je omezené kvůli jejich nevhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem. Absorpci látek lze zlepšit dočasnou chemickou modifikací. Proléčiva (prodrugs) vznikají spojením aktivní látky a pomocné látky, metabolicky štěpitelnou vazbou za účelem překonání farmaceutických a farmakokinetických bariér. Nevýhoda tohoto přístupu spočívá v potencionální zátěži organismu ve spojitosti s transportní molekulou. Při jejím uvolnění může dojít k vyvolání nežádoucích účinků. Určitou variantou tohoto přístupu jsou co-drugs - spojení dvou nebo více terapeutických sloučenin (Lau et al., 2008). Návrh a syntéza hybridních molekul obsahujících LA je předmětem výzkumu v posledních desetiletích (Koufaki et al., 2009). Známé konjugáty kombinují antioxidační aktivitu s celou řadou jiných aktivit, jako jsou: ochrana před perfúzními arytmiemi, inhibice syntázy oxidu dusnatého, ochrana erytrocytů před hemolýzou, antiproliferační aktivita, inhibici acetylcholinesterázy, neuroprotektivní nebo protizánětlivá aktivita (Koufaki et al, 2001; Gruzman et al., 2004; Koufaki et al., 2004; Antonello et al., 2005; Detsi et al., 2007). Dále uvádím příklady některých z nich. Novým přístupem je použití LA při vývoji antioxidačních proléčiv velikosti nanometrů (Lee et al, 2009).

2.2.1.1 Resveratrol-LA

Resveratrol je polyfenol, který produkují některé rostlinné druhy, např. modré či červené odrůdy révy vinné, černý rybíz nebo brusnice borůvka. Je známo, že červené víno obsahuje až 7 $mg.l^{-1}$ resveratrolu, a proto byl jeho konzumací částečně vysvětlován tzv. francouzský paradox, který v roce 1819 popsal Samuel Black. Jedná se o skutečnost, že lidé žijící ve Francii trpí nízkým výskytem akutních srdečních příhod, navzdory vysoké konzumace nasycených tuků (Jaklová Dytrtová et al., 2018). Současné výzkumy naznačují, že resveratrol je účinnou látkou v prevenci proti nemocem souvisejících se stárnutím, včetně neurodegenerativních onemocnění, obezity, diabetu a kardiovaskulárních chorob (Li et al., 2017).

Použití přírodních antioxidantů, jako jsou polyfenoly, je limitováno jejich snadnou oxidací a následnou ztrátou svých vlastností. Resveratrol-LA ester vykazoval zvýšenou fotostabilitu a lipofilitu. Rovněž bylo prokázáno, že enzymy stratum corneum účinně hydrolyzují prekurzor a uvolňují aktivní molekuly resveratrol a LA v podmínkách *in vitro* po dobu 72 hod při neutrálním pH (Gelo-Pujic et al., 2008).



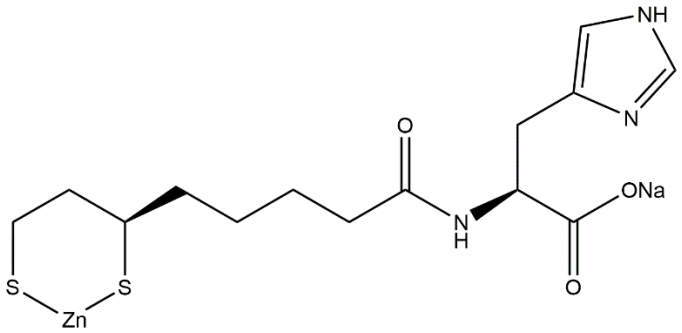
Obr. 3 Struktrura konjugátu R,S-LA a resveratrolu.

2.2.1.2 Dihydrolipoylhistidinát sodno-zinečnatý

Princip fungování látek zesvětlující pokožku je založen na snížení syntézy melaninu inhibicí aktivity tyrosinázy. Dalším přístupem je reakce mezi sulfhydrylovými sloučeninami a DOPAchinonem, oxidačním produktem L-DOPA při tvorbě melaninu. Bylo prokázáno, že DHLA reaguje s DOPAchinonem. Při této reakci vzniká konjugát lipoyl-DOPA, a tak nedochází k následné tvorbě pigmentu. DHLA samotnou však nelze použít pro kosmetické aplikace kvůli její snadné oxidovatelnosti a nízké lipofilitě limitující penetraci. Dihydrolipoylhistidinát sodno-zinečnatý (DHLHZn) má oba tyto

parametry zlepšené. Buňky myšího melanomu B16 byly kultivovány s DHLHZn (75 μM) po dobu 3 dnů pro posouzení depigmentační aktivity. Pozorován byl silný inhibiční účinek na tvorbu melaninu srovnatelý s α-arbutinem (Tsuji-Naito et al., 2007).

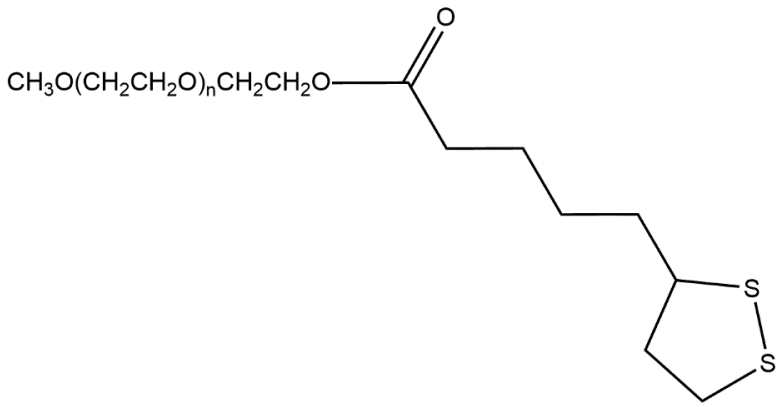
Ve studii Hagiwara et al. (2011) byl zkoumán efekt DHLHZn na chemoterapií indukovanou alopecií u krys. Po dobu 7 dní byly krysy vystaveny cytosin arabinosidu (AraC; intraperitoneální injekce) a zároveň ošetřeny krémem obsahujícím 0%, 0,5% nebo 1% DHLHZn po dobu 12 dní. Vypadávání chlupů a histologické změny tkáně hlavy byly hodnoceny 12 dní po zahájení podávání AraC. Léčba 0,5% a 1% DHLHZn významně snížila vypadávání chlupů vyvolané AraC. DHLHZn tedy významně snížil alopecii vyvolanou AraC pravděpodobně oslabením zánětlivé reakce vlasových folikul nebo snížením oxidativního stresu (Hagiwara et al., 2011).



Obr. 4 Struktura dihydrolipoyl histidinátu sodno-zinečnatého.

2.2.1.3 Konjugát LA-PEG

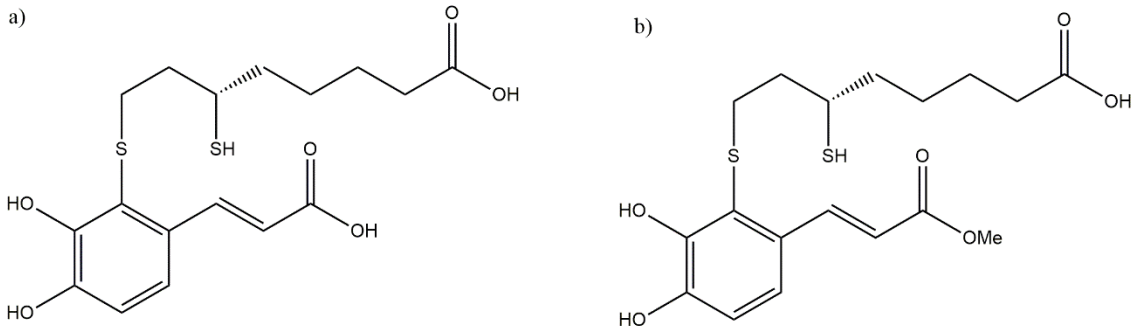
Spojením LA a polyethylenglykolu (PEG) o molekulové hmotnosti 2000 vznikla látka, která má vliv na melanogenezi. Kim et al. (2008) zkoumali účinky na inhibici tyrosinázové aktivity a syntézu melaninu v buňkách myšího melanomu B16F10. Po ošetření LA-PEG 2000 došlo k významnému poklesu biosyntézy melaninu až o 63 % při 0,25 mM koncentraci. Tyrosinázová aktivita byla snížena až o 80 % při koncentraci 0,5 mM. Pomocí biochemických metod byla zjištěna snížená hladina melanogenního enzymu tyrosinázy. Výsledky této studie naznačují, že LA-PEG 2000 inhibuje biosyntézu melaninu snížením hladiny a exprese tyrosinazové aktivity (Kim et al., 2008).



Obr. 5 Struktura konjugátu kyseliny lipoové a polyethylenglykolu.

2.2.1.4 Konjugáty LA a kyseliny kávové

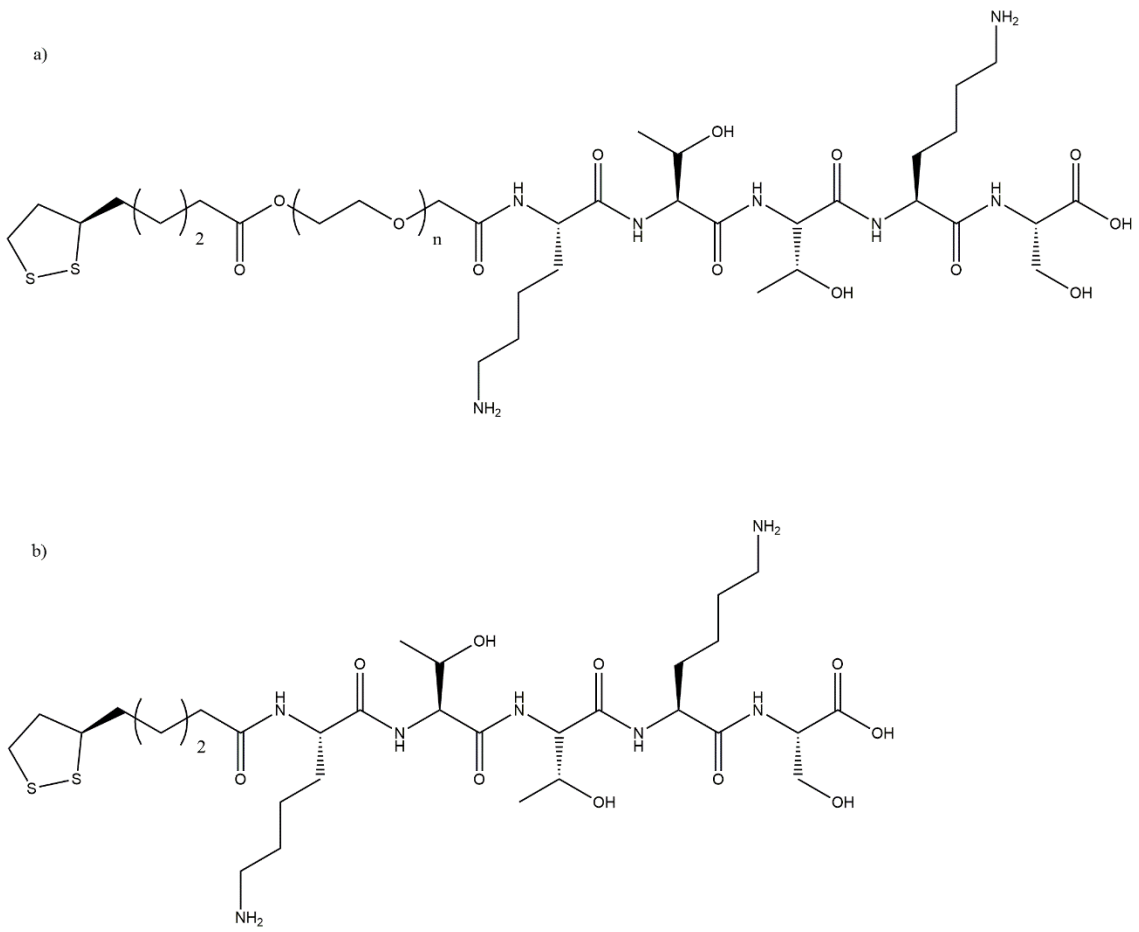
Deriváty kyseliny kávové inhibující tyrosinázu jsou studovány jako léčiva pro terapii lokální hyperpigmentace spojené s nadprodukcí nebo akumulací melaninu. Byla popsána inhibiční aktivita kyseliny 2-S-lipoylkávové (LCA), konjugátu kyseliny kávové s DHLA, na tyrosinhydroxylázovou (TH) a L-DOPA oxidázovou (DO) aktivitu houbové tyrozinázy (Micillo et al., 2017). Ještě silnější účinek než LCA a referenční látka kyselina kojová má lipofilnější methylester kyseliny 2-S-lipoylkávové (LCAME). Obě látky inhibují i DO aktivitu lidské tyrosinázy - s IC50 76 μM pro LCA a 30 μM pro LCAME. Účinek na TH aktivitu byl slabší. Po 24 hodinách ošetření lidských melanomových buněk inhibitorem nebyla pozorována žádná změna bazální exprese tyrosinázy. Výsledky však naznačují, že LCAME může blokovat indukci exprese tyrosinázy v buňkách stimulovaných α-melanocyty stimulujícím hormonem (Micillo et al., 2018).



Obr. 6 Struktury derivátů kyseliny kávové: a) kyseliny 2-S-lipoylkávové a b) methylesteru kyseliny 2-S-lipoylkávové.

2.2.1.5 Peptidické deriváty LA

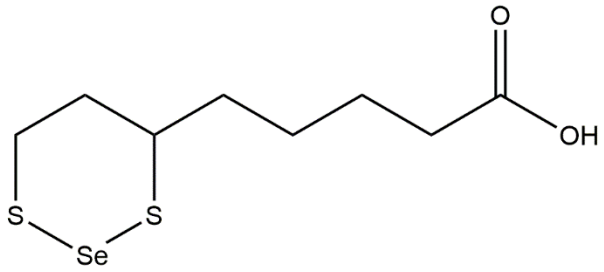
Látky s výhodnějšími vlastnostmi byly získány také spojením LA s oliogopeptidy. Tyto konjugáty mají nejen anti-melanogenní vlastnosti, ale mohou také zmírňovat projevy stárnutí. Známým peptidem pro kosmetické aplikace je KTTKS (Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), který podporuje produkci extracelulární matrix a remodelaci tkáně. (Lupo et al., 2007). Sekvence peptidu byla navržena na základě aminokyselinové sekvence přítomné v kolagenu typu I, který je hlavní formou kolagenu v lidské kůži (Katayama et al., 1993). Pro zlepšení dodání pentapeptidu přes epidermis lze použít chemické zesilovače penetrace, jako jsou mastné kyseliny (Aungst at al., 1990). Chemická modifikace PEG může také zlepšit účinnost léčiva jeho chemickou a biologickou stabilizací a rovněž zlepšit vstřebatelnost do kůže (Sarpotdar et al., 1986). Molekuly kombinující několik benefitů byly připraveny spojením KTTKS a lipofilní LA. U LA-pentapeptidu byl prokázán větší inhibiční efekt na syntézu melaninu a tyrosinázovou aktivitu, než u LA nebo pentapeptidu samotného. Dále byla u konjugátů zkoumána biologická aktivita v lidských dermálních fibroblastech, včetně inhibičního účinku na expresi matrixové metalloproteinázy-1 (MMP-1) a stimulačního účinku na biosyntézu kolagenu. LA-KTTKS a LA-PEG-KTTKS inhibují expresi MMP-1, která je indukována UV zářením, až o 49,5 % a 69,5 % při koncentraci 0,5 mM. LA-peptid rovněž stimuluje biosyntézu kolagenu s větším účinkem než vybrané molekuly samotné. Konjugáty nejsou toxický ani při vyšších koncentracích, a tak jsou tyto látky vhodnými kandidáty pro použití v kosmetických aplikacích (Lu et al., 2013).



Obr. 7 Struktury konjugátu kyseliny lipoové a pentapeptidu: a) R-LA-PEG-KTTKS a b) R-LA-KTTKS.

2.2.1.6 Selenotrisulfidový derivát LA

Selen je mikroelement potřebný pro aktivitu enzymů, které obsahují selenocystein v aktivní místě. Mezi tyto enzymy patří některé izoenzymy glutathionperoxidázy a thioredoxin reduktázy zapojené v obraně buněk proti oxidativnímu stresu. Dostupnost Se v tkáních tak má výrazný vliv na rovnovážný stav hladiny ROS (Brigelius-Flohe, 1999). Cílem studie Alonise et al. (2006) bylo určit, zda je trisulfidový derivát kyseliny lipoové (LASe) absorbován kůží a zhodnotit biologickou dostupnost selenu z této sloučeniny. LASe byla účinně absorbována do kůže prasat, která je používaná jako model pro lidskou kůži. LASe byl rovněž dobrým zdrojem selenu pro syntézu selenoproteinů. Výsledky navíc ukázaly, že látka chrání keratinocyty HaCaT před smrtí indukovanou UV zářením. Při dávce 500 $J.m^{-2}$ byla míra přeživších buněk stanovena na 40 %. Ošetření buněk 50-500 nM LASe před vystavením UV záření zvýšilo míru přežití na víc než 50 % (Alonis et al., 2006). Kůže je denně vystavena UV záření, které generuje ROS, proto optimální kapacita selenoenzymů prostřednictvím suplementace selenu může poskytnout vysoce efektivní prevenci proti rakovině kůže (Whanger, 2004).



Obr. 8 Struktura selenotrisulfidu odvozeného od R,S-kyseliny lipoové.

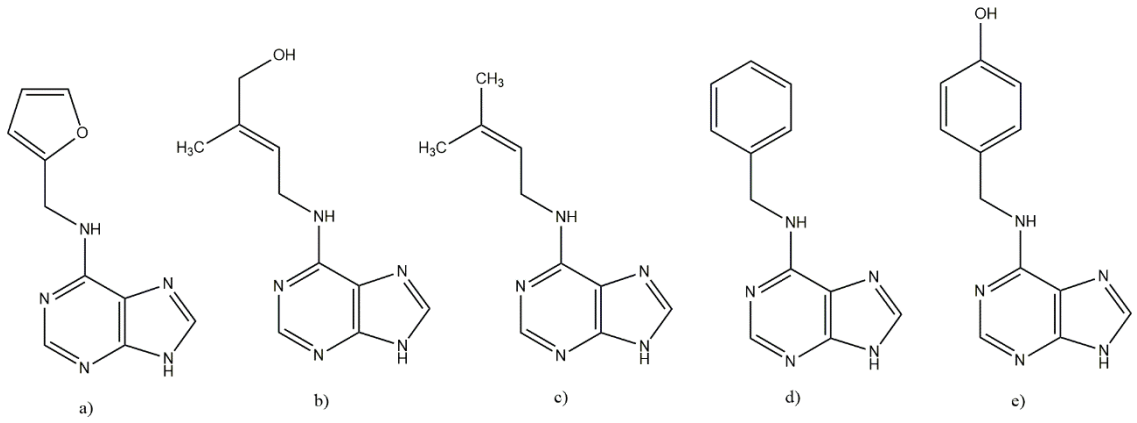
2.3 Cytokininy

Cytokininy jsou třída rostlinných hormonů, které podporující dělení buněk. Jejich aktivita je spojena s dalším fytohormonem, auxinem (Skoog et al., 1965). Jsou zapojeny do vývoje a růstu nadzemní i podzemní části rostlin (Mok a Mok, 1994; Hwang et al., 2012) Rovněž zprostředkovávají reakce na vnější faktory, jako jsou například světelné podmínky a dostupnost vody nebo živin. Cytokininy jsou kromě abiotického stresu zapojeny do odpovědi na stres biotický. Podílí se na vývojových změnách v důsledku interakce s patogenními nebo symbiotickými bakteriemi či houbami (Werner a Schmülling, 2009). Cytokininy regulují senescenci listů, typ programované buněčné smrti, která představuje konečnou fázi vývoje listu. Snížená hladina je pozorována u senescentních listů, zatímco externí působení cytokinů často vede k oddálení senescence (Van Staden, 1988; Gan a Amasino, 1995). Znalost role cytokinů při regulaci vývoje a růstu rostlin podnítila studie možného využití cytokininů při léčbě nemocí u lidí. Zejména nemocí, jejichž projevem je porucha dělení a diferenciace buněk (Mittelman et al. 1975). U některých analog cytokininu, jako je roskovitin nebo olomoucin, byly prokázány protinádorové účinky. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici cyklin-dependentních kinas (CDK), které jsou odpovědné za buněčné dělení (Veselý et al., 1994; Havlíček et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Kryštof et al., 2002). Cytokininy našly své využití i v kosmetologii. T*rans*-zeatin, *para*-topolin, kinetin a jeho derivát pyratin se v současnosti používají jako složky kosmetických přípravků, které chraní pokožku před vnějšími vlivy, oddalují projevy stárnutí nebo zesvětlují pokožku (McCullough et al., 2008; Wanitphakdeedecha et al., 2015, Garcia et al., 2018).

2.3.1 Struktura cytokininů a jejich výskyt

Cytokininy se řadí mezi deriváty adeninu substituované v N^6 pozici. Podle postranního řetězce se dělí na isoprenoidní nebo aromatické. Uměle připravené látky s cytokininovou aktivitou mohou obsahovat odlišné struktury, například fenylmočovinu. Mezi isoprenoidní cytokininy patří *cis*- a *trans*-zeatin (*t*Z) a jeho analogy s nasyceným postranním řetězcem (dihydrozeatin, DHZ) nebo bez hydroxylové skupiny (N^6-isopentenyladenin, iP). Isoprenoidní cytokininy se nachází u všech rostlin, zatímco skupinu aromatických cytokininů nesoucí N^6-benzylový substituent lze nalézt jen u určitých druhů. Mezi aromatické cytokininy řadíme také hydroxylované deriváty benzyladeninu (6-benzylaminopurin, BAP), topoliny. Topoliny se vyskytují ve třech

izomerech - ortho, meta a para (Strnad 1997). Prvním izolovaným cytokininem byl kinetin (K), který ve své struktuře obsahuje furfurylový postranní řetězec na dusíku N^6 adeninu. Kinetin byl poprvé rozpoznán jako látka zodpovědná za cytokininovou aktivitou v autoklávovaném sledím spermatu, při hledání složek nezbytných pro kultivaci rostlinných explantátů *in vitro* (Miller et al., 1956). Byl rovněž nalezen v rostlinném materiálu (Ge et al,. 2004) a dokonce i v lidských buňkách a moči (Barciszewski et al.,1996, 2000). Isoprenoidní i aromatické cytokininy se vyskytují jako volné báze, ribosidy, ribotidy, N-glykosidy a konjugáty s aminokyselinami. Isoprenoidní cytokininy s hydroxylovaným postranním řetězcem mohou tvořit také O-glykosidy. Deriváty adeninu substituované na dusíku N^6 byly nalezeny v některých typech tRNA u všech organismů s výjimkou Archea. Například u savců se N^6-isopentenyladenosin (iPR) nachází v tRNA[Ser]Sec selenocysteinu. Usnadňuje interakci kodon-antikodon a přispívá k účinné syntéze selenoproteinu (Chheda and Mittelman 1972).



Obr. 9 Příklad struktur přirozeně se vyskytujících cytokininových bází, které jsou zkoumány ve spojitosti se stárnutím: a) kinetin, b) *trans*-zeatin, c) N^6-isopentenyladenin, d) N^6-benzyladenin, e) *para*-topolin.

2.3.2 Vliv cytokininů na stárnutí a ochranu buněk

V roce 1994 Rattaan a Clark objevili pozitivní účinky kinetinu a některé vlastnosti spojené se stárnutím buněk. Přídavek této látky ke kultuře lidských fibroblastů měl za následek jak zpoždění nástupu, tak snížení intenzity mnoha charakteristik stárnutí, které se objevují během pasážování normálních buněk v kultuře. Velikost a morfologie fibroblastů pasážovaných v přítomnosti K odpovídaly buňkám při nižším počtu pasáží. Kinetin měl vliv na organizaci cytoskeletu a intenzitu autofluorescence v důsledku oxidativního poškození (Rattan a Clark 1994). *t*Z měl podobný účinek na stárnutí

lidských fibroblastů. Studovány byly rovněž biomarkery buněčného stárnutí jako je zvětšení buněk, akumulace buněčného odpadu, zvýšená polymerizace aktinu, snížená antioxidační schopnost a snížená rezistence vůči stresu. K a *t*Z snížili projevy výše uvedených biomarkerů spojených se stárnutím buněk bez toho, aby docházelo k ovlivnění proliferace buněk a maximální proliferační kapacity. Optimální efekt obou látek byl pozorován při koncentraci 80 μM (Rattan a Sodagam, 2005).

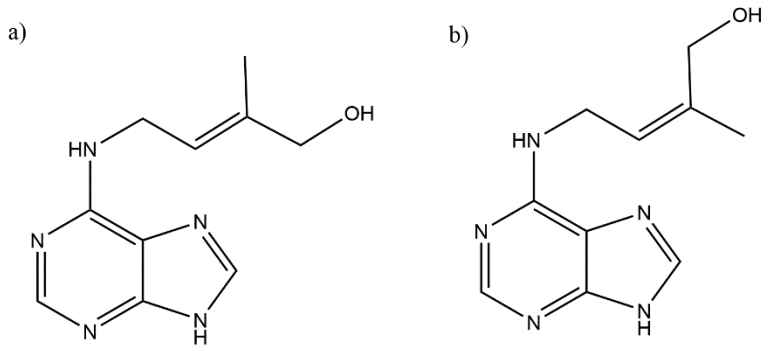
2.3.2.1 Kinetin

Přesný mechanismus působení kinetinu na živočišné buňky nebyl zcela objasněn. Jedná se ale o přírodní antioxidant, který chrání DNA a proteiny před poškozením kyslíkovými radikály. Bylo prokázáno, že účinek kinetinu proti stárnutí fibroblastů lze zvýšit navázáním vhodného substituentu do polohy N^9. Tyto deriváty jsou aktivní složkoou klinicky testovaných kosmetických výrobků. Studie byly provedeny na oddělení dermatologie Kalifornské univerzity u 40 žen se známkami lehkého až středního poškození pleti vlivem vystavení slunečnímu záření. Testy prokázaly, že pyratin (6-(furfurylamino)-9-(tetrahydropyran-2-yl)-purin) v koncentraci 0,1 % snižuje přítomnost jemných i hlubokých vrásek. Dále snižuje hyperpigmentaci, hrubost a dehydrataci pokožky (McCullough, et al., 2008).

2.3.2.2 Zeatin

Trans-zeatin byl poprvé izolován z nezralých zrn kukuřice *Zea mays* (Letham, 1963). Přítomnost *trans*-zeatinu byla později zjištěna v tRNA mnoha organismů (Mok a Mok, 1994; Haberer a Kieber, 2002). U zeatinu byla prokázána řada biologických aktivit. Je účinný proti apoptóze u lidských kožních fibroblastů a má antioxidační vlastnosti. Studie provedena na lidských fibroblastech prokázala schopnost *trans*-zeatinu zpomalovat stárnutí buněk. Při ošetření 1 až 200 μM zeatinem nebyly zaznamenány žádné negativní nebo toxické účinky. Optimální koncentrace při dlouhodobých experimentech byla stanovena na 80 μM. Pozitivní vliv této látky byl pozorován bez vyvolání další buněčné proliferace, čímž byly vyloučeny potencionálně karcinogenní účinky (Rattan a Sodagam, 2005). Vystavení pokožky UV záření způsobuje její dehydrataci a stárnutí kůže. Aquaporin 3 (AQP3) transportuje vodu a glycerol do kožních buněk, a hraje tak zásadní roli při zachování hydratace pokožky a hojení ran. Ošetření lidských keratinocytů *t*Z

zvyšuje expresi AQP3, navíc zmírňuje ztrátu AQP3 po vystavení buněk UV záření, a tak přispívá k lepšímu hojení ran a poklesu propustnosti vody (Ji et al., 2010).



Obr. 10 Chemcká struktrura a) *trans* a b) *cis* zeatinu.

2.3.2.3 Topoliny

Topoliny (hydroxybenzyladeniny) patří mezi aromatické cytokininy. Byly pojmenovány podle *Populus x canadensis* Moench. cv. R*obusta,* z jehož listů byly poprvé izolovány (Strnad et al., 1997). Hlavním a nejaktivnějším zástupcem, pokud jde o cytokininovou aktivitu, je *meta*-topolin. Jeho aktivita je srovnatelná s doposud nejaktivnějším přirozeně se vyskytujícím cytokininem, *trans*-zeatinem (Doležal a Strnad, 2017). Při hodnocení antioxidační aktivity cytokininů bylo zjištěno, že *p*-topolin je nejúčinnější při koncentracích 2,5 a 5 μM. Efektivnější antioxidační aktivita při vyšších koncentracích *p*T je přisuzována přítomnosti -OH skupiny fenolu (Brizzolari et al., 2016). Pro zhodnocení účinnosti a tolerance *p*T byla tato látka aplikována u subjektů s mírnými až středními projevy poškození pokožky vlivem záření. Lokální aplikace *p*T v 0,1% koncentraci po dobu 12 týdnů měla vliv na redukci vrásek a hyperpigmentace. Toto ošetření dále snížilo drsnost kůže a zvýšilo její hydrataci bez jakýchkoliv pozorovaných vedlejších účinků (Garcia et al., 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Seznam použitých přístrojů a vybavení

Analytické váhy (Heidolph)
Automatické pipety (Eppendorf); 8-kanálová pipeta (Brand Transferpette S-8)
Bod tání - Büchi Melting Point B-540
Box s vertikálním prouděním vzduchu – Gelaire TC 48 (Gelaire, Flow Laboratories)
CO_2 inkubátor –MCO-18AIC (SANYO)
Destičkový spektrofotometr – Infinite 200 pro (Tecan)
HPLC – HPLC Beckman Gold System
Mikroskop –IX51 (Olympus); zdroj světla –TH4-200 (Olympus); kamera –DP71 (Olympus)
MS – Tandem Mass Spectrometer Q-Tof Micro^{TM} (Waters)
NMR – JEOL 500 ECA
Stolní centrifuga –Mini Spin (Eppendorf)
TLC – silikagelové destičky 60 WF_{254} (Merck)
Ultrazvuková lázeň –RK31 (BANDELIN SONOREX)
Vakuová rotační odparka (Heidolph)
Váhy –440-33N (Kern)
Vortex –Minishaker MS2 (IKA)
Vývěva –KIF LAB (Laboport)

3.1.2 Chemikálie

2,3-dihydropyran – Sigma-Aldrich, 4-hydroxybenzylamin hydrát – Sigma-Aldrich, 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu – Sigma-Aldrich, 6-chlorpurin – Sigma-Aldrich, bovinní fetální sérum –Invitrogen, destilovaná voda – LRR a LF Olomouc, diethylether - Lach Ner s.r.o., dichlormethan (DCM) – Sigma-Aldrich, dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich, dioxan – Sigma-Aldrich, Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) – Invitrogen, ethanol 70 % -Lach Ner s.r.o., ethanol 96 % -Lach Ner s.r.o, ethylacetát - Lach Ner s.r.o., ethylendiamintetraoctové kyselina (EDTA) – Sigma Aldrich, chlorid sodný - Sigma-Aldrich, chlorid draselný – Sigma-Aldrich, chloroform -Lach Ner s.r.o.,

kyselina citronová - Sigma-Aldrich, kyselina trifluoroctová (TFA) - Sigma-Aldrich, methanol - Sigma-Aldrich, n-propanol, síran horečnatý - Sigma-Aldrich, hydrogenfosforečnan draselný - Lach Ner s.r.o, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát – Lach Ner s.r.o, hydrogenuhličitan sodný - Sigma-Aldrich, N,N′-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) – Sigma-Aldrich, N,N-dimethylpyridin-4-amin (DMAP) – Sigma-Aldrich, penicilin/streptomycin – Sigma-Aldrich, resasurin -Sigma-Aldrich, toluen – Sigma-Aldrich, triethylamin - Sigma-Aldrich, tripsyn – Sigma-Aldrich

3.1.3 Seznam použitých roztoků

PBS (1 l): 3,58 g Na_2HPO_4 12 H_2O + 0,2 g KH_2PO_4 + 8 g NaCl + 0,2 g KCl +950 ml vody; úprava pH na hodnotu 7,4; doplnění do 1 l, přefiltrování přes 0,22 μm filtr

Standardní kultivační médium DMEM 10 % (500 ml): přidat sterilně 50 ml fetálního séra + 5 ml penicilin/streptomycin k 445 ml DMEM média

Trypsin/EDTA (50 ml): sterilně smíchat 20 ml zásobního trypsinu (25 $g.l^{-1}$) +230 ml sterilní destilované vody; poté přidat 25 ml 0,5 mM EDTA

3.1.4 Testované látky

Kromě nově připravených látek byly testovány jejich prekurzory tj. 9-THP-pT, 9-THP-tZ, 9-THP-DHZ, R-LA, S-LA, a také volné cytokininové báze dihydrozeatin, *para*-topolin, *trans*-zeatin.

3.1.5 Stresory

L-buthionin-S,R-sulfoximin (BSO), citronan amonno-železitý

3.1.6 Biologický materiál

Buňky sítnice ARPE-19 a kožní fibroblasty BJ byly získány ze sbírky ATCC, keratinocyty HaCaT ze sbírky DKFZ. Buněčná linie GM04078 odvozená z pacientů s Friedreichovou ataxií byla získána ze sbírky Coriell.

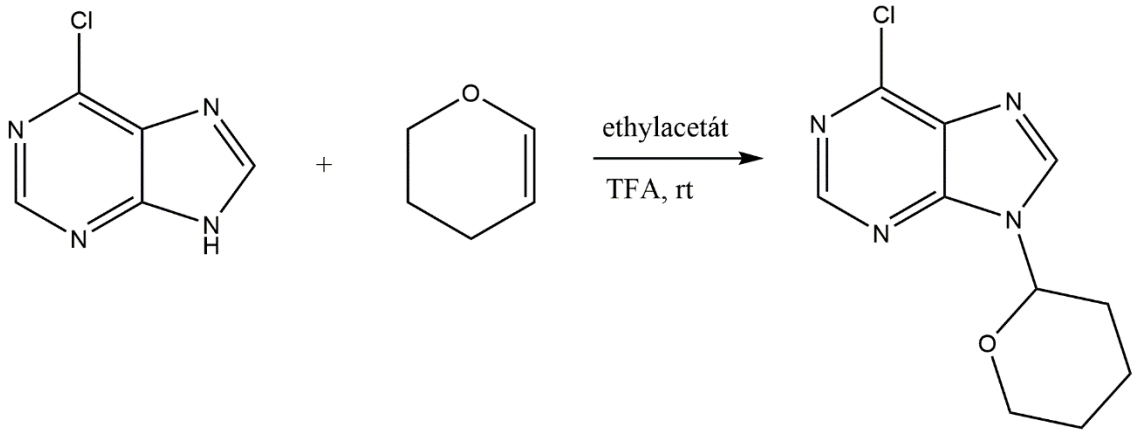
3.2 Metody

3.2.1 Syntéza

3.2.1.1 Deriváty LA-THP-*p*T a LA-*p*T (R,S)

3.2.1.1.1 Příprava 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purinu

Reakční schéma

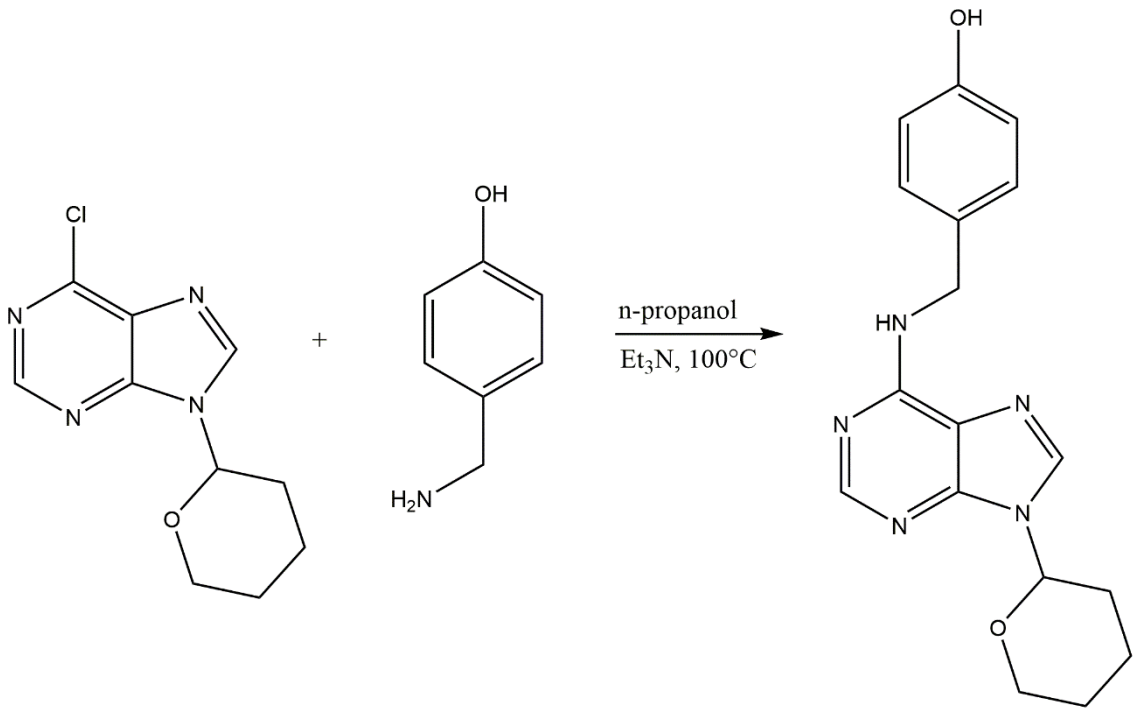


Postup:

Do jednohrdlé baňky o objemu 1000 ml byl předložen ethylacetát (500 ml) a 6-chlor-9*H*-purin (50 g; 0,323 mol). Za stálého míchání byl přidán 3,4-dihydro-2*H*-pyran (40,7 g; 0, 484 mol) a TFA (50 ml; 0,65 mol). Reakční směs byla ponechána reagovat do dalšího dne za laboratorní teploty. Došlo k postupnému rozpuštění pevné fáze a vzniku homogenního zakaleného roztoku hnědé barvy. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: ethylacetát:toluen 1:1). Poté byla provedena extrakce do ethylacetátu. Spojené organické fáze byly vytřepány solankou, vysušeny síranem hořečnatým a zahuštěny na RVO na odparek, který byl rozpuštěn v DCM. Dáno na vakuum (45°C, míchání). Poté rozpušteno v ethanolu (230 ml) a ponecháno krystalizovat v mrazáku (-18°C). 1. podíl izolován filtrací. Filtrát dále zahuštěn na ¼ původního objemu a znovu ponechán krystalizovat při -18°C. Izolován druhý podíl produktu srovnatelné čistoty.

3.2.1.1.2 Příprava 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenolu (9-THP-*p*T)

Reakční schéma:



Postup:

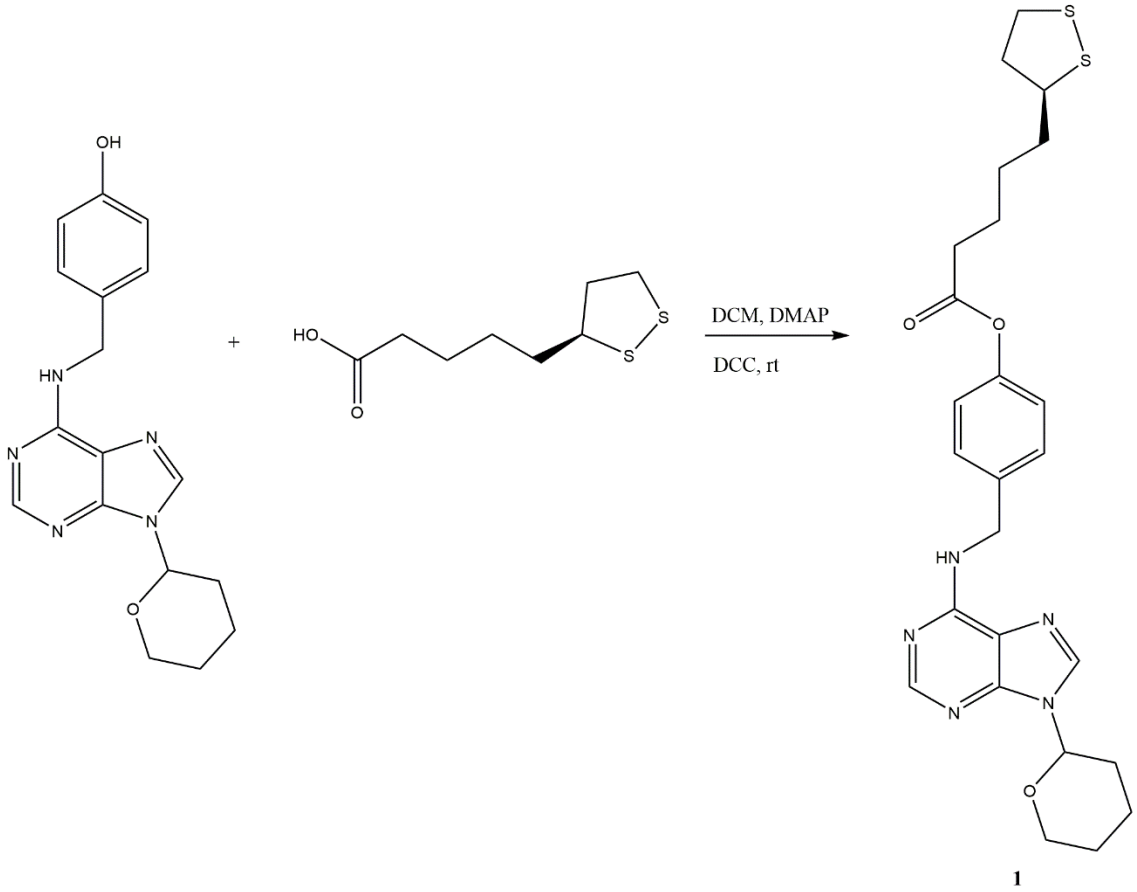
6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (2,39 g; 0,01 mol) a 4-(aminomethyl)fenol monohydrát (1,41 g; 0,01 mol) byly předloženy do tlakové ampule a rozpuštěny v 50 ml n-propanolu. Poté byl přidán triethylamin (4,2 ml, 0,03 mol). Reakční směs byla inertizována dusíkem a po uzavření umístěna na olejovou lázeň o teplotě 100°C. Při této teplotě byla reakční směs míchána (700 rpm) 5 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: ethylacetát:toluen 1:1).

Reakční směs byla po ochlazení na laboratorní teplotu odpařena na rotační vakuové odparce (RVO; 40°C; 10 mbar; 100-120 rpm). Odparek byl rozpuštěn ve vodě (50 ml) a ponechán na míchačce při laboratorní teplotě po dobu několika hodin. Vyloučený nažloutlý krystalický produkt byl izolován filtrací.

Produkt byl přečištěn rekrystalizací z methanolu (1:6) při teplotě lázně 80°C. Methanol byl přidáván postupně do rozpuštění produktu (cca 30 min). Poté ochlazeno na laboratorní teplotu a ponecháno krystalizovat v lednici. Produkt byl izolován filtrací jako bílá pevná látka.

3.2.1.1.3 Příprava 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 1)

Reakční schéma:



1

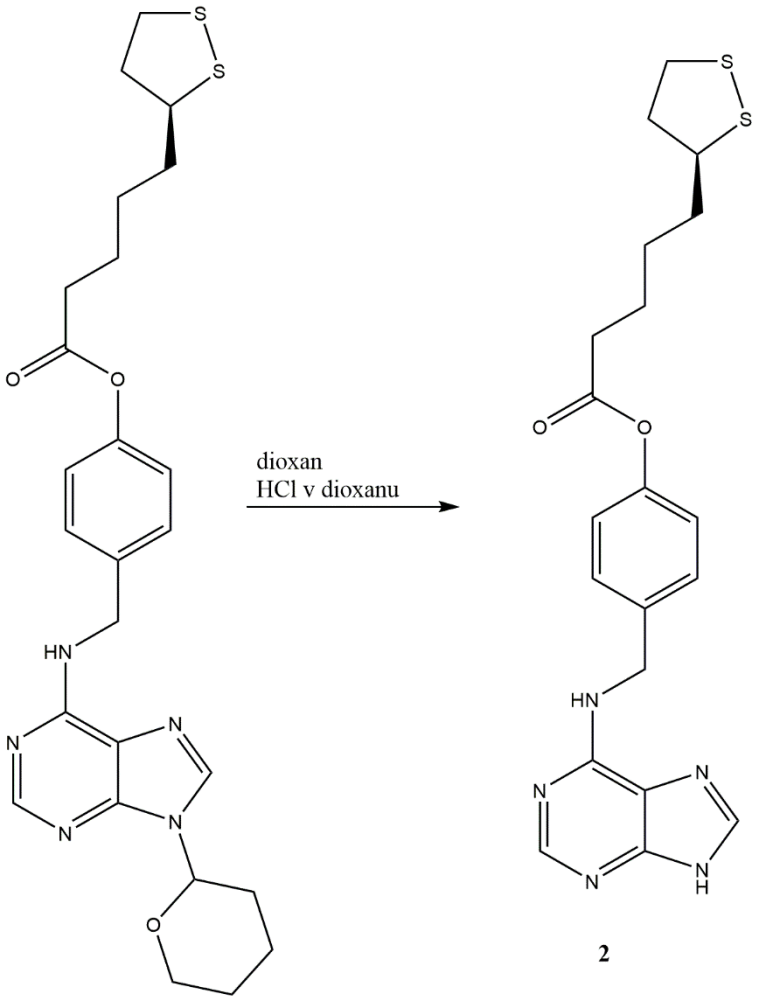
Postup:

4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (0,325 g; 10^{-3} mol) byl rozpuštěn v DCM. Poté byly postupně přidány další navážky R-LA (0,206 g; 10^{-3} mol), DCC (0,206 g; 10^{-3} mol) a DMAP (0,0122 g; 10^{-4} mol) a inertizováno N_2. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě do druhého dne. Průběh reakce byl kontrolován TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol 19:1). Poté byla zfiltrována a filtrační koláč (DCU) byl promyt DCM. Filtrát byl zahuštěn na RVO. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (20 ml). Poté byla provedena extrakce 2% $NaHCO_3$ (3 x 10 ml). Další extrakce byla provedena vodou (15 ml) a 1% kyselinou citrónovou (3 x 10 ml). Na závěr byl proveden výtřep solankou (2 x 15 ml). Ethylacetátová fáze byla sušena bezvodým síranem hořečnatým. Následující den byl síran hořečnatý zfiltrován a promyt ethylacetátem. Filtrát byl zahuštěn na RVO. Odparek byl rozpuštěn v DCM a znovu

zahuštěn. Produkt byl přečištěn rekrystalizací z metanolu (5 ml) za postupného zahřívání (80°C).

3.2.1.1.4 Příprava 4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 2)

Reakční schéma:



2

Postup:

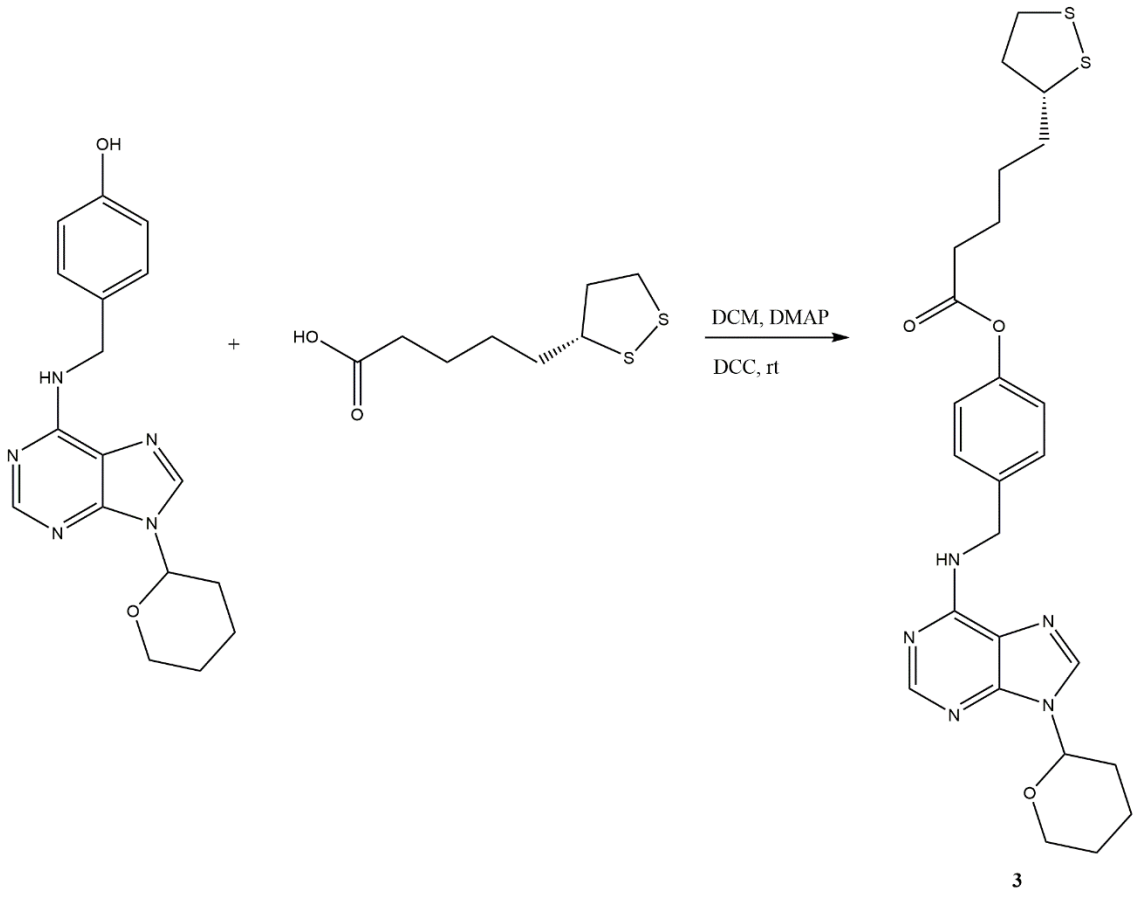
Látka **1** (1 g, 1,9 mol) byla rozpuštěn v dioxanu (40 ml). Reakční směs byla míchána a chlazena studenou vodou. Po rozpuštění bylo k reakční směsi přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (8 ml) za tvorby mléčného zákalu. Po 2 hodinách reakce byla provedena kontrolní TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniaku 9:1:0,05) a reakční směs byla ponechána 1 hodinu ustát za laboratorní teploty. Produkt

byl izolován filtrací a promyt vychlazeným dioxanem (2 x 5 ml) a diethyletherem (2 x 5 ml). Nažloutlý pevný produkt byl ponechán k volnému sušení.

Produkt byl rozpuštěním ve vodě (40 ml) za stálého míchaní a chlazení ledem. Poté byl převeden na volnou bázi úpravou pH roztoku na 7-8 pomocí 25% amoniaku (140 µl). Při daném pH ponecháno míchat 30 minut. Vykrystalizovaný pevný produkt byl izolován filtrací a promyt vodou. Produkt byl dále přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze stejného složení jako u TLC).

3.2.1.1.5 Příprava 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)phenyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 3)

Reakční schéma:



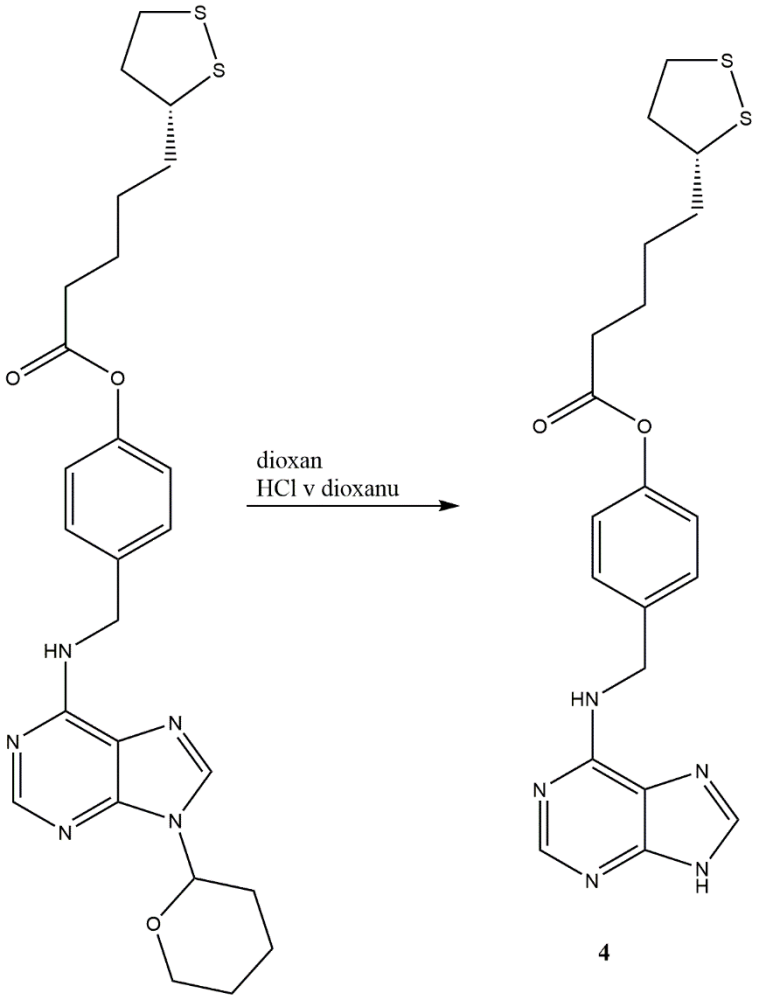
3

Postup:

6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (0,325 g; 10^{-3} mol) byl rozpuštěn v DCM (10 ml). Poté byly postupně přidány další navážky S-LA (0,206 g; 10^{-3} mol), DCC (0,206 g; 10^{-3} mol) a DMAP (0,0122 g; 10^{-4} mol). Postup přípravy látky **3** je analogický k postupy přípravy látky **1**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol (19:1).

3.2.1.1.6 Příprava 4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)phenyl (S)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 4)

Reakční schéma:



4

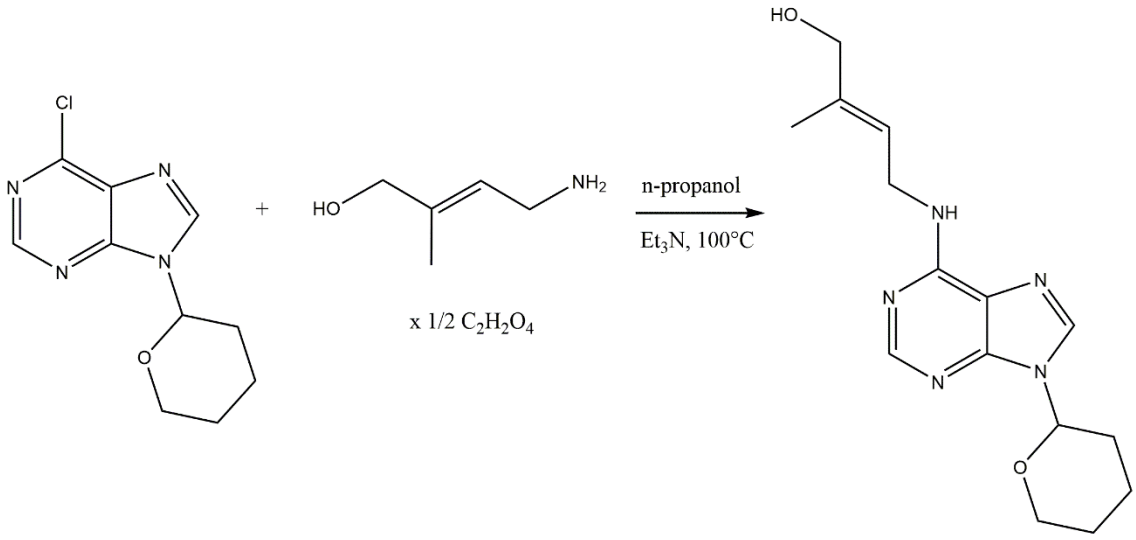
Postup:

Látka **3** (0,2 g, 0,4 x 10^{-3} mol) byla rozpuštěna v dioxanu (8 ml). Reakční směs byla míchána a chlazena studenou vodou. Po rozpuštění bylo k reakční směsi přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (1,6 ml). Postup přípravy látky **4** je analogický k postupy přípravy látky **2**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniaku (9:1:0,05).

3.2.1.2 Deriváty LA-THP-*t*Z a LA-*t*Z (R,S)

3.2.1.2.1 Příprava (*E*)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-olu (9-THP-*t*Z)

Reakční schéma:

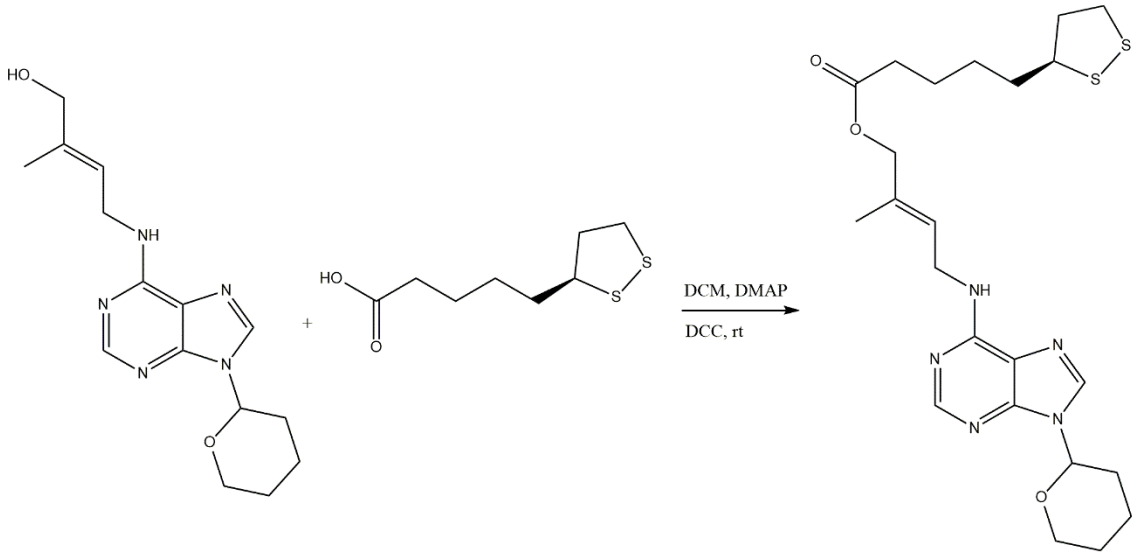


Postup:

6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (3,6 g; 15 x 10^{-3} mol) a (*E*)-4-amino-2-methylbut-2-en-1-ol hemioxalát (2,625 g; 18 x 10^{-3} mol) byly předloženy do tlakové ampule a rozpuštěny v 112,5 ml n-propanolu. Poté byl přidán triethylamin (21 ml, 0,16 mol). Reakční směs byla inertizována dusíkem a po uzavření umístěna na olejovou lázeň o teplotě 100°C. Při této teplotě byla reakční směs míchána (700 rpm) 5 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol 9:1). Reakční směs byla po ochlazení na laboratorní teplotu odpařena na RVO (40°C; 1 mbar; 100-120 rpm). Nažloutlý olejovitý odparek byl po přídavku vody (150 ml) extrahován ethylacetátem (3x 150 ml a 1x 50 ml). Do spojené organické fáze byl přidán nasycený roztok chloridu sodného (50 ml). Spodní vrstva byla oddělena a horní organická fáze byla vysušena síranem hořečnatým. Síran hořečnatý byl zfiltrován a filtrát byl zahuštěn na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 13,5 ml DCM. Do roztoku bylo za stálého míchání přikapáváno 135 ml diethyletheru. Pro podpoření krystalizace byl roztok ochlazen suchým ledem na teplotu -20°C. Produkt byl dále ponechán přes noc v lednici. Následující den byla suspenze zfiltrována a pevný produkt byl promyt třemi podíly diethyletheru (3x 10 ml) a ponechán sušit při RT.

3.2.1.2.2 Příprava (E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-yl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 5)

Reakční schéma:



5

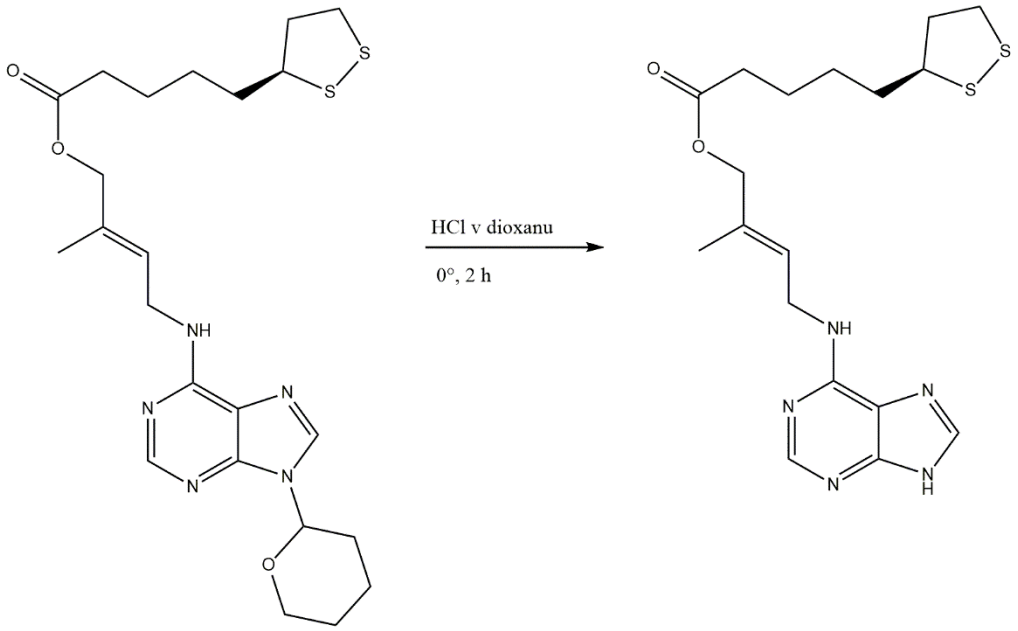
Postup:

V baňce o objemu 50 ml byl rozpuštěn (*E*)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-ol (0,303g; 10^{-3} mol) v 10 ml DCM. Postupně byly přidávány další navážené suroviny: R-LA (0,206 g; 10^{-3} mol), DCC (0,206 g; 10^{-3} mol) a DMAP (0,0122 g; 0,1 x 10^{-3} mol). Reakční směs byla inertizována dusíkem a míchána do druhého dne, kdy byla zfiltrována. Filtrační koláč (DCU) byl promyt DCM (2 x 5 ml), vysušen a zvážen. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol 19:1). Filtrát byl odpařen na RVO a nažloutlý, olejovitý odparek byl zvážen. Odparek byl rozpuštěn ve 20 ml ethylacetátu. Následně byla provedena extrakce 2% hydrogenuhličitanem sodným (3 x 10 ml) a 15 ml vody. Dále byla přidána 1% kyselina citronová (3 x 10 ml) a nasycený roztok chloridu sodného (2 x 15 ml). Organická fáze byla sušena síranem hořečnatým. Následující den byl síran hořečnatý zfiltrován a promyt ethylacetátem. Filtrát byl zahuštěn na RVO, rozpuštěn v DCM a znovu zahuštěn. Vznikl nažloutlý, olejovitý produkt.

Produkt byl dále přečištěn sloupcovou chromatografií, kde stacionární fázi tvořil silikagel (40 g) a mobilní fáze byla stejného složení jako u TLC. Požadovaný čistý produkt byl jímán jako první. První 4 frakce byly spojeny, odpařeny na RVO a 2x prodestilovány s DCM. Produkt byl získán ve formě nažloutlého olejovitého odparku.

3.2.1.2.3 Příprava (*E*)-4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbut-2-en-1-yl (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 6)

Reakční schéma:



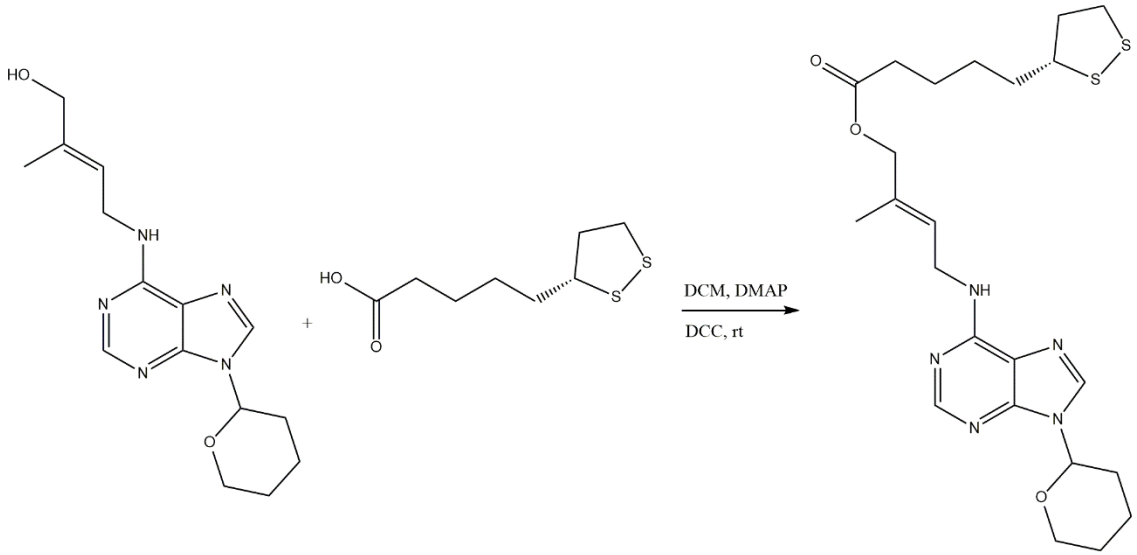
Postup:

Látka **5** (0,524 g; 10^{-3} mol) byla rozpuštěna v dioxanu (26 ml) za stálého míchání a chlazení studenou vodou. Do reakční směsi byla následně přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (5,24 ml) za vzniku mléčného zákalu. Po 2 hodinách byla provedena kontrolní TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniaku 9:1:0,05). Reakční směs byla ponechána 1 hod ustát při pokojové teplotě, poté zahuštěno na RVO. Odparek byl zvážen a rozpuštěn v acetonu a ponechán krystalizovat do dalšího dne. Následně byla reakční směs zfiltrována a promyta acetonem.

Produkt byl rozpuštěn v 5 ml methanolu za stálého míchání a zahříván (80°C) pod zpětným chladičem. Poté byly přidávaný další podíly methanolu do rozpuštění produktu (cca 30 min). Poté ponecháno vychladnout a přemístěno na míchačku, ponecháno krystalizovat v lednici. Reakční směs byla zfiltrována a promyta vychlazeným methanolem (5 ml). Filtrát byl zahuštěn na RVO. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze stejného složení jako u TLC).

3.2.1.2.4 Příprava (E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-yl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 7)

Reakční schéma:



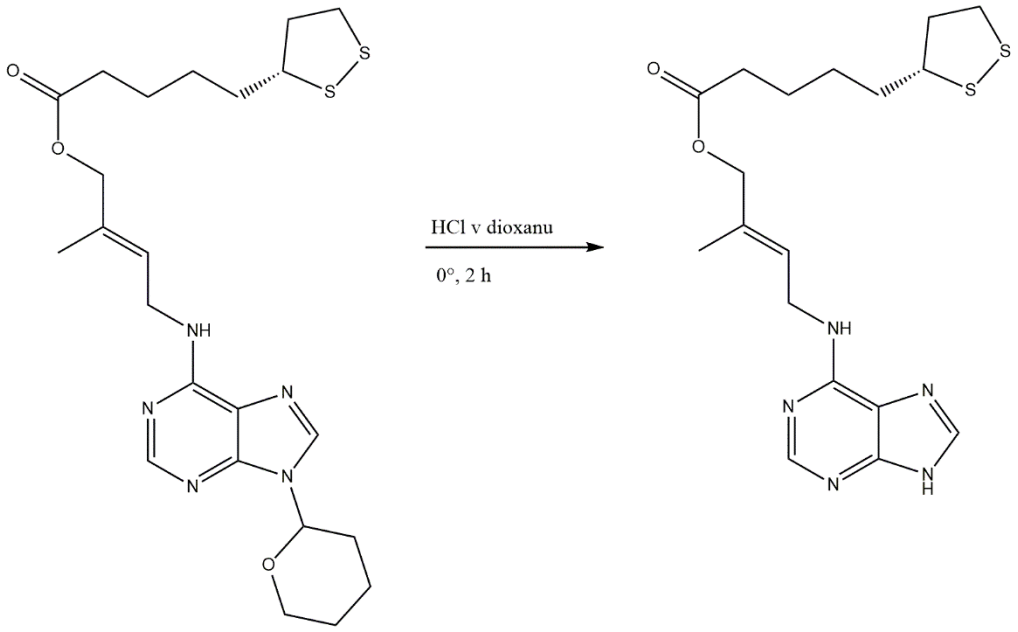
7

Postup:

V baňce byl rozpuštěn (*E*)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-ol (0,759 g; 2,5 x 10^{-3} mol) v 25 ml DCM. Postupně byly přidávány další navážené suroviny: S-LA (0,516 g; 2,5 x 10^{-3} mol), DCC (0,206 g; 2,5 x 10^{-3} mol) a DMAP (0,0122 g; 0,25 x 10^{-3} mol). Postup přípravy látky **7** je analogický k postupy přípravy látky **5**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol (19:1).

3.2.1.2.5 Příprava (*E*)-4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbut-2-en-1-yl (S)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 8)

Reakční schéma:



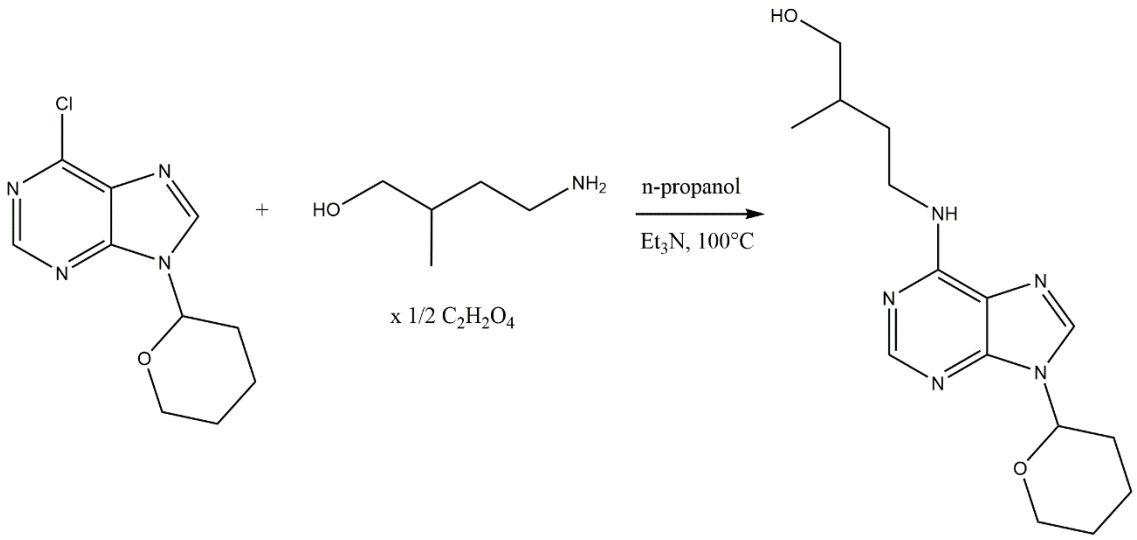
Postup:

Látka **7** (0,330 g; 0,6 x 10^{-3} mol) byla rozpuštěna v dioxanu (16,5 ml) za stálého míchání a chlazení studenou vodou. Do reakční směsi byla následně přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (3,3 ml). Postup přípravy látky **8** je analogický k postupy přípravy látky **6**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniak (9:1:0,05).

3.2.1.3 Konjugáty R/S-LA a dihydrozeatinu

3.2.1.3.1 Příprava 2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butan-1-olu (9-THP-DHZ)

Reakční schéma:

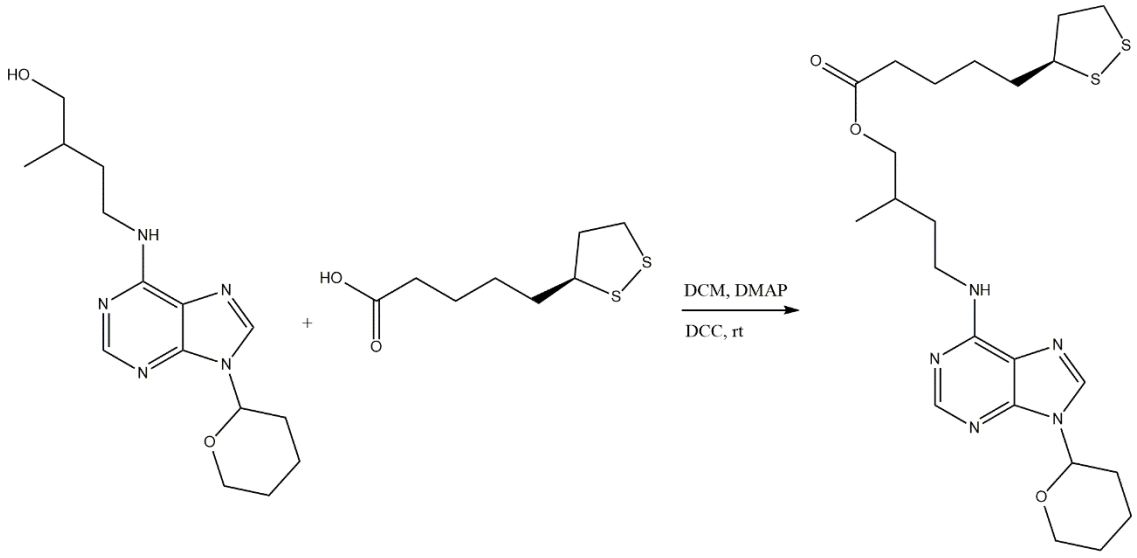


Postup:

6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (0,36 g; 1,5 x 10^{-3} mol) a 4-amino-2-methylbutan-1-ol hemioxalát (0,266 g; 1,79 x 10^{-3} mol) byly předloženy do tlakové ampule a rozpuštěny v 5 ml n-propanolu. Poté byl přidán triethylamin (1,045 ml, 7,5 x 10^{-3} mol). Reakční směs byla inertizována dusíkem a po uzavření umístěna na olejovou lázeň o teplotě 100°C. Při této teplotě byla reakční směs míchána (700 rpm) 5 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniaku 9:1:0,05). Reakční směs byla ochlazena na laboratorní teplotu. Po oddestilování triethylaminu a n-propanolu na RVO (40°C, 1 mbar, 100-120 rpm) byla provedena extrakce. Odparek byl zpracován s ethylacetátem (150 ml) a vodou (150 ml). Po výtřepu byla oddělena ethylacetátová od vodné frakce. Vodná frakce dále 2x vytřepána 150 ml a 50 ml ethylacetátu. Do ethylacetátových frakcí byl přidán nasycený roztok chloridu sodného (50 ml). Spodní vrstva byla oddělena a horní ethylacetátová frakce byla vysušena síranem hořečnatým za stálého míchání po dobu 20 min. Síran hořečnatý byl zfiltrován a filtrát byl zahuštěn na odparce. Odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (5 ml) a znovu prodestilován.

3.2.1.3.2 Příprava 2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (látka 9)

Reakční schéma:



9

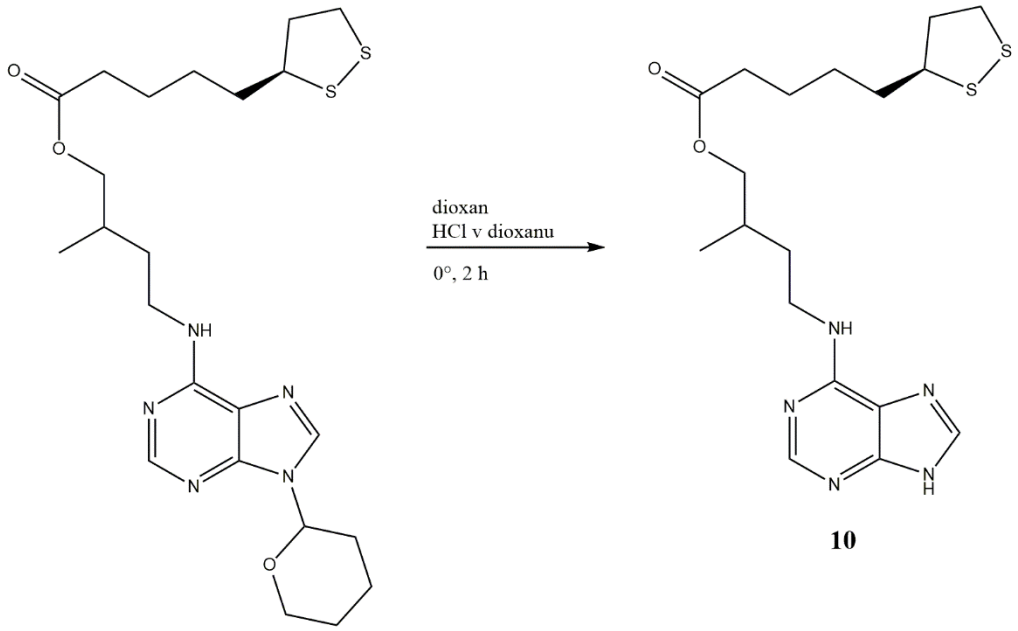
Postup:

V baňce o objemu 50 ml byl rozpuštěn 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (0,332 g; 10^{-3} mol) v 11 ml DCM. Postupně byly přidávány další navážené suroviny: kyselina lipoová (0,224 g; 10^{-3} mol), DCC (0,224 g; 10^{-3} mol) a DMAP (0,0133 g; 0,1 x 10^{-3} mol). Reakční směs byla inertizována dusíkem a míchána do druhého dne, kdy byla zfiltrována. Vyloučený bílý vedlejší produkt DCU byl promyt DCM (2 x ml) a zvážen. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol 19:1). Filtrát byl odpařen na RVO a nažloutlý, olejovitý odparek byl zvážen. Odparek byl rozpuštěn ve 20 ml ethylacetátu. Následně byla provedena extrakce 2% hydrogenuhličitanem sodným (3 x ml) a 15 ml vody. Dále byla přidána 1% kyselina citronová (3 x ml) a nasycený roztok NaCl (2 x ml). Organická fáze byla sušena síranem hořečnatým. Následující den byl síran hořečnatý zfiltrován a promyt ethylacetátem. Filtrát byl zahuštěn na RVO, rozpuštěn v DCM a znovu zahuštěn. Vznikl nažloutlý, olejovitý produkt.

Produkt byl dále přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fáze stejného složení jako u TLC. Požadovaný čistý produkt byl jímán jako první. První 4 frakce byly spojeny, odpařeny na RVO a 2x prodestilovány s DCM.

3.2.1.3.3 Příprava 4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbutyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (konjugátu 10)

Reakční schéma:



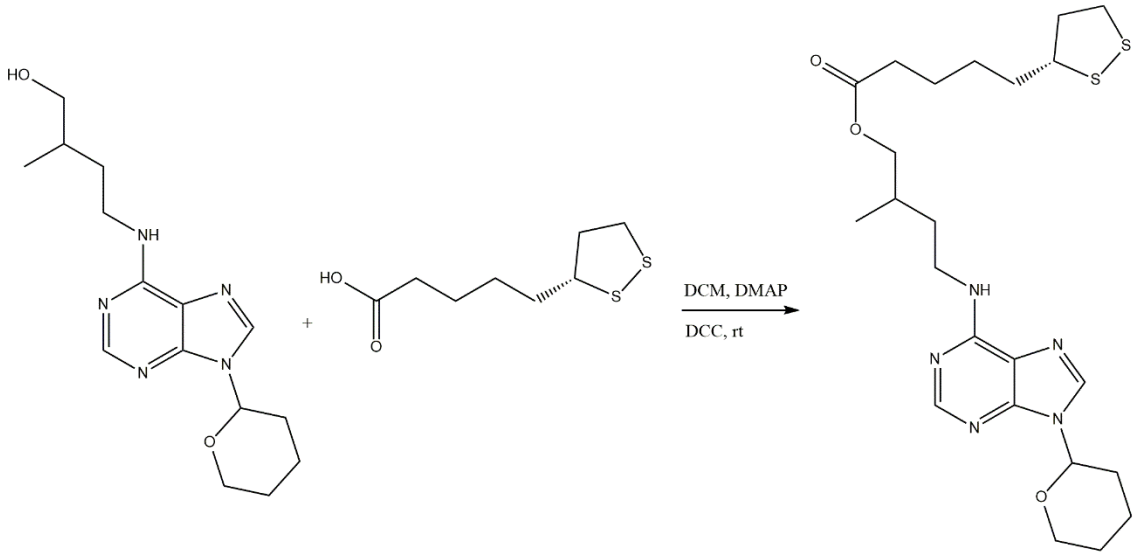
10

Postup:

Látka **9** (0,245 g; 0,4 x 10^{-3} mol) byla rozpuštěna v dioxanu (9,8 ml) za stálého míchání a chlazení studenou vodou. Do reakční směsi byla následně přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (2,2 ml) za vzniku mléčného zákalu. Po 2 hodinách byla provedena kontrolní TLC. Reakční směs byla ponechána 1 hod ustát při pokojové teplotě, poté zahuštěno na RVO. Produkt byl izolován filtrací a promyt vychlazeným dioxanem (2 x 3 ml) a diethyletherem (2 x 3 ml). TLC mobilní fáze: chloroform:methanol:25% roztok amoniaku (9:1:0,05).

3.2.1.3.4 Příprava 2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (konjugátu 11)

Reakční schéma:



11

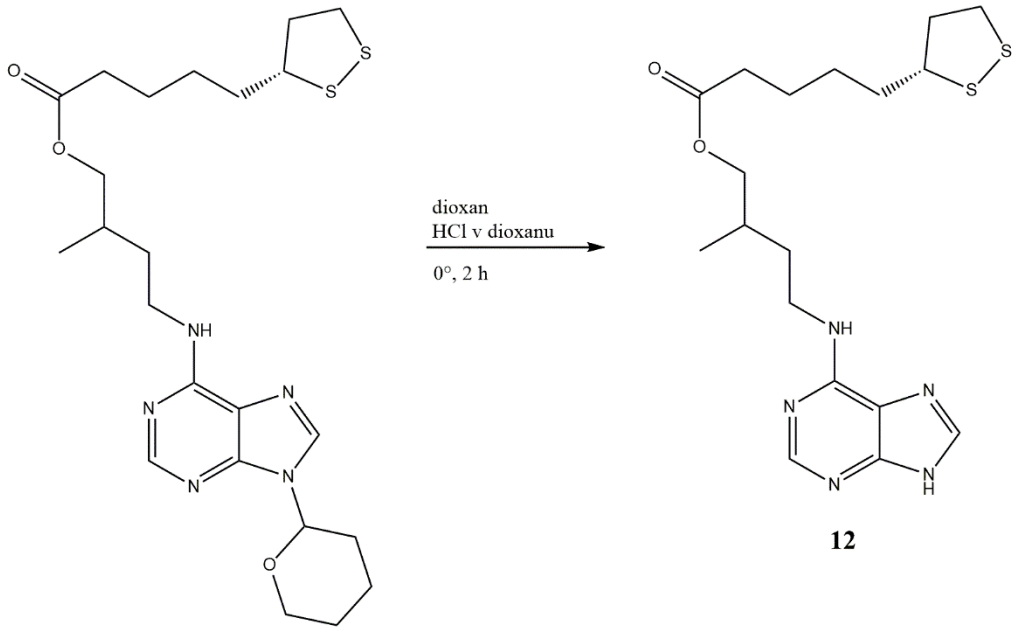
Postup:

V baňce o objemu 50 ml byl rozpuštěn 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin (0,439 g; 1,4 x 10^{-3} mol) v 14 ml DCM. Postupně byly přidávány další navážené suroviny: S-LA (0,296 g; 1,4 x 10^{-3} mol), DCC (0,296 g; 1,4 x 10^{-3} mol) a DMAP (0,0176 g; 0,14 x 10^{-3} mol)

Postup přípravy látky **11** je analogický k postupy přípravy látky **9**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol (19:1).

3.2.1.3.5 Příprava 4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbutyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu (konjugátu 12)

Reakční schéma:



12

Postup:

Látka **11** (0,381 g; 0,8 x 10^{-3} mol) byla rozpuštěna v dioxanu (15,3 ml) za stálého míchání a chlazení studenou vodou. Do reakční směsi byla následně přikapávána 4M kyselina chlorovodíková v dioxanu (3,4 ml).

Postup přípravy látky **12** analogický k postupy přípravy látky **10**. TLC mobilní fáze: chloroform:methanol:25 %roztok amoniaku (9:1:0,05).

3.2.2 Analytické metody

Čistota získaných produktů byla ověřena tenkovrstvou chromatografií na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF_{254} firmy Merck v příslušné mobilní fázi. Chromatogram byl vizualizován pomocí UV lampy (Camag) o vlnové délce 254 nebo 366 nm-

Bod tání byl změřen bodotávkém Büchi Melting Point B-540, do kterého byly zasunuty kapiláry se zkoumaným vzorkem.

Měření chromatografické čistoty a hmotnostního spektra látek bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií s využitím pozitivní ionizace elektrosprejem.

^{1}H a^{13}C NMR spektra byla změřena na přístroji JEOL 500 ECA při frekvenci 500 a 126 MHz. Vzorky byly připraveny rozpuštěním připravených sloučenin v deuterovaném DMSO (DMSO-d_6).

3.2.3 Měření antioxidační aktivity (ORAC)

Pro tento experiment byly použity vzorky látek 1-8, *t*Z, *p*T a R-LA o koncentraci 100 mM (rozpuštěno v DMSO). Do první řady mikrotitrační desky bylo přidáno 25 µl 75 mM PBS (blank). Následně bylo do prvního a posledního sloupce přidáno 25 µl standardního roztoku Troloxu. Zásobní roztok Troloxu o koncentraci 500 µM byl zředěn PBS na příslušné koncentrace podle uvedené Tabulky 1 do celkového objemu 1 ml. Poté byly naneseny vzorky vždy ve třech opakováních pro každé ředění. Vybrané ředění pro každou látku je uvedeno v Tabulce 2. Pomocí vícekanálové pipety bylo na celou desku naneseno 150 µl roztoku fluorescenční próby 250 nM fluoresceinu. Následně byl připraven 250 mM roztok AAPH, kdy bylo 210 mg AAPH rozpuštěno v 3 ml PBS. Roztok byl inkubován 30 minut při 37 °C. Do každé jamky bylo po inkubaci přeneseno 25 µl AAPH a na multifunkčním readru byla měřena intenzita fluorescence v závisloti na čase při excitační λ 480 nm a λ emise 520 nm. Měření probíhalo po dobu 60 minut v 30 cyklech a 37 °C. Výsledky měření byly zpracovány v Microsoft Excelu.

Tabulka 1 Příprava kalibrační řady Troloxu

	Koncentrace Troloxu [µM]	**Objem zásobního roztoku Troloxu [µl]**	**Objem PBS [µl]**
1.	100	200	800
2.	50	100	900
3.	25	50	950
4.	12,5	25	975
5.	5	10	990

Tabulka 2 Způsob ředění jednotlivých látek pro metodu ORAC.

Látka	Ředění
1	300
2	50
3	300
4	300
5	100
6	300
7	50
8	30
trans-zeatin	300
para-topolin	30000
kyselina lipoová	1000

3.2.4 Kultivace fibroblastů

Buňky byly pěstovány v plastových Petriho miskách od firmy TPP, jejichž povrchová úprava umožňuje přichycení adherentních buněk. Pro výživu buněk bylo použito médium DMEM, které obsahuje směs solí, vitamínů, aminokyselin a pufr, který zabraňuje okyselení média vlivem buněčného metabolismu. Hlavním zdrojem uhlíku je glukóza (4,5 $g.l^{-1}$). Médium bylo doplněno tak, aby obsahovalo 10 % fetálního bovinního séra, 2 mmol glutaminu, 100 jednotek na ml penicilinu a 100 $\mu g.ml^{-1}$ streptomycinu. Vhodné podmínky pro pěstování buněk byly zajištěny kultivací v inkubátoru, kde byla udržována absolutní vlhkost vzduchu, aby nedocházelo k odpařování kultivačního média. Dále byla zajištěna konstantní teplota 37,5 °C a obsah CO_2 v atmosféře (5,5 %). Buňky byla pasážovány 1-2x týdně. S buněčnými liniemi bylo manipulováno v laminárním boxu. Roztoky a média aplikované na buňky byly temperovány na 37°C.

3.2.5 Vysetí buněk do mikrotitračních desek a přidání testovaných látek a stresorů

Z Petriho misky bylo odsáto médium a buňky byly promyty 1x PBS (1,5 ml). Po odsátí 1x PBS byl přidán 1x tripsyn-EDTA (1 ml) a ponecháno inkubovat při 37 °C do uvolnění buněk z povrchu Petriho misky. Kultura byla naředěna 5 ml média pro testování. Uvolněné buňky byly resuspendovány, přeneseny do 15 ml zkumavky a centrifugovány při 180 g (1000 rpm) po dobu 5 minut za laboratorní teploty. Poté bylo médium s trypsinem odsáto a pelet buněk resuspendován v 5 ml média pro testování. Následně

bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze a přeneseno do Bürkerovy komůrky, kde byl spočítán počet buněk ve dvou velkých čtvercích. Průměr těchto dvou hodnot byl vynásoben 10 000 x, čímž byl zjištěn počet na 1 ml a vynásoben objemem média ve zkumavce. Buněčná suspenze byla následně zředěna médiem pro testování na příslušnou koncentraci pro násadu do mikrotitrační desky. Následující den byly přidány naředěné testované látky v médiu pro testování. Jako kontrola bylo použito DMSO. Obsah DMSO nepkřekročil 0,1 %. U testů protekce proti stresorům (L-buthionin-S,R-sulfoximin - BSO, citronan amonno-železitý) byl dále po 8 hodinách přidán 3 x koncentrovaný stresor v testovacím médiu.

Testy toxicity byly prováděny průběžně, během syntézy látek, v 96 jamkových deskách. Bylo nasazeno 5000 buněk na jamku v 80 µl média a následně byl přidán 5 x koncentrovaný roztok testovaných látek ve 20 µl (maximální testovaná koncentrace 100 µM). Byla použita dvojnásobná ředící řada. Médiem pro testování bylo kultivační médium, které je popsáno výše. Konečné srovnání schopnosti látek chránit GM04078 proti stresu (BSO - 300 a 600 µM, citronan amonno-železitý - 10 mM) bylo provedeno v 384 jamkových deskách. V každé jamce byla násada 1500 buněk v 30 µl média, následně byly přidány 3 x koncentrované roztoky testovaných látek v 15 µl (testované koncentrace látek 10 a 50 µM v heptaplikátu). V médiu pro testování protekce proti stresorům byla glukóza nahrazena za galaktózu.

3.2.5.1 Resazurinový test

Resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) je tmavě modré, slabě fluoreskující barvivo. V mitochondriích živých buněk je redukován na červený silně fluorescentní resofurin. Používá se k hodnocení metabolického stavu a viability eukaryotických buněk.

Po 3 denním působení látek, případně kombinace testovaných látek a stresorů, byl do jamek mikrotitrační desky přidán roztok resazurinu v testovacím médiu do konečné koncentrace 0,0125 $mg.ml^{-1}$. V 96 jamkových deskách byl používán 11 x koncentrovaný roztok, zatímco v 384 jamkových deskách byl roztok 4 x koncentrovaný.

Fluorescence (λ excitace 544 nm, λ emise 590 nm) byla měřena po 1 hodinové (ARPE-19), případně 3 hodinové inkubaci (HaCaT a BJ, GM04078). Pro testované látky byl vždy proveden pilotní experiment s cílem vyloučit, že látky samotné vykazují fluorescenci, a že redukují resazurin v médiu bez přítomnosti buněk.

3.2.5.2 Sledování koncentrace redukovaného glutathionu

Monobromobiman je nefluorescentní látka alkylující redukovaný glutathion. Výsledné adukty jsou fluorescentní. Po 24 hodinovém působení kombinace látek a stresoru BSO (10 a 100 μM) bylo z jamek mikrotitrační desky odsáto kultivační médium a nahrazeno médiem DMEM s galaktózou (90 μl). To bylo následně také odsáto a byl přidán 40 μM roztok monobromobimanu ve stejném médiu. Po 45 minutové inkubaci byla mikrotitrační deska vyfocena na přístroji Yokogawa Voyager s objektivem 4x (λ excitace 450 nm, λ emise 480 nm). Test byl prováděn v deskách pro mikroskopii Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer). Nalezení buněk a vyhodnocení intenzity signálu na plochu bylo provedeno pomocí skriptu v jazyce Python využívajícího knihovny sci-kit image.

3.2.5.3 Zpracování dat

Vyhodnocení protektivního vlivu jednotlivých látek proti působení toxinu bylo provedeno pomocí jednostranných t-testů (látka proti kontrole). Korekce na násobné testování byla provedena Dunnetovou metodou implementovanou v knihovne multcomp jazyka R. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud korigovaná p-hodnota byla nižší než 0,05. Grafy byly vytvořeny v jazyce R (knihovna ggplot2).

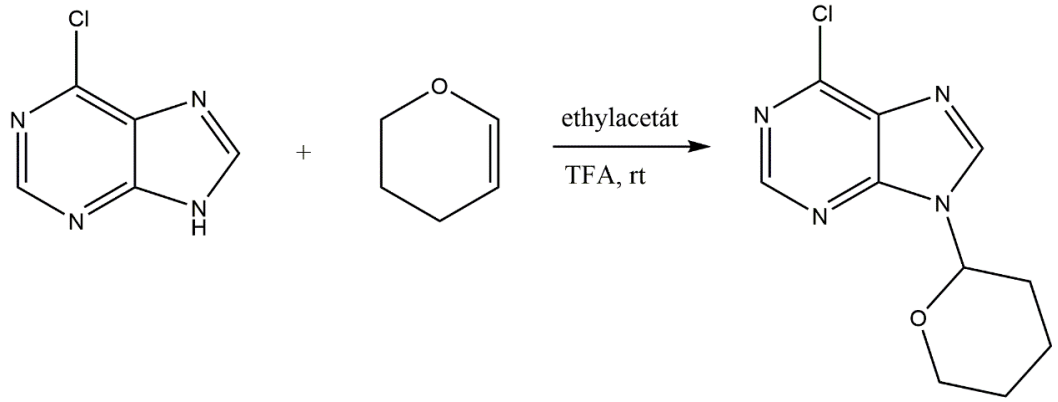
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části práce bylo cílem připravit konjugáty kyseliny lipoové s vybranými cytokininy a otestovat jejich (cyto)protektivní aktivitu. Kyselina lipoová i cytokininy vykazují cytoprotektivní vlastnosti v širokém spektru modelů. Proto předpokládáme, že spojením těchto vybraných látek budou proléčiva, která kombinují farmakologickou aktivitu obou složek. Navíc budou mít výhodnější farmakokinetické vlastnosti, například schopnost penetrovat kůží.

Pro přípravu R(+) i S(-) konjugátů LA byla využita vícestupňová syntéza (schéma 1-4).

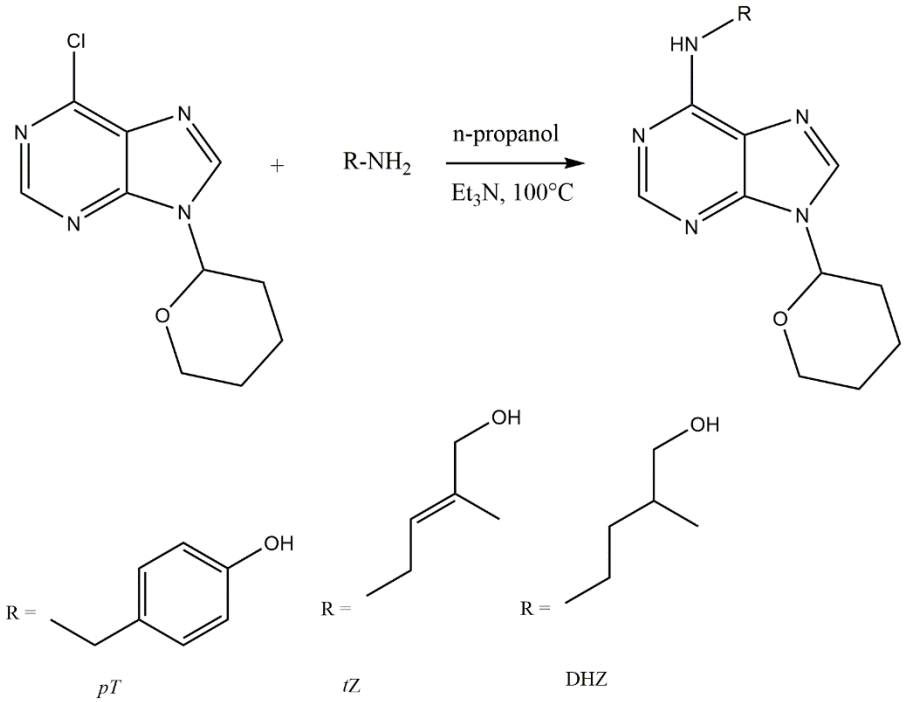
V prvním kroku (Schéma 1) byl připraven výchozí produkt 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin reakcí 6-chlor-9*H*-purinu s 3,4-dihydro-2*H*-pyranem v ethylacetátu za katalýzy kyseliny trifluoroctové (TFA) při laboratorní teplotě. Tato reakce zajišťuje protekci polohy N^9 proti nežádoucí substituci v esterifikačním kroku.

Schéma 1:



V druhém stupni (Schéma 2) syntézy reaguje 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin s aminem, který vytvoří postranní řetězec cytokininu. Reakce probíhala v přítomnosti ethylacetátu a n-propanolu při teplotě 100 °C. Tento postup přípravy 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl-purinových derivátů byl popsán Szüčovou et al. (2009).

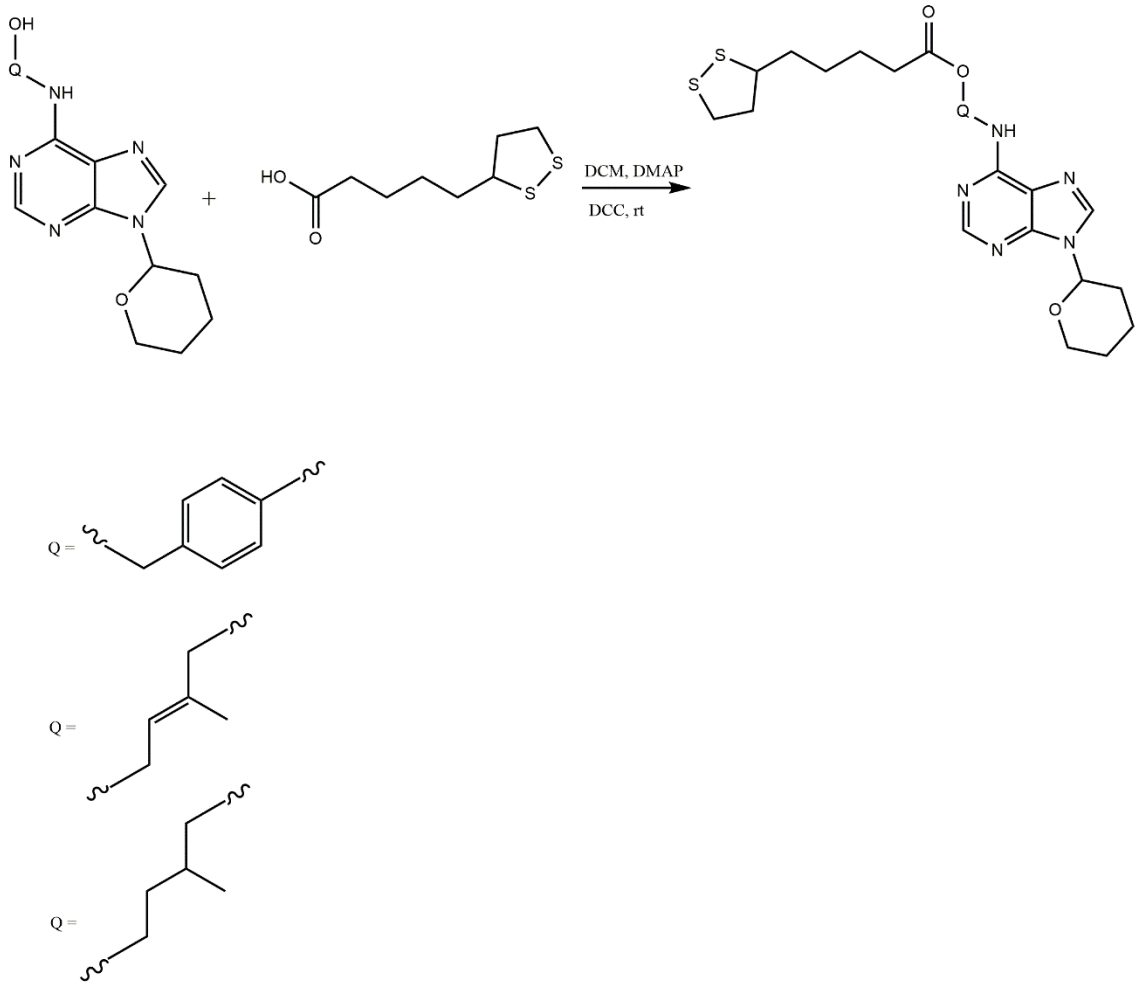
Schéma 2:



Látky **1, 3, 5, 7, 9** a **11** byly připraveny v třetím kroku (Schéma 3) syntézy, kdy probíhá samotná esterifikace. R/S-LA reaguje s připravenými cytokininy, které jsou na N^9 dusíku chráněný THP skupinou v přítomnosti DCC v DCM a katalytického množství DMAP při laboratorní teplotě. Výtěžek látek **1** a **3** byl 51 %, látky **5** 67 %, látky **7** 73 %, látky **9** 58 % a u látky **11** 63%. Čistota látek byla v rozmezí 80,6 až 99 + % (Tabulka 4).

V tomto kroku byly použity dvě metody konjugace. **1. metoda** DCC konjugace, byla zařazena do syntézy. Při použití **2. metody** konjugace bylo DCC nahrazeno EDC. Tato změna reakčního činidla však neposkytla žádný benefit, navíc snížila výtěžnost čistého produktu.

Schéma 3:

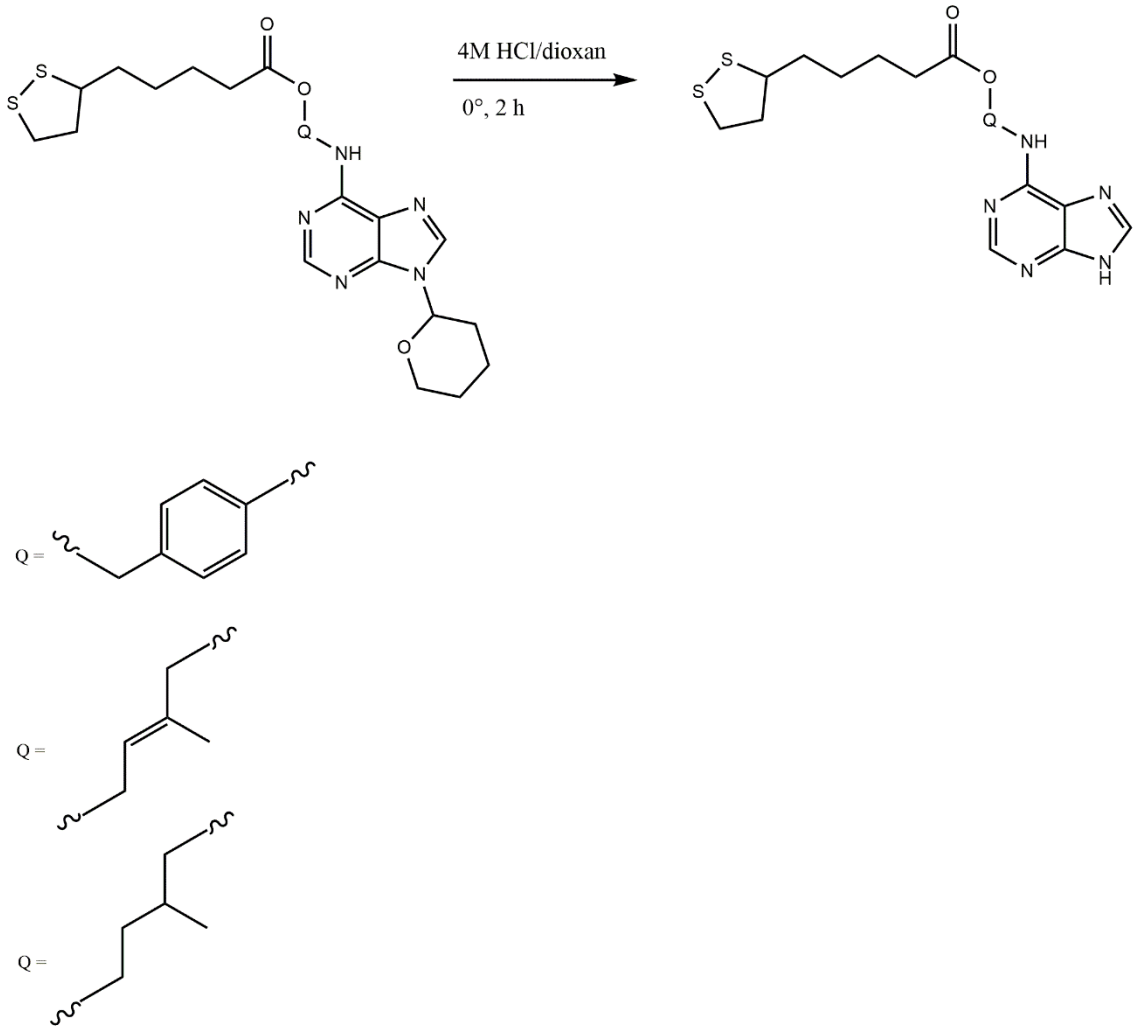


Cílem posledního kroku syntézy bylo vyvinout selektivní metodu deprotekce THP skupiny, při níž by byly minimalizovány nežádoucí vedlejší reakce, především hydrolýza labilní esterové vazby v cílových molekulách konjugátů. Proto byly u tohoto kroku optimalizovány reakční podmínky (Tabulka 3). Pro získání látek bez THP skupiny byla nejdříve provedena reakce v přítomnosti 1M kyseliny chlorovodíkové a methanolu v poměru 1:4 za pokojové teploty. Ta ale neposkytla očekávaný výsledek. Dále byla vyzkoušena hydrolýza v prostředí TFA a dichlormethanu při ochlazení na 0 °C. Tato reakce neposkytla očekávaný produkt ani při zvýšení reakční teploty na 25 °C. Proto byl v následujícím pokusu dichlormethan nahrazen methanolem, ale stále bez uchopitelného výsledku. Pro odstranění THP skupiny byla následně použita 10% kyselina octová. Reakce neprobíhala při pokojové teplotě, ani při zahřátí na 60 °C. Požadovaný výsledek poskytla až reakce za použití kyseliny chlorovodíkové a dioxanu při ochlazení na 0 °C. Produkt byl detekován, avšak výtěžek byl velmi nízky. Nejoptimálnějšího výtěžku 61 až

86 % bylo dosaženo při reakci s 4M kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu za stálého chlazení na 0 °C.

Látky **2**, **4**, **6**, **8**, **10** a **12** byly připraveny v posledním kroku (Schéma 4) syntézy odstraněním chránící THP skupina v kyselém prostředí. Reakce probíhala za postupného přikapávání 4M kyseliny chlorovodíkové v dioxanu po dobu 2 hodin a teplotě 0 °C. Látky **2**, **4**, **6** a **8** byly následně převedeny z hydrochloridové formy na volnou bázi. Tento krok značně ovlivnil výtěžnost reakce. Látky **10** a **12** byly ponechány ve formě hydrochloridu. Výtěžek látek **2** byl 17 %, látky **4** 94 %, látky **6** 13 %, látky **8** 24 %, látky **10** 56 % a látky **12** 86 %. Čistota látek byla v rozmezí 92,3 až 99 + % (Tabulka 4).

Schéma 4:



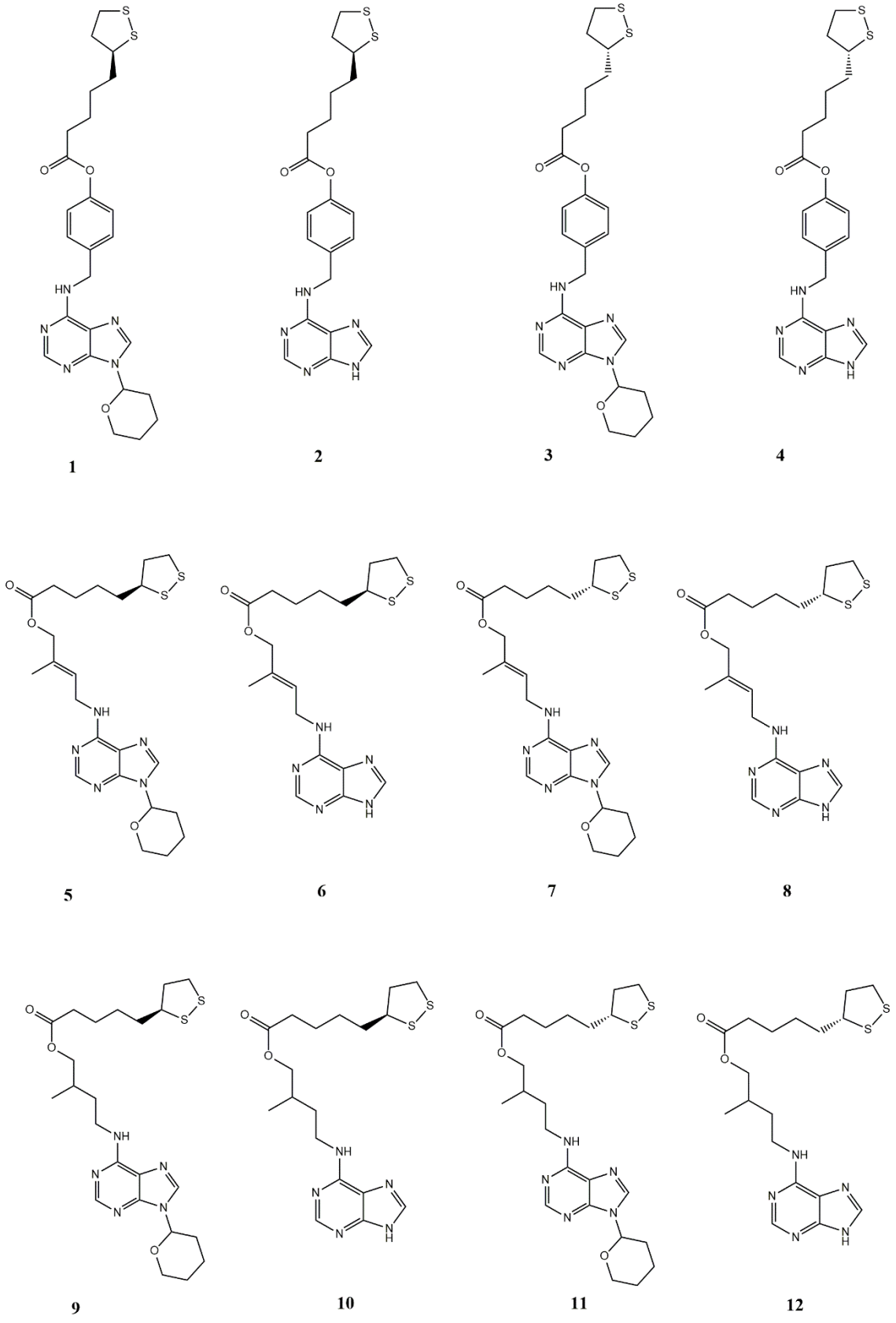
Tabulka 3: Shrnutí optimalizace reakčních podmínek metody hydrolýzy (schéma 4).

Reakční činidlo	Reakční teplota [°C]	Výsledek	Výtěžek [%]
1M HCl/ methanol (1:4)	25	Neúspěšné	-
TFA/ CH_2Cl_2	0	Neúspěšné	-
TFA/ CH_2Cl_2	25	Neúspěšné	-
TFA/ methanol	25	Neúspěšné	-
10% CH_3COOH	25	Neúspěšné	-
10% CH_3COOH	60	Neúspěšné	-
HCl konc./ dioxan	0	Detekován produkt	Nízký výtěžek
4M HCl/ dioxan	0	Detekován produkt	61-86 %

Čtyřkrokovou syntézou tak bylo připraveno 12 konjugátu R/S-LA s vybranými cytokininy – *p*T, *t*Z a DHZ, z nichž 6 bylo ponecháno ve formě prekurzoru s THP skupinou (Obr.11). Jejich výtežek, čistota a vzhled je shrnut v Tabulce 4. Čistota získaných produktů byla nejdříve ověřena TLC. Produkty byly poté přečištěny kolonovou chromatografií (CC). Identita a chromatografická čistota látek byla určena HPLC-MS, dále byla změřena ^{1}H a ^{13}C NMR spektra pro určení struktury nových derivátů. U pevných látek byl určen bod tání.

Tabulka 4: Shrnutí výtěžností reakcí a čistot připravených 12 nových konjugátů LA.

Konjugát	Výtěžek [%]	Čistota HPLC-MS [%]	Vzhled
1	51	97,6	Pevná, nažloutlá látka
2	17	99+	Pevná, nažloutlá látka
3	51	99+	Pevná, nažloutlá látka
4	94	97	Pevná, nažloutlá látka
5	67	97,6	Olejovitá, žlutá látka
6	13	97	Olejovitá, žlutá látka
7	73	96	Olejovitá, žlutá látka
8	24	97	Olejovitá, žlutá látka
9	58	80,6	Olejovitá, žlutá látka
10	56	92,3	Pevná žlutá látla
11	63	97,8	Olejovitá, žlutá látka
12	86	93	Pevná žlutá látla



Obr.11 Přehled 12 připravených nových derivátů kyseliny lipoové.

4.1 Analýza připravených látek

4.1.1 6-chlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin

Sumární vzorec: $C_{10}H_{11}ClN_4O$

Molární hmotnost: 238,68

Výtěžek: 57 %

HPLC-MS (ESI^+): 98 %

4.1.2 4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (9-THP-*p*T)

Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}N_5O_2$

Molární hmotnost: 325,37 g mol^{-1}

Bod tání: 186,6 – 187,1 °C

Výtěžek: 67 %

HPLC-MS (ESI+): 94 %

4.1.3 (E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-ol (9-THP-*t*Z)

Sumární vzorec: $C_{15}H_{21}N_5O_2$

Molární hmotnost: 303,37 g mol^{-1}

Výtěžek: 83 %

Bod tání: 111,8 – 112,6 °C

HPLC-MS (ESI+): 97,1 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.58 (tt, 2H, J_a = 12.1 Hz, J_b = 4.0 Hz), 1.67 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 2.30-2.23 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.78 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.11-3.99 (m, 3H), 4.75 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.52 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.63 (dd, J = 11.0, 1.8 Hz, 1H), 7.91 (bs, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.34 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 13.56, 22.80, 25.69, 31.38, 37.84, 66.20, 68.19, 80.97, 119.56, 121.25, 137.50, 139.00, 152.76, 155.03

4.1.4 2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butan-1-ol (9-THP-DHZ)

Sumární vzorec: $C_{15}H_{23}N_5O_2$

Molární hmotnost: 305,37 g mol^{-1}

Výtěžek: 95 %

HPLC-MS (ESI^+): 98 %

4.1.5 Látka 1 (R-LA-THP-*p*T)

Sumární vzorec: $C_{25}H_{31}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 513,69 g mol^{-1}

Výtěžek: 51 %

HPLC-MS (ESI+): 97,6 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.48-1.40 (m, 2H), 1.73-1.54 (m, 8H), 1.97-1.84 (m, 3H), 2.36-2.23 (m, 1H), 2.41 (td, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 2.63-2.54 (m, 1H), 3.13-3.08 (m, 1H), 3.21-3.16 (m, 1H), 3.69-3.60 (m, 2H), 3.99 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 5.62 (dd, J = 11.0, 1.8 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.41 (bs, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 23.04, 24.63, 28.51, 30.31, 33.61, 34.82, 38.47, 56.63, 67.86, 81.72, 121.69, 128.87, 139.73, 148.85, 149.59, 153.13, 172.49

4.1.6 Látka 2 (R-LA-*p*T)

Sumární vzorec: $C_{20}H_{23}N_5O_2$

Molární hmotnost: 429, 56 g mol^{-1}

Výtěžek: 17 %

HPLC-MS (ESI+): 99+ %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.47-1.41 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 1.87 (td, J = 13.1, 6.5 Hz, 1H), 2.44-2.38 (m, 1H), 2.56 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.15 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 4.69 (s, 2H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.12 (bs, 1H), 8.18 (bs, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 24.63, 28.57, 33.79, 34.55, 38.65, 56.44, 122.07, 128.76, 149.59, 152.71, 172.05

4.1.7 Látka 3 (S-LA-THP-*p*T)

Sumární vzorec: $C_{25}H_{31}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 513,69 g mol^{-1}

Výtěžek: 51 %

HPLC-MS (ESI+): 99+ %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d_6*) δ 1.43 (q, J = 7.8 Hz, 2H), 1.62 (m, 8H), 1.89 (m, 3H), 2.18-2.35 (1H), 2.39 (td, J = 12.5, 6.3 Hz, 1H), 2.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.09 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 3.98 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 5.61 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 13.8 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.41 (bs, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d_6*) δ 23.10, 24.55, 24.99, 28.56, 30.40, 33.60, 34.29, 38.37, 56.45, 67.97, 81.37, 121.72, 128.37, 138.19, 139.65, 148.85, 149.66, 153.11, 154.92, 172.90

4.1.8 Látka 4 (S-LA-*p*T)

Sumární vzorec: $C_{20}H_{23}N_5O_2$

Molární hmotnost: 429, 56 g mol^{-1}

Výtěžek: 94 %

HPLC-MS (ESI+): 97 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d_6*) δ 1.44 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 1.88 (td, J = 13.1, 6.7 Hz, 1H), 2.41 (td, J = 12.5, 6.3 Hz, 1H), 2.57 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.16-3.09 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 7.06 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.20 (bs, 1H), 8.27 (bs, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d_6*) δ 24.62, 28.46, 33.65, 34.62, 38.51, 56.66, 122.12, 128.75, 149.99, 172.33, 181.11

4.1.9 Látka 5 (R-LA-THP-*t*Z)

Sumární vzorec: $C_{23}H_{33}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 491,68 g mol^{-1}

Výtěžek: 67 %

HPLC-MS (ESI^+): 97,6 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d_6*) δ 1.17-1.43 (m, 2H), 1.48-1.64 (m, 6H), 1.71 (s, 3H), 1.81-1.99 (m, 3H), 2.42-2.23 (m, 6H), 3.20-3.07 (m, 4H), 3.45 (m, 1H), 3.54 (s, 1H),

4.01-3.91 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 5.63-5.56 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.33 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 14.47, 23.04, 24.77, 25.08, 28.61, 28.81, 30.58, 33.82, 34.40, 34.52, 38.61, 56.53, 68.20, 68.80, 81.34, 126.08, 132.18, 139.20, 152.92, 173.06

4.1.10 Látka 6 (R-LA-*t*Z)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{25}N_5O_2S_2$

Molární hmotnost: 407,56 g mol^{-1}

Výtěžek: 13 %

HPLC-MS (ESI$^+$): 97 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.35 (m, 4H), 1.53 (m, 2H), 1.64 (m, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.89 (s, 1H), 2.31 (q, J = 7.4 Hz, 3H), 2.39 (td, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 3.20-3.07 (m, 1H), 3.63-3.54 (m, 1H), 4.12 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 5.60 (dd, J = 10.6, 2.6 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.19 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 14.56, 24.74, 28.62, 33.79, 34.53, 38.62, 56.32, 68.31, 123.08, 134.75, 147.40, 151.44, 172.82, 173.03

4.1.11 Látka 7 (S-LA-THP-*t*Z)

Sumární vzorec: $C_{23}H_{33}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 491,68 g mol^{-1}

Výtěžek: 73 %

HPLC-MS (ESI$^+$): 96 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.34 (m, 2H), 1.49 (m, 6H), 1.71 (s, 3H), 1.97-1.79 (m, 4H), 2.29 (m, 6H), 3.09 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 4.12 (bs, 2H), 4.43 (s, 2H), 5.63-5.58 (m, 3H), 7.99 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.34 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 14.47, 23.03, 24.76, 25.07, 28.69, 30.57, 33.82, 34.52, 38.61, 56.53, 68.20, 68.69, 81.41, 126.09, 132.24, 139.27, 145.41, 152.90, 172.85

4.1.12 Látka 8 (S-LA-*t*Z)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{25}N_5O_2S_2$

Molární hmotnost: 407,56 g mol^{-1}

Výtěžek: 24 %

HPLC-MS (ESI$^+$): 97 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.37 (m, 2H), 1.54 (m, 6H), 1.71 (s, 3H), 1.75 (s, 2H), 1.86 (m, 3H), 2.37 (m, 4H), 3.20-3.12 (m, 2H), 3.62 (s, 1H), 4.26 (m, 3H), 4.42 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 5.62 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 8.65-8.54 (m, 3H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 14.36, 24.23, 28.63, 33.63, 34.47, 38.51, 57.16, 68.16, 134.60, 147.53, 172.86

4.1.13 Látka 9 (R-LA-THP-DHZ)

Sumární vzorec: $C_{23}H_{33}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 493,68 g mol^{-1}

TLC mobilní fáze: chloroform:methanol (19:1)

Výtěžek: 58 %

HPLC-MS (ESI$^+$): 80,6 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.17-1.28 (m, 2H), 1.30-1.45 (m, 3H), 1.48-1.59 (m, 6H), 1.59-1.78 (m, 4H), 1.81-1.99 (m, 3H), 2.42-2.23 (m, 6H), 3.13 (m, 3H), 3.58 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 4.00 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 5.62 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 8.24-8.22 (m, 1H), 8.33 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 17.19, 23.04, 24.77, 24.91, 25.07, 25.19, 25.96, 28.64, 28.81, 30.42, 30.57, 30.89, 32.25, 33.90, 34.53, 34.65, 38.60, 52.80, 56.55, 67.68, 68.55, 139.03, 173.75

4.1.14 Látka 10 (R-LA-DHZ)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{27}N_5O_2S_2$ x HCl

Molární hmotnost: 445,62 g mol^{-1}

Výtěžek: 56 %

Bod tání: 151,5 – 153,9 °C

HPLC-MS (ESI$^+$):92,3 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.35 (m, 2H), 1.51 (m, 7H), 1.63 (m, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.89 (m, 3H), 2.31-2.28 (m, 3H), 2.39 (m, 1H), 3.13 (m, 2H), 3.37-3.27 (m, 1H), 3.66 (m, 4H), 3.93 (d, J = 5.8 Hz, 3H), 8.58 (s, 1H), 8.64 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 17.01, 24.76, 28.64, 30.10, 32.55, 33.80, 34.32, 35.11, 38.68, 56.36, 67.04, 68.67, 143.50, 147.25, 173.66

4.1.15 Látka 11 (S-LA-THP-DHZ)

Sumární vzorec: $C_{23}H_{33}N_5O_3S_2$

Molární hmotnost: 493,68 g mol^{-1}

Výtěžek: 63 %

HPLC-MS (ESI^+): 97,8 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.23 (s, 2H), 1.65 (s, 4H), 1.87-1.69 (m, 3H), 1.94 (m, 2H), 2.28 (m, 3H), 2.40-2.34 (m, 1H), 3.12-3.06 (m, 1H), 3.19-3.14 (m, 1H), 3.57 (m, 2H), 3.67 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 4.00 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.62 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.33 (s, 1H)

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 17.19, 23.04, 24.77, 25.07, 28.64, 30.42, 30.57, 33.08, 33.90, 34.53, 37.97, 38.36, 38.60, 56.98, 67.84, 68.64, 81.32, 138.81, 173.46

4.1.16 Látka 12 (S-LA-DHZ)

Sumární vzorec: $C_{18}H_{27}N_5O_2S_2$ x HCl

Molární hmotnost: 445,62 g mol^{-1}

Výtěžek: 86 %

Bod tání: 145,1 – 147,6 °C

HPLC-MS (ESI^+):93 %

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 1.34 (m, 2H), 1.49 (m, 6H), 1.69 (m, 2H), 1.87 (m, 3H), 2.28 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 3.11 (m, 2H), 3.27 (m, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.61 (s, 1H); část spektra v oblasti δ 3,3 – 4,2 ppm nelze vyhodnotit

^{13}C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ 16.98, 24.75, 28.62, 30.34, 32.27, 33.88, 34.49, 38.59, 56.58, 66.85, 68.65, 143.68, 146.60, 147.49, 173.29

4.2 Stanovení celkové antioxidační kapacity (ORAC)

Metodou ORAC bylo změřeno 11 vybraných vzorků. Tato metoda využívá schopnost antioxidantů neutralizovat ROS, konkrétně peroxylové radikály generované roztokem AAPH při 37 °C. Při hodnocení antioxidační kapacity je sledována intenzita fluorescence v závislosti na čase. Jako standard pro hodnocení je použita kalibrační řada Troloxu. Výsledky měření vyjádřeny jako ekvivalenty mmol Troloxu (TE) na mmol vzorku jsou založeny na ploše pod křivkou fluorescenčního rozpadu v čase (AUC) a na čisté ploše (NAUC) vypočítané v přibližných hodnotách podle rovnic I a II (Bicas et al., 2011):

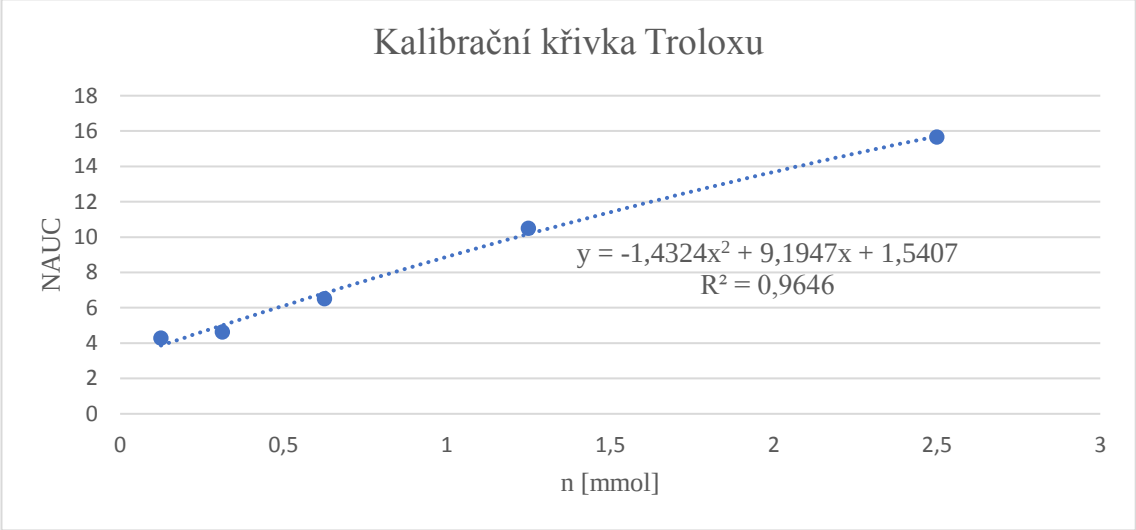
(I) $$AUC \cong 1 + \sum_{i-1}^{30} \frac{f_i}{f_0}$$

ve které je f_0 hodnota počáteční fluorescence v čase t = 0 a f_i je hodnota fluorescence v čase t = i (min).

(II) $$NAUC = AUC_{vzorku} - AUC_{blank}$$

Hodnota NAUC Troloxu pak byly vyneseny proti látkovému množství (n) v objemu jamky. Z rovnice kalibrační přímky (Graf 1) bylo následně vypočítáno n vzorků. Pro výpočet TE látky byla vypočítaná hodnota TE v jamce pro každou látku vydělena hodnotou n látky v jamce. Výsledné hodnoty antioxidační kapacity vybraných látek jsou uvedeny v Tabulce 5. Nízké hodnoty antioxidační kapacity měly všechny připravené konjugáty *tZ* i R-LA. Uvedené hodnoty TE ani u jedné z látek nedosahovaly hodnoty 1. To znamená, že téměř nevychytávají peroxylový radikál. Nízká antioxidační kapacita R-LA se shoduje s výsledky studie Tomera et al. (2007). Nejvyšších hodnotu antioxidační kapacity měl *p*T, který byl 6 x aktivnější než Trolox. Při porovnání hodnot TE cytokininů jsou hodnoty *p*T mnohonásobně vyšší než u *tZ*. Tento výsledek se shoduje se studií Brizzolari et al. (2016), kde byla hodnocena antioxidační kapacita vybraných přírodních cytokinonů. Pozorované rozdíly pravděpodobně závisí na chemické struktuře skupiny přítomné v N^6 poloze adeninu. Zvýšená aktivita u *p*T je tak odůvodněna přítomností volné -OH skupiny. Konjugáty s *p*T jsou neaktivní, protože fenolický hydroxyl je v nich esterifikován.

Graf 1 Kalibrační křivka Troloxu. Vyjadřuje závislost průměrné hodnoty čisté plochy pod křivkou na látkovém množství Troloxu.



Tabulka 5

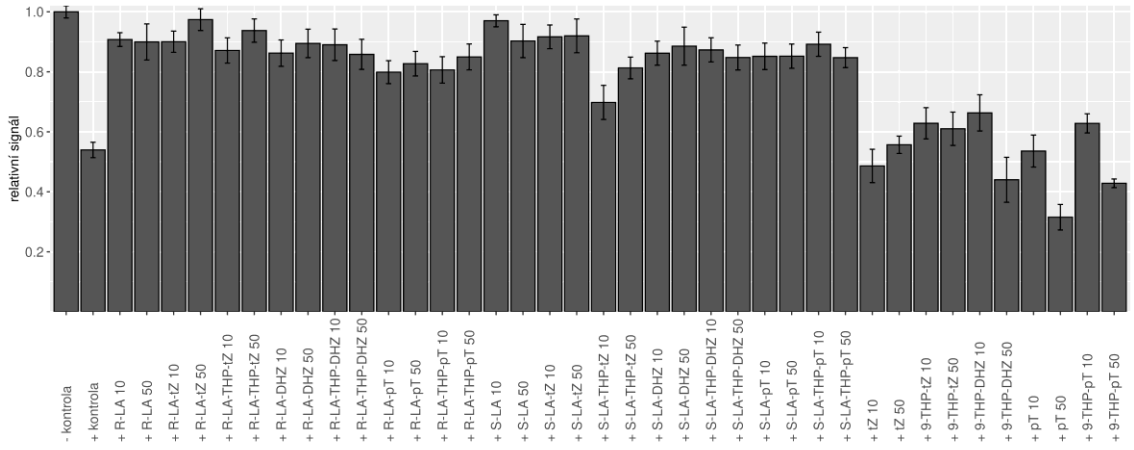
Látka	TE ± SO
R-LA-THP-pT (1)	0,0642 ± 0,0129
R-LA-pT (2)	0,0114 ± 0,0015
S-LA-THP-pT (3)	0,0631 ± 0,0033
S-LA-pT (4)	0,0837 ± 0,0057
R-LA-THP-tZ (5)	0,0307 ± 0,0089
R-LA-tZ (6)	0,0736 ± 0,0141
S-LA-THP-tZ (7)	0,0276 ± 0,0004
S-LA-tZ (8)	0,0125 ± 0,0001
trans-zeatin	0,0682 ± 0,0029
para-topolin	6,2953 ± 0,3757
kyselina lipoová	0,4242 ± 0,0135

4.3 Hodnocení toxicity připravených látek

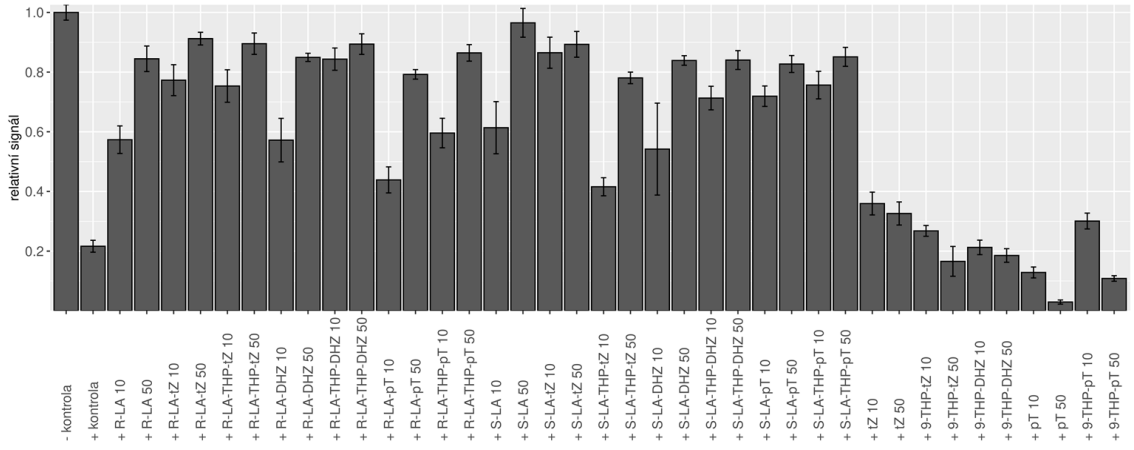
Toxicita po 3 denním působení látek 1 až 12 byla testována na liniích ARPE-19, HaCaT, BJ a GM0478 v médiu obsahujícím glukózu pomocí resazurinového testu. Průměrné hodnoty signálu jamek ovlivněných látkami, a to i v nejvyšší testované koncentraci (100 μM), přesahovaly 95 % průměru signálu jamek kontrolních. Rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Látky tedy nevykazují významný toxický účinek. Před provedením experimentu byla vyloučena interference látek s detekcí. Látky samotné nebyly fluorescentní a neredukovaly resazurin.

4.4 Hodnocení protekce proti toxickému působení L-buthionin-S,R-sulfoximinu

Schopnost připravených látek v 10 a 50 μM koncentraci chránit fibroblasty GM04078 v médiu s obsahem galaktózy proti působení BSO v koncentraci 300 a 600 μM byla hodnocena pomocí resazurinového testu po 3 denní expozici. Látky byly přidány 24 hodin před přidáním stresoru. Výsledky testu ukazují Obr. 12 a 13. V obou experimentech byla pozorována statisticky významná ochrana ($p < 0.05$) buněk v přítomnosti všech konjugátů i R/S-LA. U cytokininů bez navázané LA nebyla pozorována cytoprotektivní aktivita. Protektivní aktivita látek byla hodnocena na linii GM04078, která vykazuje zvýšenou citlivost ke stresu díky mutaci genu pro frataxin. Tento protein je nezbytný pro sestavování Fe-S klastrů. Důsledkem je abnormální fungování mitochondrií, které je spojeno se sníženou produkcí energie, zvýšeným oxidativním stresem (Carletti a Piemonte, 2014) a hromaděním železa v mitochondriích (Gakh et al., 2006). V experimentech byla glukóza v médiu nahrazena galaktózou proto, aby buňky produkovaly energii oxidativní fosforylací místo glykolýzy. Buňky jsou poté závislé na produkci energie mitochondriemi a je tak možné posílit projevy jejich defektů.



Obr. 12 Protekce proti působení BSO (300 µM, 3 dny). Konjugáty byly testovány ve dvou koncentracích 10 a 50 µM. + znamená přítomnost toxinu, - nepřítomnost.

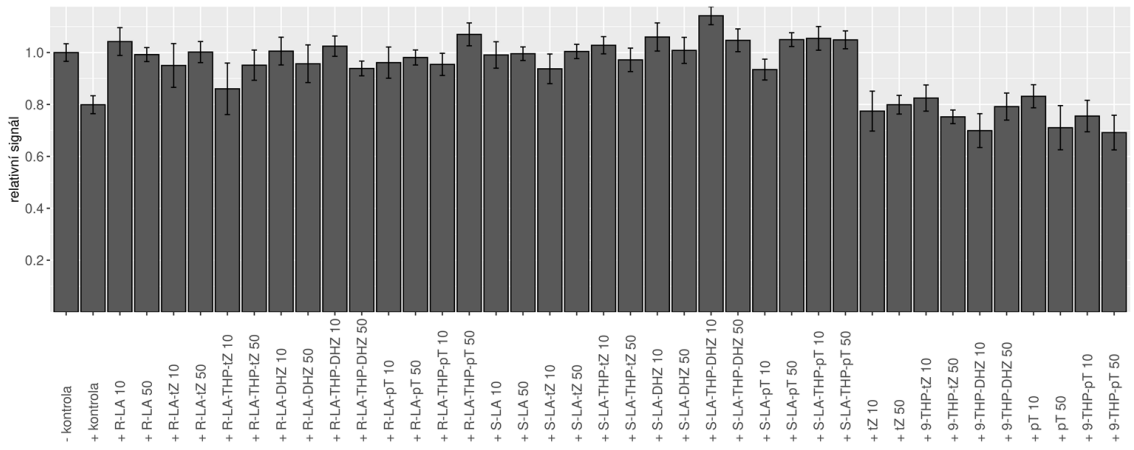


Obr. 13 Protekce proti působení BSO (600 µM, 3 dny). Konjugáty byly testovány ve dvou koncentracích 10 a 50 µM. + znamená přítomnost toxinu, - nepřítomnost.

4.5 Hodnocení protekce proti toxickému působení soli trojmocného železa

Schopnost připravených látek v 10 a 50 µM koncentraci chránit fibroblasty GM04078 v médiu s obsahem galaktózy při vystavení citronanu amonno-železitému v koncentraci 10 mM byla hodnocena pomocí resazurinového testu po 3 denní expozici. Látky byly přidány 24 hodin před přidáním stresoru. Výsledky pilotního experimentu ukazuje Obr. 14. Průměrné hodnoty signálu zvyšovaly všechny konjugáty, ale statisticky významného efektu bylo dosaženo jen u některých. Statisticky významná protektivní aktivita ($p<0.05$) byla pozorována u R/S-LA (10 µM i 50 µM) a konjugátů R-LA-*t*Z (10 µM),R-LA-DHZ

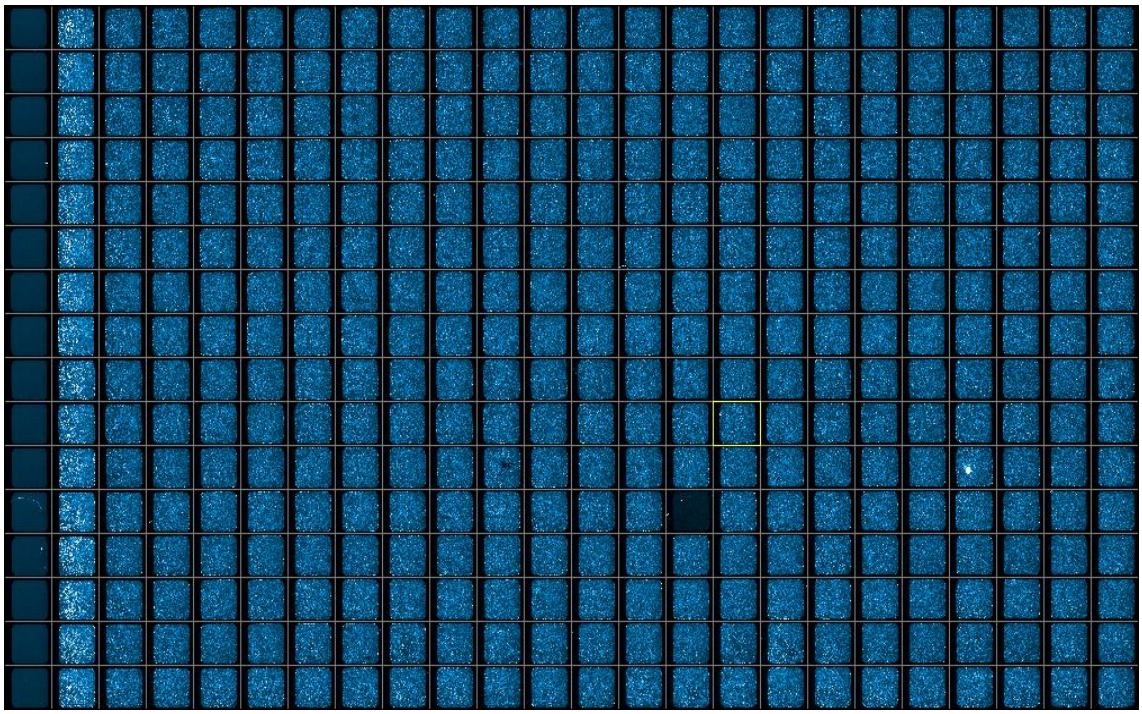
(10 µM), R-LA-THP-DHZ (50 µM), R-LA-*p*T (50 µM),S-LA-*t*Z (50 µM),S-LA-THP-*t*Z (10 µM), S-LA-DHZ (10 µM i 50 µM),S-LA-*p*T(50 uM), S-LA-THP-*p*T (10 µM i 50 µM). U cytokininů bez navázané LA nebyla pozorována cytoprotektivní aktivita. V pilotním experimentu jen některé konjugáty chránily buňky linie GM04078 proti působení trojmocného železa. Protektivní efekt několika dalších konjugátů nedosáhl statistické významnosti.



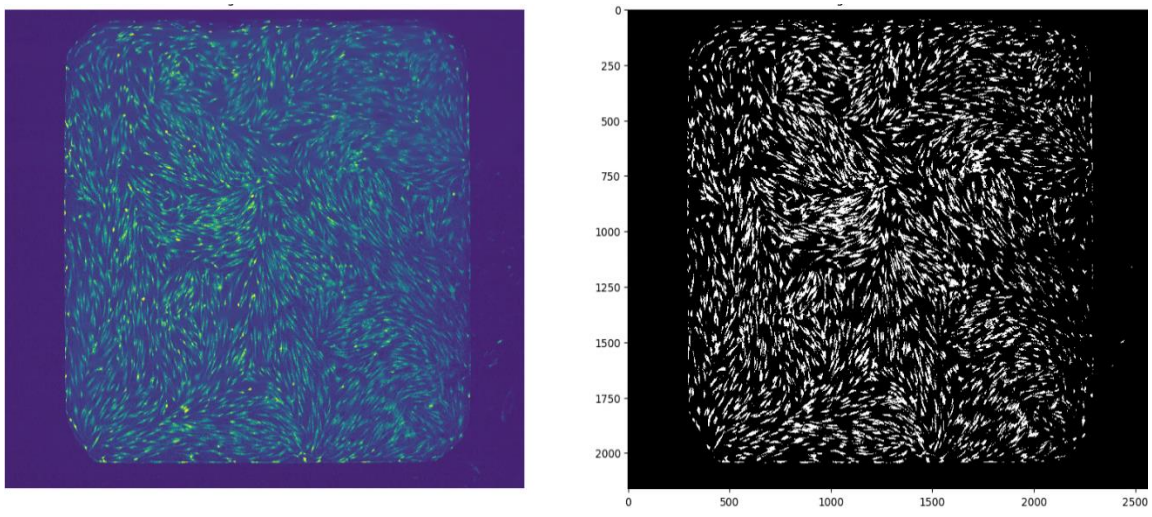
Obr. 14 Protekce proti působení Fe^{3+} (10 mM citronan amonno-železitý, 3 dny). Konjugáty byly testovány ve dvou koncentracích 10 a 50 µM. + znamená přítomnost toxinu, - nepřítomnost.

4.6 Hodnocení vlivu na koncentraci redukovaného glutathionu po expozici L-buthionin-S,R-sulfoximinu.

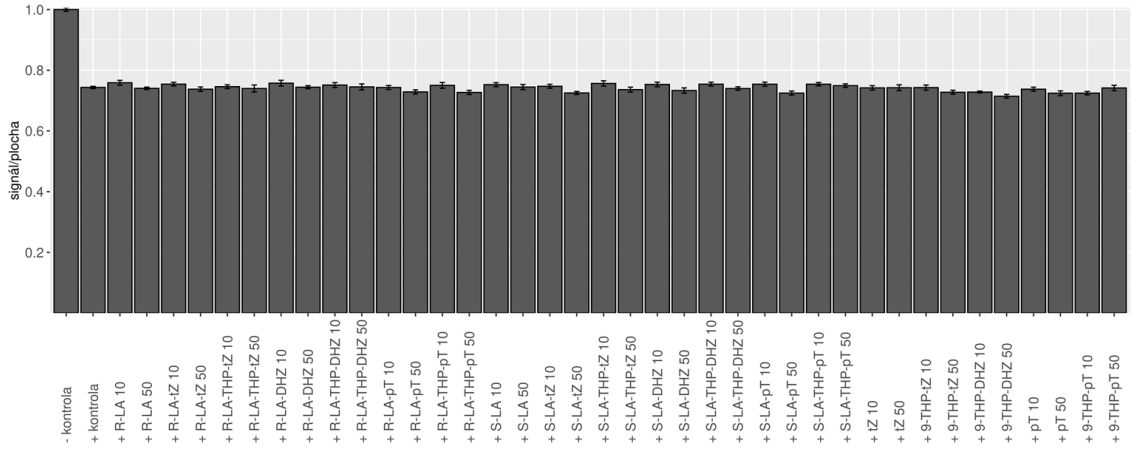
Schopnost připravených látek při 10 a 50 µM koncentraci chránit fibroblasty GM04078 v médiu s obsahem galaktózy proti depleci redukovaného glutathionu indukovanané působením BSO v koncentraci 10 a 100 µM byla hodnocena po 24 hodinách. Látky byly přidány 24 hodin před přidáním stresoru. Koncentrace glutathionu byla hodnocena pomocí analýzy obrazu buněk obarvených monobromobimanem (Obr. 15 a 16). Výsledky ukazují (Obr 17 a 18), že ošetření buněk R/S-LA, cytokininy ani konjugáty nemělo žádný protektivní účinek. Kvantifikace konjugátů redukovaného glutathionu s monobromobimanem tak ukázala, že protektivní efekt pravděpodobně není spojen se zvýšenou hladinou glutathionu.



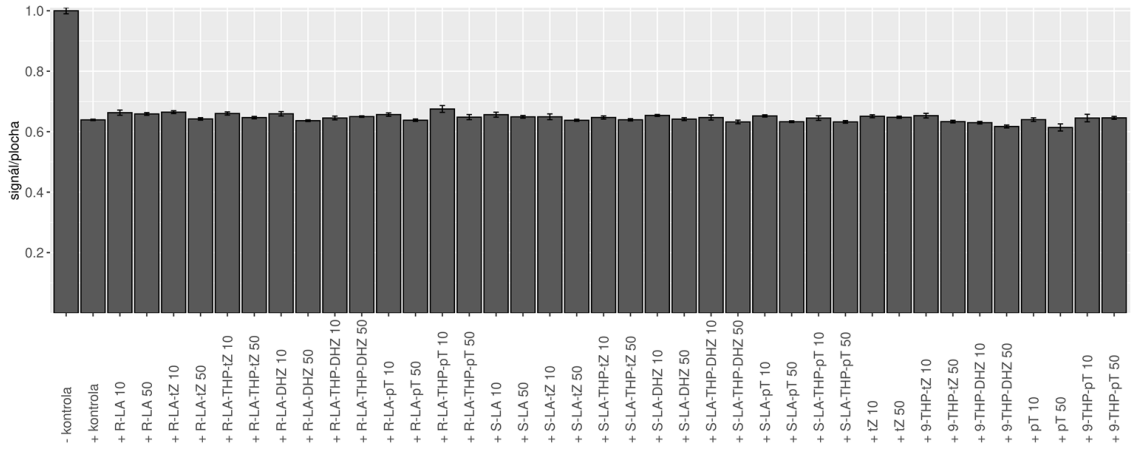
Obr. 15 Ukázka souboru snímků buněk v jamkách 384 jamkové desky u experimentu s 10 μM BSO. Levý krajní sloupec – médium bez buněk. Druhý sloupec zleva – buňky bez stresoru, třetí sloupec zleva – buňky se stresorem. Do dalších sloupců byly před expozicí stresoru přidány testované látky. Sudé řádky obsahovaly 10 μM a liché řádky 50 μM látky. Jamky L15 a K21 s artefaktem byly z analýzy vyřazeny.



Obr. 16 Ukázka identifikace oblasti odpovídající buňkám pomocí software na analýzu obrazu.



Obr. 17 Sledování vlivu na depleci redukovaného glutathionu indukovanou BSO (10 μM, 24 h). + znamená přítomnost toxinu, - nepřítomnost. Hodnoty jsou standardizovány na průměr kontrolních buněk.



Obr. 18 Sledování vlivu na depleci redukovaného glutathionu indukovanou BSO (100 μM, 24 h). + znamená přítomnost toxinu, - nepřítomnost. Hodnoty jsou standardizovány na průměr kontrolních buněk.

5 ZÁVĚR

Teoretická část práce popisuje vlastnosti kyseliny α-lipoové, zejména se zaměřením na cytoprotektivní aktivitu této látek a jejich derivátů ve spojitosti s ochranou kůže. Pozornost byla dále věnována rostlinným hormonům cytokininům a jejich potenciálu v kosmetologii.

V experimentální části je popsána příprava 12 nových konjugátů kyseliny α-lipoové, zahrnující oba optické izomery R(+) i S(-), s aromatickými a isoprenoidními cytokininovými bázemi. V posledním stupni syntézy byla vyvinuta jemná a selektivní metoda deprotekce THP skupiny se současným zachováním labilní esterové vazby konjugátů. Připravené látky byly analyzovány fyzikálně-chemickými metodami pro ověření jejich čistoty a identity.

Metoda ORAC byla využita pro hodnocení antioxidační kapacity konjugátů R/S-LA s *t*Z nebo *p*T 1 až 8. Ani jedna z těchto látek však nebyla aktivní. Spojení dvou látek s antioxidačními vlastnostmi tak neposkytlo žádnou výhodu oproti mateřským molekulám. Tato metoda hodnotí antioxidační aktivitu jen vůči peroxylovému radikálu. Pro určení skutečné antioxidační aktivity by tak bylo vhodné použít více antioxidačních testů. Dalším krokem analýzy by mělo být hodnocení antioxidačního účinku látek přímo v buňkách.

Připravené látky jsou netoxické pro nenádorové linie. Rovněž chrání fibroblasty odvozené z pacientů Friedreichovy ataxie proti BSO, který inhibuje syntézu glutathionu. Ochranný efekt není spojený se zvýšením hladiny redukovaného glutathionu. U některých látek byl pozorován vliv na ochranu fibroblastů odvozených z pacientů Friedreichovy ataxie při působení trojmocného železa. Látky jsou připraveny pro další testování cytoprotektivní aktivity v dalších modelech, včetně testování na 3D modelech kůže.

6 LITERATURA

Alonis M., Pinnell S., Self W. T. (2006). Bioavailability of selenium from the selenotrisulphide derivative of lipoic acid. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 22(6):315–323.

Ames B. N. (2004) United States Patent Application US 20040044046.

Arner E. S., Nordberg J., Holmgren A. (1996) Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid bymammalian thioredoxin reductase. Biochemical and Biophysical Research Communications 225:268–274.

Antonello A., Hrelia P., Leonardi A., Marucci G., Rosini M., Tarozzi A., Tumiatti V., Melchiorre C. (2005) Design, synthesis and biological evaluation of prazosin-related derivatives as multipotent compounds. Journal of Medicinal Chemistry, 48:28-31.

Aungst B. J., Blake J. A., Hussain M. A. (1990) Contributions of Drug Solubilization, Partitioning, Barrier Disruption, and Solvent Permeation to the Enhancement of Skin Permeation of Various Compounds with Fatty Acids and Amines. Pharmaceutical Research, 7:712-718.

Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. The FEBS Journal 393:197–200.

Barciszewski J., Mielcarek M., Stobiecki M., Siboska G., Clark B. F. C. (2000) Identification of 6-furfuryladenine (kinetin) in human urine. Biochemical and Biophysical Research l

Baumann L. (2002) Cosmetic dermatology. New York: McGraw-Hill; 226 p.

Beitner H. (2003) Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% alpha-lipoic acid related to photoageing of facial skin. British Journal of Dermatology, 149:841–849.

Bicas J. L., Neri-Numa I. A., Ruiz A. L. T. G., De Carvalho J. E., Pastore G. M. (2011). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. Food and Chemical Toxicology, 49(7),

Biewenga G. P., Dorstijn M. A., Verhagen J. V., Haenen G. R. M. M., Bast A. (1996). Reduction of lipoic acid by lipoamide dehydrogenase. Biochemical Pharmacology, 51(3), 233–238.

Biewenga G., Haenen G. R., Bast A. (1997) The role of lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy. Drug Metabolism Reviews, 29(4):1025-1054.

Bilska A., Włodek L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? Pharmacological Reports, 57:570–577.

Brigelius-Flohe R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology and Medicine, 27:951–965.

Brizzolari A., Marinello C., Carini M., Santaniello E., Biondi P. A. (2016). Evaluation of the antioxidant activity and capacity of some natural N 6 -substituted adenine derivatives (cytokinins) by fluorimetric and spectrophotometric assays. Journal of Chromatography B, 1019:64–168.

Cadenas E., Packer L. (2002) Handbook of antioxidants. Second Edition Reviseand Expanded. Tirosh O., Roy S., Packer L. Lipoic Acid: Cellular Metabolism, Antioxidant activity, and Clinical Relevance., s. 473-487, Dekker, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.

Camiolo G., Tibullo D., Giallongo C., Romano A., Parrinello N., Musumeci G., Di Rosa M. Vicario N., Brundo M. V., Amenta F., Ferrante M., Copat C., Avola R., Li Volti G., Salvaggio A. Di Raimondo F., Palumbo G. A. (2019) α-Lipoic Acid Reduces Iron-induced Toxicity and Oxidative Stress in a Model of Iron Overload. International Journal of Molecular Sciences, 20(3):609.

Carletti B., Piemonte F. (2014). Friedreich's Ataxia: A Neuronal Point of View on the Oxidative Stress Hypothesis. Antioxidants, 3(3):592–603.

Constantinescu A., Pick U., Handelman G. J, Haramaki N., Han D., Podda M., Tritschler H. J., Packer L. (1995) Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. Biochemical Pharmacology 50:253–261.

Detsi A., Bouloumbasi D., Prousis K. C., Koufaki M., Athanasselis G., Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Kontogiorgis C., Hadjipavlou-Litina D. J. (2007) Design and synthesis of novel quinolinone-3-aminoamides and their -lipoic acid adducts as antioxidant and anti-inflammatory agents. Journal of Medicinal Chemistry, 50:2450-2458.

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

Fuchs J., Packer L., Zimmer G. (1997) Lipoic Acid in Health and Disease, Marcel Dekker Inc., New York.

Gakh O., Park S., Liu G., Macomber L., Imlay J. A., Ferreira G. C., Isaya G. (2006). Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. Human Molecular Genetics, 15(3):467–479.

Gan S.; Amasino R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science, 270:1986–1988.

Garcia R. L., McCullough J. L., Reece B., Massino F. J. (2008) Novel Topical Cytokinin Improves Coarse Wrinkles and Skin Roughness Without Skin Irritation. Journal of Drugs in Dermatology, 17(7):772-779.

Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2004) Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 1048:119–126.

Gelo-Pujic M., Desmurs J.-R., Delaire S., Adao A., Tawil D. (2008). Synthesis of new antioxidant conjugates and their *in vitro* hydrolysis with Stratum corneum enzymes. International Journal of Cosmetic Science, 30(3):195–204.

Gniadecka M., Wulf H. C., Mortensen N. N., Poulsen T. (1996) Photoprotection in vitiligo and normal skin. Aquantitative assessment of the role of stratum corneum viable epidermis and pigmentation. Acta Dermato-Venereologica, 76:429–432.

Gruzman A., Hidmi A., Katzhendler J., Haj-Yehiec A., Sasson S. (2004) Synthesis and characterization of new and potent -lipoic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12:1183-1190.

Haberer G., Kieber J. J. (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiology, 128:354–362.

Han B., Nimni M. E. (2005) Transdermal delivery of amino acids and antioxidants enhance collagen synthesis: *in vivo* and *in vitro* studies. Connective Tissue Research, 46:251-257.

Hagiwara S., Uchida T., Koga H., Inomata M, Yoshizumi F., Moriyama M., Kitano S., Noguchi T. (2011) The α-Lipoic acid derivative sodium zinc dihydrolipoylhistidinate reduces chemotherapy-induced alopecia in a rat model: A pilot study. Surgery Today, 41, 693.

Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L, Shaw G., Strnad M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. Journal of Medicinal Chemistry, 40(4):408-412.

Hwang I., Sheen J., Müller B. (2012) Cytokinin signaling networks. Annual Review of Plant Biology, 63:353–380.

Chheda G., Mittelman A. (1972) N6-(D2-isopentenyl) adenosine metabolism in man. Biochemical Pharmacology 21:27–37.

Jaklová Dytrtová J., Jakl M., Straka M., Kohlíková E. (2018) Je resveratrol opravdu lék proti stárnutí? Vesmír, 97:732.

Ji C., Yang Y., Yang B., Xia J., Sun W., Su Z., Yu L., Shan S., He S., Cheng L., Wan Y., Bi Z. (2010) Trans-Zeatin attenuates ultraviolet induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. International Journal of Molecular Medicine, 26:257–263.

Kagan V. E., Shvedova A., Serbinova E., Khan S., Swanson C., Powell R., Packer L. (1992) Dihydrolipoic acid—a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxyl, ascorbyl and chromanoxyl radicals. Biochemical Pharmacology 44:1637–1649.

Katayama K., Armendariz-Borunda J., Raghow R, Kang A.H., Seyerl J.M. (1993) A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. Journal of Biological Chemistry, 268:9941-9944.

Khanna S., Atalay M., Lodge J. K., Laaksonen D. E, Roy S., Hanninen O., Packer L., Sen C. K. (1998) Skeletal muscle and liver lipoyllysine content in response to exercise, training and dietary alphalipoic acid supplementation. Biochemistry and molecular biology international, 46:297–306.

Kim J. H., Sim G. S., Bae J.T., Oh J. Y., Lee G. S., Lee D. H, Lee B. C., Pyo H. B. (2008) Synthesis and anti-melanogenic effects of lipoic acid-polyethylene glycol ester. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60:863-870.

Koufaki M., Calogeropoulou T., Detsi A., Roditis A., Kourounakis A.P., Papazafiri P., Tsiakitzis K., Gaitanaki C., Beis I., Kourounakis P.N. (2001) Novel potent inhibitors of lipid peroxidation with protective effects against reperfusion arrhythmias. Journal of Medicinal Chemistry. 44:4300-4303.

Koufaki M., Detsi A., Theodorou E., Kiziridi C., Calogeropoulou T., Vassilopoulos A., Kourounakis A.P., Rekka E., Kourounakis P.N., Gaitanaki C., Papazafiri P. (2004) Synthesis of chroman analogues of lipoic acid and evaluation of their activity against reperfusion arrhythmias. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12:4835-4841.

Koufaki M., Detsi A., Kiziridi C. (2009). Multifunctional Lipoic Acid Conjugates. Current Medicinal Chemistry, 16(35):4728–4742.

Kozlov A. V., Gille L., Staniek K., Nohl H. (1999) Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by twoelectron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. Archives of Biochemistry and Biophysics, 363:148–154.

Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological aktivity of olomoucine II. Bioorg Med Chem Lett 12:3283–3286.

Kulaeva O. N., Karavaiko N. N., Selivankina S., Zemlyachenko Y. V., Shipilova S. V. (1995) Receptor of *trans*-Zeatin involved in transcription activation by cytokinin. FEBS Letters, 366: 26-28.

Lau W., White A., Gallagher S., Donaldson M., McNaughton G., Heard C. (2008). Scope and Limitations of The Co-Drug Approach to Topical Drug Delivery. Current Pharmaceutical Design, 14(8):794–802.

Lee B. S., Yuan X., Xu Q., McLafferty F. S., Petersen B. A., Collette J. C.; Black K. L., Yu J. S. (2009) Preparation and characterization of antioxidant nanospheres from multiple -lipoic acidcontaining compounds. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19:1678-1681.

Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays. Life Science, 41:569–573.

Li Y.-R., Li S., Lin C.-C. (2017) Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. BioFactors, 44(1):69–82.

Liu J. (2008) The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. Neurochemical Research, 33(1):194-203.

Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews; 4(8):118-126.

Lu C., Kim B., M., Lee D., Lee M., H., Kim J., H., Pyo H.-B., Chai K. Y. (2013). Synthesis of lipoic acid–peptide conjugates and their effect on collagen and melanogenesis. European Journal of Medicinal Chemistry, 69, 449–454. Magdassi S. (1997). Delivery systems in cosmetics. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 123-124:671–679.

Lupo M. P., Cole A. L. (2007) Cosmeceutical peptides. Dermatologic Therapy, 20:5.

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

Micillo R., Pistorio V., Pizzo E., Panzella L., Napolitano A., D'Ischia M. (2017) 2-S-Lipoylcaffeic Acid, a Natural Product-Based Entry to Tyrosinase Inhibition via Catechol Manipulation. Biomimetics, 2:15.

Micillo R., Sirés-Campos J., García-Borrón J., Panzella L., Napolitano A., Olivares C. (2018). Conjugation with Dihydrolipoic Acid Imparts Caffeic Acid Ester Potent Inhibitory Effect on Dopa Oxidase Activity of Human Tyrosinase. International Journal of Molecular Sciences, 19(8):2156.

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

Mittelman A., Evans J. T., Chheda G. B. (1975) Cytokinins as chemotherapeutic agents. Annals of the New York Academy of Sciences, 255:225–234.

Moini H., Packer L., Sans H.E. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxicology and Applied Pharmacology, 182:84 – 90.

Mok D. W. S., Mok M. C. (1994) Cytokinins—Chemistry, Activity, and Function. Boca Raton, FL: CRC Press.

Moura F. A., de Andrade K. Q., dos Santos J. C., Goulart M. O. (2015) Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. Current Topics in Medicinal Chemistry, 15(5):458-483.

Mulchand S. P., Lester P. (2008) *LIPOIC ACID: energy production, antioxidant aktivity and health effects*, str. 58-77, Nakladatelství CRC press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, USA.

Ogata, K. (2004) WO World Intellectual Property Organisation Patent, WO 2004/024139 A1.

Ou P., Tritschler H. J., Wolff S. P. (1995) Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. Biochemal Pharmacology, 50(1):123-126.

Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine, 19(2):227-250.

Packer L, Cadenas E. (2011) Lipoc acid energy metabolism and redox regulation and cell signaling. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 48:26 – 32.

Patel M. S., Roche T. E. (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. The FASEB Journal, 4:3224–3233.

Perham R. N. (1991) Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. Biochemistry 30:8501–8512.

Perricone N., V. (2002).United States Patent US 6472432.

Perricone N. V. (2003) United States Patent Application US 20030021855.

Perricone N. V. (2004) United States Patent Application US 20040265345.

Pick U., Haramaki N., Constantinescu A., Handelman G. J, Tritschler H. J., Packer L. (1995) Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for alpha-lipoic acid enantiomers. Biochemical and Biophysical Research Communications, 206:724–730.

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

Rattan S. I. S., Sodagam L. (2005) Gerontomodulatory and youth-preserving effects of zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging *in vitro*. Rejuvenation Research 8:46–57.

Reed L. J., DeBusk B. G., Gunsalus I. C., Hornberger, C. S. (1951) Crystalline agr-Lipoic Acid: A Catalytic Agent Associated with Pyruvate Dehydrogenase. Science, 114(2952):93–94.

Reed L. J., Koike M., Levitch M. E., Leach F. R. (1958). Studies on the nature and reactions of protein-bound lipoic acid. The Journal of Biological Chemistry, 232(1), 143–158.

Reed L. J. (1998) From lipoic acid to multi-enzyme complexes. Protein Science, 7:220–224.

Rona C., Vailati F., Berardesca E. (2004) The cosmetic treatment of wrinkles. Journal of Cosmetic Dermatology, 3, 26-34.

Rosenberg H. R.; Culik R. (1959) Effect of a-lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. Archives of Biochemistry and Biophysics, 80:86- 93.

Roy S., Sen C. K., Tritschler H. J., Packer L. (1997) Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. Biochemical Pharmacology, 53:393–399.

Sarpotdar P. P., Gaskill J. L., Giannini R. P. (1986). Effect of Polyethlene Glycol 400 on the Penetration of Drugs Through Human Cadaver Skin *In Vitro*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 75(1):26–28.

Segall A., Sosa M., Alami A., Enero C., Hormaechea F., Pizzorno M. T., Bregni C., J. (2004) Stability study of lipoic acid in the presence of vitamins A and E in o/w emulsions for cosmetic application. Journal of Cosmetic Science, 55:449-461.

Scott B. C., Aruoma O. I., Evans P.J., O'Neil C., Van der Viet A., Cross C. E., Tritschler H., Halliwell B. (1994) Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. Free Radical Research Communications, 20:119–133.

Shay K. P., Moreau R. F., Smith E. J., Smith A. R., Hagen T. M. (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. Biochimica et Biophysica Acta, 1790(10):1149–1160.

Shoji Y., Takeuchi H., Fukuda K., Fukunaga K., Nakamura R., Takahashi T., Wadal N., Kawakubo H., Miyasho T., Hiratsuka T., Inomata M., Betsuyaku T., Kitagawa Y. (2017). The alpha-lipoic acid derivative DHLHZn: a new therapeutic agent for acute lung injury in vivo. Inflammation Research, 66(9):803–811.

Skoog F., Strong F. M., Miller C. O. (1965) Cytokinins. Science, 148:532–533.

Smith A. R., Shenvi S. V., Widlansky M., Suh J. H., Hagen T. M. (2004). Lipoic Acid as a Potential Therapy for Chronic Diseases Associated with Oxidative Stress. Current Medicinal Chemistry, 11(9):1135–1146.

Souto E. B., Muller R. H., Gohla S. (2005) A novel approach based on lipid nanoparticles (SNL) for topical delivery of a-lipoic acid. Journal of Microencapsulation, 22:581-592.

Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. Physiol Plant 101:674–688.

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

Tomer D. P., McLeman L. D., Ohmine S., Scherer P. M., Murray B. K., O'Neill K. L. (2007). Comparison of the Total Oxyradical Scavenging Capacity and Oxygen Radical Absorbance Capacity Antioxidant Assays. Journal of Medicinal Food, 10(2), 337–344.

Thom E. (2005) A randomized double-blind, placebo-controlled study on the clinical efficacy of oral treatment with Dermavite on ageing symptoms of the skin. Journal of International Medical Research, 33:267–272.

Tsuji-Naito K.; Hatani T.; Okada T.; Tehara T. (2007) Modulating effects of a novel skin-lightening agent, -lipoic acid derivative, on melanin production by the formation of DOPA conjugate products. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15:1967-1975.

Valko M., Morris H., Cronin M. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry, 12(10):1161–1208.

Van Staden, J. (1988) Cytokinins and senescence. Senescence Aging Plants, 281–328.

Vermeulen K., Strnad M., Kryštof V., Havlíček L., Van der Aa A., Lenjou M., Nijs G., Rodrigus I., Stockman B., van Onckelen H., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2002) Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK 16:299–305.

Veselý J, Havlíček L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L., Leclerc S. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. European Journal of Biochemistry, 224:771–786.

Wanitphakdeedecha R., Meeprathom W., Manuskiatti W. (2015) Efficacy and safety of 0.1% kinetin cream in the treatment of photoaging skin. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology, 81(5):547.

Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. Current Opinion in Plant Biology 12(5):527–538.

Whanger P.D. (2004) Selenium and its relationship to cancer: an update dagger. British Journal of Nutrition; 91:11–28.

Yaar M., Gilchrest B.A. (2003) Aging of skin. In: Freedberg I. M., Eisen A. Z., Wolf K., Austen K. F., Goldsmith L. A., Katz S. I., editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine, vol 2. New York: McGraw-Hill; p. 1386–98.

Yıldırım Baş F., Bayram D., Arslan B., Armağan I., Yeşilot Ş., Çiçek E., Yorgancıgil E. (2017). Effect of alpha lipoic acid on smoking-induced skin damage. Cutaneous and Ocular Toxicology, 36(1), 67–73.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

9-THP-DHZ	2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)butan-1-ol
9-THP-*pT*	4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol
9-THP-*t*Z	(E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-ol
AAPH	2,2-azobis(izobutyrimidamid)-dihydrochlorid
AraC	cytosin arabinosid
AQP3	quaporin 3
BAP	benzylaminopurin
BSO	L-buthionin-S,R-sulfoximin
CC	kolonová chromatografie
CDK	cyklin dependentní kinasy
CoQ10	koenzym Q10
DCC	N,N′-dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	N-N´-dicyklohexyl močovina
DHLA	kyselina dihydrolipoová
DHLHZn	dihydrolipoylhistidinát sodno-zinečnatý
DHZ	dihydrozeatin
DMAP	N,N-dimethylpyridin-4-amin
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DO	L-DOPA oxidáza

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMC	extracelulární matrix
ESI^+	ionizace elektrosprejem v kladném módu
FAC	citrát amonno-železitý
GSH	glutathion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC50	množství inhibitoru, které zpomalí enzymatickou reakci, za daných reakčních, podmínek, na polovinu
iP	N^6-isopentenyladenin
iPR	N^6-isopentenyladenosin
IR	infračervené záření
K	kinetin
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
LA	kyselina lipoová
LCA	kyselina 2-S-lipoylkávová
LCAME	methylester kyseliny 2-S-lipoylkávové
MDA	malondialdehyd
MF	mobilní fáze
MMP-1	matrixová metalloproteináza 1
ORAC	metoda hodnocení kapacity pohlcovat kyslíkové radikály
PBS	fosfátový pufr
PEG	polyethylenglykol
pT	*para*-topolin
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
R,S- LA	racemická směs enantiomerů R(+) a S(-) kyseliny α-lipoové
R-LA	R(+) enantiomer kyseliny α-lipoové
R-LA-DHZ	4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbutyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
R-LA-pT	4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
R-LA-tZ	(E)-4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbut-2-en-1-yl (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu

R-LA-THP-DHZ	2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6 yl)amino)butyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
R-LA-THP-pT	4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoát
R-LA-THP-tZ	(E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-yl 5-((R)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
RVO	rotační vakuová odparka
Rt	laboratorní teplota
S-LA	S(-) enantiomer kyseliny α-lipoové
S-LA-DHZ	4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbutyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
S-LA-pT	4-(((9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl (S)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
S-LA-tZ	(E)-4-((9*H*-purin-6-yl)amino)-2-methylbut-2-en-1-yl (S)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
S-LA-THP-DHZ	2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6 yl)amino)butyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
S-LA-THP-pT	4-(((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoát
S-LA-THP-tZ	(E)-2-methyl-4-((9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)but-2-en-1-yl 5-((S)-1,2-dithiolan-3-yl)pentanoátu
SO	směrodatná odchylka
TE	Trolox ekvivalent
TFA	kyselina trifluoroctová
TH	tyrosin hydroxyláza
THP	tetrahydropyran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Troxol	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
t-RNA	transferová ribonukleová kyselina
*t*Z	*trans*-zeatin
UV	ultrafialové záření
UVB	ultrafialové záření odpovídající vlnové délce od 280 do 315 nm