

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv derivátů přírodních látek na transkripční
aktivitu jaderných receptorů regulujících
metabolismus xenobiotik**

Diplomová práce

Bc. David Klíč

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. & Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem řádně citoval veškeré použité zdroje uvedené v seznamu citované literatury.

V Prostějově dne:

.....

Bc. David Klíč

SOUHRN

Předmětem zájmu byla série nově syntetizovaných derivátů přírodních látek (KST-35, KST-41 a KAC-59-F). Tyto sloučeniny jsou charakteristické společným výskytem heterocyklu chinolinu, pyridinu a piperazinu. V dnešní době množství užívaných léčiv obsahuje právě tyto struktury. Sloučeniny byly hodnoceny pro případnou interakci s aryl uhlovodíkovým (AhR) a glukokortikoidním (GR) receptorem. Tyto jaderné receptory vystupují jako ligandem aktivované transkripční faktory. Změnou transkripční aktivity receptorů je regulována celá řada signálních drah organismu. Pro monitoring vlastností testovaných sloučenin bylo užito následné metodiky: konvenčním MTT testem byla stanovena cytotoxicita, metodou Gene Reporter Assay byla sledována transkripční aktivita. Pro objasnění těchto vztahů byly stabilně transfekované buněčné linie AZ-AhR a AZ-GR ošetřeny přidávkem testovaných sloučenin o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Sloučenina KST-41 (10 $\mu\text{mol/l}$) byla identifikována jako parciální agonista AhR. V tomto případě byla zaznamenána aktivace receptoru odpovídající 28 násobku negativní kontroly methanolu (MeOH). Rovněž byla sledována blokáce odpovědi vyvolaná pozitivní kontrolou dioxinem (TCDD) ve výši 66 %. Zbývající dvě sloučeniny byly stanoveny jako antagonisté AhR. Nejmarkantnější antagonistický účinek způsobila sloučenina KAC-59-F (pokles 75 %; 10 $\mu\text{mol/l}$). Antagonistická aktivita byla přímo úměrná zvyšující se koncentraci testovaných sloučenin. Podobný trend byl pozorován i ve vztahu sloučenin ke GR. Byla identifikována trojice antagonistů GR snižující odpověď pozitivní kontroly dexamethazonu (DEX). Nejvyšší anti-glukokortikoidní aktivita (70 %) byla patrná u sloučeniny KST-41 (10 $\mu\text{mol/l}$). Výsledky této diplomové práce mohou mít význam pro farmakologii, ale i pro syntézu nových sloučenin.

SUMMARY

The subject of interest was a series of newly synthesized derivatives of natural substances (KST-35, KST-41 and KAC-59-F). These compounds are characterized by the occurrence of heterocycle quinoline, pyridine and piperazine. Nowadays, a large number of drugs contain these structures. The compounds were evaluated for possible interaction with the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the glucocorticoid receptor (GR). These nuclear receptors act as ligand-activated transcription factors. Modification of the receptor transcriptional activity regulates a number of signalling pathways in the organism. For monitoring of properties of the tested compounds, subsequent methodology was used: the cytotoxicity was determined by conventional MTT assay, the Reporter Gene Assay established transcriptional activity. For assessment of these relationships were stably transfected cell lines AZ-AhR and AZ-GR treated by the addition of the tested compounds with the concentrations of 0,01; 0,1; 1 and 10 $\mu\text{mol/l}$. The substance KST-41 (10 $\mu\text{mol/l}$) was identified as a partial agonist of AhR. In this case, the receptor activation was 28 times higher than the negative control methanol (MeOH). The suppression of response elicited by the positive control dioxin (TCDD), at the rate of 66 %, was recorded too. The other two compounds were identified as antagonists of AhR. The most noticeable antagonistic effect was caused by the compound KAC-59-F (decrease by 75%; 10 $\mu\text{mol/l}$). The antagonistic activity was directly proportional to increasing concentrations of the tested compounds. A similar trend was also observed in relation to GR. Three antagonists of GR were identified, which decreased the positive control dexamethasone (DEX) response. The compound KST-41 (10 $\mu\text{mol/l}$) showed the highest anti-glucocorticoid activity (70 %). The information contained in current thesis may have significant impact in pharmacology, but also for the synthesis of new compounds.

Poděkování

Rád bych zde poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. & Ph.D. za rady, ochotu a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Zvláštní poděkování patří rovněž kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie. V neposlední řadě též děkuji mé rodině, přítelkyni a přátelům za podporu během studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1 Biotransformace	9
2.1.1 I. fáze biotransformace.....	9
2.1.2 II. fáze biotransformace.....	10
2.1.3 III. fáze biotransformace.....	11
2.2 Regulace enzymů metabolizujících xenobiotika	11
2.2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR).....	13
2.2.2 Glukokortikoidní receptor (GR).....	15
2.3 Alkaloidy	17
2.3.1 Definice a historie.....	17
2.3.2 Výskyt a monitoring alkaloidů.....	17
2.3.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	18
2.3.4 Farmakologické účinky.....	20
2.3.5 Klasifikace.....	22
2.4 Syntetické alkaloidy a jejich syntéza	24
2.4.1 Chinolinové deriváty.....	25
2.4.2 Pyridinové alkaloidy.....	30
2.4.3 Piperazinové alkaloidy.....	32
3. CÍLE PRÁCE	35
4. MATERIÁL A METODIKA	36
4.1 Materiál	36
4.1.1 Chemikálie.....	36
4.1.2 Roztoky.....	37
4.1.3 Laboratorní přístroje.....	37
4.1.4 Biologický materiál.....	38
4.1.4.1 AZ-GR.....	38
4.1.4.2 AZ-AhR.....	38
4.2 Metody	38
4.2.1 Rozmrazení buněk.....	38
4.2.2 Trypsinizace a počítání buněk.....	39

4.2.3	MTT test.....	39
4.2.3.1	<i>Princip MTT testu</i>	39
4.2.3.2	<i>Metodika MTT testu</i>	40
4.2.4	Gene Reporter Assay.....	40
4.2.4.1	<i>Princip Gene Reporter Assay</i>	40
4.2.4.2	<i>Metodika Gene Reporter Assay</i>	41
4.2.5	Verifikace aktivity luciferázy.....	42
4.2.5.1	<i>Princip verifikace aktivity luciferázy</i>	42
4.2.5.2	<i>Metodika verifikace aktivity luciferázy</i>	42
5.	VÝSLEDKY	43
5.1	Vliv testovaných látek na viabilitu buněčných linií AZ-AhR a AZ-GR	43
5.2	Vliv testovaných látek na aktivitu receptorů u linií AZ-AhR a AZ-GR	45
5.2.1	Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód).....	46
5.2.2	Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód).....	47
5.2.3	Aktivace transkripční aktivity GR (agonistický mód).....	48
5.2.4	Inhibice transkripční aktivity GR (antagonistický mód).....	49
5.3	Vliv testovaných látek na katalytickou aktivitu luciferázy u linie AZ-AhR	50
6.	DISKUZE	51
7.	ZÁVĚR	54
8.	LITERATURA	55
8.1	Vědecké publikace	55
8.2	Knižní zdroje	68
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	70

1. ÚVOD

Alkaloidy představují skupinu velmi různorodých sloučenin s relativně hojným výskytem a celosvětovým pokrytím. I když si to nepřipouštíme, denně se setkáváme s jejich účinky v podobě podaných léků nebo při konzumaci kávy a čaje. Mnoho alkaloidů je toxických, avšak najdou se i ty, které participují v klinické praxi. I tak nenápadně vyhlížející rostliny, jako jsou přesličky a plavuně v sobě mohou skrývat lék proti rakovině. S přihlédnutím k obrovskému číslu identifikovaných alkaloidů (přibližně 30 000) se alkaloidy jeví jako bezedná studnice nabízející široké spektrum biologických aktivit. Na druhou stranu by bylo na škodu nevyužít potenciál ukrývající se všude kolem. Není tedy moudré obracet se k přírodě zády, ale spíše jí naslouchat a jít cestou monitoringu alkaloidních účinků.

Napříč historií se lidé setkávali s alkaloidy již před zhruba 5000 lety, kdy byly u rituálních obřadů na území Jižní Ameriky žvýkány listy koky. Od prvotních diagnostických metod, kdy byly účinky alkaloidů stanoveny až po jejich pozření, se toho hodně změnilo. V dnešní době se organičtí chemikové opírají o celou škálu moderních technik za využití počítačových programů. Právě proto mohl být v posledních 40-ti letech zaznamenán pokrok i v organické syntéze. Díky možnosti syntetizovat sloučeniny „*in vitro*“ tak komplexní, jak to dokáže „*in vivo*“ jen sama příroda, není divu, že farmaceutické společnosti zažívají renesanci v oblasti vývoje nových léků. Přestože za syntézou nové substance stojí dobrý úmysl, je vhodné nepodceňovat možné narušení fyziologických pochodů organismu. Z toho důvodu je vždy potřebné laboratorně verifikovat biologický dopad nově syntetizované substance.

V praktické části diplomové práce byla sledována interakce uměle syntetizovaných derivátů přírodních látek s jadernými receptory vystupujícími jako ligandem aktivované transkripční faktory. Pozornost byla věnována především aryl uhlovodíkovému (AhR) a glukokortikoidnímu (GR) receptoru. Aktivace, případná deaktivace těchto transkripčních faktorů, může korelovat s patologickými stavy, jako je například karcinogeneze, teratogeneze, oslabená imunita, hepatotoxicita, diabetes a glaukom. Proto je až nutností porozumět těmto pochodům na molekulární úrovni.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Biotransformace

Jedná se o souhrn biochemických reakcí, jejichž cílem je přeměna endogenních i exogenních látek v metabolity za účelem snadné exkrece z organismu (Ferenčík *et al.*, 2000). Exogenním látkám neboli také xenobiotikům jsou organismy ustavičně exponovány. Pod pojmem xenobiotika se skrývá celá řada substancí, jako jsou např. chemické látky přijímané s potravou, vzdušné polutanty, léky a mnoho dalších. Obecně se jedná o látky přírodní nebo produkované průmyslem. V naprosté většině případů zde vystupují látky, které nemají výživový ani stavební potenciál. Na druhou stranu dochází k interferenci s endogenními pochody, což koreluje s disbalancí vnitřního prostředí (Bock 2003; Skálová *et al.*, 2011).

Během evoluce si organismy vytvořily celou baterii enzymů v boji proti škodlivým vlivům xenobiotik. Jejich hlavní strategie spočívá ve změně struktury chemického individua, a tudíž i polarity. Látky spíše polárního charakteru mohou být přímo vyloučeny ledvinami. Na druhou stranu hydrofobní metabolity cirkulují mezi ledvinami a játry, čímž podléhají transformaci v metabolity hydrofilní díky enzymům. Následně dojde k vyloučení v podobě moči (Fukasawa *et al.*, 2007).

Za biotransformaci je považován proces obsahující tři fáze. V I. fázi, tedy poté co je xenobiotikum krevním řečištěm dopraveno do buňky, vzniká hydrofilnější sloučenina (Skálová *et al.*, 2011). Jedná se o bioeliminaci a ve většině případů tak vznikají méně reaktivní metabolity. Ve II. fázi dochází ke konjugaci s endogenní sloučeninou za vzniku ještě více polárního metabolitu. Během III. fáze jsou konjugáty transportovány ven z buňky a sekretovány do moči (Köhle *et Bock*, 2008).

2.1.1 I. fáze biotransformace

Tato fáze je především situována do endoplazmatického retikula buňky. Během fáze bývá využito několika přístupů, a to buď zavádění nebo odkrytí funkční skupiny nebo přeměny málo polární skupiny v polárnější (-COOH, -OH, -NH₂, =CO). Ve výsledku dochází ke zvýšení polarity celé substance. Exogenní i endogenní látky podléhají během biotransformace právě takovým reakcím, jako je oxidace (aromatická a alifatická hydroxylace, epoxidace, dealkylace, N-oxidace, oxidativní dehalogenace), redukce (redukční dehalogenace, nitroredukce, azoredukce), dále pak hydrolytickým, hydratačním

a izomeračním reakcím (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004). Ve výsledku dochází ke vzniku metabolitu, který je schopen vstoupit do II. fáze. Xenobiotika již nesoucí dostatečně polární skupiny nepodléhají I. fázi a rovnou přechází do II. fáze (Hodgson, 2010). U vyšších organismů bývá upřednostňována oxidační cesta. Prioritními činiteli v katalýze tohoto procesu jsou cytochromy P450 (CYP). Jelikož je k dnešnímu dni známo přes 200 000 substrátů CYP, následující výčet zahrnuje pouze skromný zlomek celku, a to steroidy, mastné kyseliny, eikosanoidy, retinoidy, prostaglandiny včetně většiny léků (Lewis *et al.*, 1998). V neposlední řadě lze jmenovat prokarcinogeny, jako jsou benzen a polycyklické aromatické uhlovodíky (Klingenberg, 1958). Jako další enzymy účastníci se pochodů I. fáze jsou považovány flavinové monooxygenázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy, karbonyl-reduktázy, peroxidázy, xanthinoxidázy, karboxylesterázy aj. (Knejzlík *et al.*, 2000). Zmiňované enzymy hrají důležitou roli v bioeliminaci, ale i v tvorbě toxických produktů, jelikož mohou vznikat elektrofilní skupiny, které interagují s buněčnými makromolekulami (Hodgson, 2010).

2.1.2 II. fáze biotransformace

Během této fáze dochází k charakteristické konjugaci metabolitů z I. fáze s nízkomolekulární endogenní látkou. Katalýza probíhá za přítomnosti konjugačních enzymů. Většina enzymů je situována především do prostředí endoplazmatického retikula hepatocytů. Za reakce zprostředkovávající konjugaci lze považovat následující, včetně jejich enzymů a konjugačních činidel: glukoronidace (UDP-glukuronosyl transferázy; glukuronová kyselina), sulfonace (sulfotransferázy; 3'-fosfoadenosin-5'fosfosulfát), acetylace (N-acetyltransferázy; acetyl-CoA), methylace (methyltransferázy; S-adenosylmethionin), konjugace s glutathionem (glutathion S-transferázy; glutathion) a konjugace s aminokyselinami (N-acyltransferázy, aminokyseliny) (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004). Díky těmto reakcím jsou tvořeny vysoce polární sloučeniny, což koreluje se sníženou biodostupností a snazší eliminací konjugátů. Na druhou stranu může opětovně vzniknout původní nebo ještě více toxické xenobiotikum díky hydrolytickému štěpení. Tento jev byl pozorován u aminů a karboxylových kyselin: morfinu, diklofenaku, tolmetinu a kyseliny acetylsalicylové (King *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2006).

2.1.3 III. fáze biotransformace

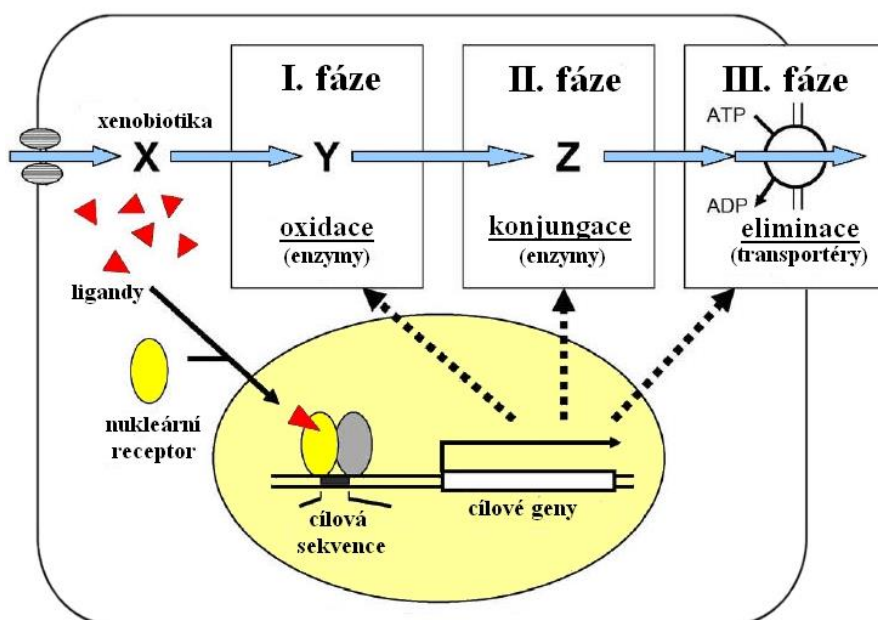
Ještě nedávno byla biotransformace rozdělována do dvou fází. Díky objevu membránových proteinů transportující xenobiotika vně buňku byl tento proces začleněn jako III. fáze (Vrzal *et al.*, 2004). Přítomnost těchto přenašečů je žádoucí, neboť nebýt jich, tak by některé příliš polární metabolity nemohly přejít přes membránu (Zamek-Gliszczyński, 2006). Nejznámějším a rovněž prvně objeveným primárním trans-membránovým proteinem je P-glykoprotein. Bývá označován jako původce mnohočetné lékové rezistence. Jedná se o ATP-dependentní glykoprotein, který využívá energii k transportu z hydrolyzy adenosin-5'-trifosfátu (ATP). Exkreci konjugovaných sloučenin obstarávají rovněž rodiny sekundárních transportérů, jako jsou transportní peptidy organických aniontů (OATP). OATP zajišťují přenos spíše hydrofobních aniontů (žlučových kyselin, tyroidních hormonů, organických barviv a léků). V případě organických aniontových transportérů (OAT) a organických kationtových transportérů (OCT) se jedná o transportéry preferující spíše hydrofilní sloučeniny (N-methyl-nikotinamid, cholin, dopamin, cimetidin, serotonin, histamin, adrenalin a noradrenalin) (Hagenbuch *et Meier*, 2003; Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004). Všechny tyto přenašeče mají společný cíl, a to trans-epiteliálním efluxem snížit intracelulární koncentraci toxických látek. Bohužel, tak může být snižována koncentrace léčiva, která je nutná pro jeho požadovaný efekt (Schinkel *et Jonker*, 2003).

2.2 Regulace enzymů metabolizujících xenobiotika

Biotransformační enzymy působí jako dynamický systém. Tento stav je pro organismus výhodný, neboť jejich neustálá modulace poskytuje organismu adaptaci na fyziologické i patologické faktory. Tyto faktory bývají rozdělovány do dvou hlavních skupin, a to na faktory interindividuální (rozdíly v biotransformaci mezi jedinci, v rámci života jedince se však nemění) a intraindividuální (změny biotransformace během života jedince). Enzymy všech tří fází mohou být v rámci interindividuálních vlivů exprimovány odlišně na základě živočišného druhu, genetické predispozice a pohlaví. Intraindividuální vlivy korelují s věkem, hormonálními vlivy, těhotenstvím, stresem, nemocemi, stravováním, indukci a inhibicí enzymů. Na molekulární úrovni může být exprese genu regulována v několika úrovních. Jedná se například o regulaci syntézou a degradací mRNA nebo enzymů, substrátovou koncentrací, presencí inhibitorů a aktivátorů, avšak největší důležitost má bezpochyby transkripční regulace zprostředkovaná nukleárními receptory (Hodgson *et al.*, 2010; Kim *et Novak*, 2007; Skálová *et al.*, 2011; Pávek *et Dvořák*, 2008; Zanger *et Schwab*,

2013). Tyto ligandem aktivované proteiny po interakci s ligandem iniciují translokaci komplexu (receptor/ligand) z cytozolu do jádra. Zde dochází k vazbě receptoru se specifickými sekvencemi DNA a následné expresi cílových genů (Obr. 1) (Vrzal *et al.*, 2004).

Za regulaci biotransformace je zodpovědných hned několik receptorů, mezi něž patří celá řada zástupců, jako je aryl uhlovodíkový receptor (AhR), glukokortikoidní receptor (GR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový X receptor (PXR), dále rovněž receptor pro kyselinu *cis*-retinovou (RXR), receptor pro kyselinu *trans*-retinovou (RAR), estrogení receptor (ER) a několik dalších (Nakata *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004). Ovšem pro potřeby diplomové práce bude větší pozornost věnována pouze AhR a GR.



Obr. 1: Regulace I., II. a III. fáze biotransformace

Překresleno podle Nakata *et al.*, 2006

2.2.1 Aryl uhlovodíkový receptor (AhR)

Tento xenoreceptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor. Regulace exprese je kontrolována mimo receptor ještě jeho represorem (AhRR) a nukleárním translokátorem (ARNT). Tato rodina je charakterizována strukturním motivem se dvěma α -helixy separovanými nehelikální smyčkou. Společně tedy náleží do rodiny bHLH-PAS transkripčních faktorů (Tirona *et* Kim, 2005).

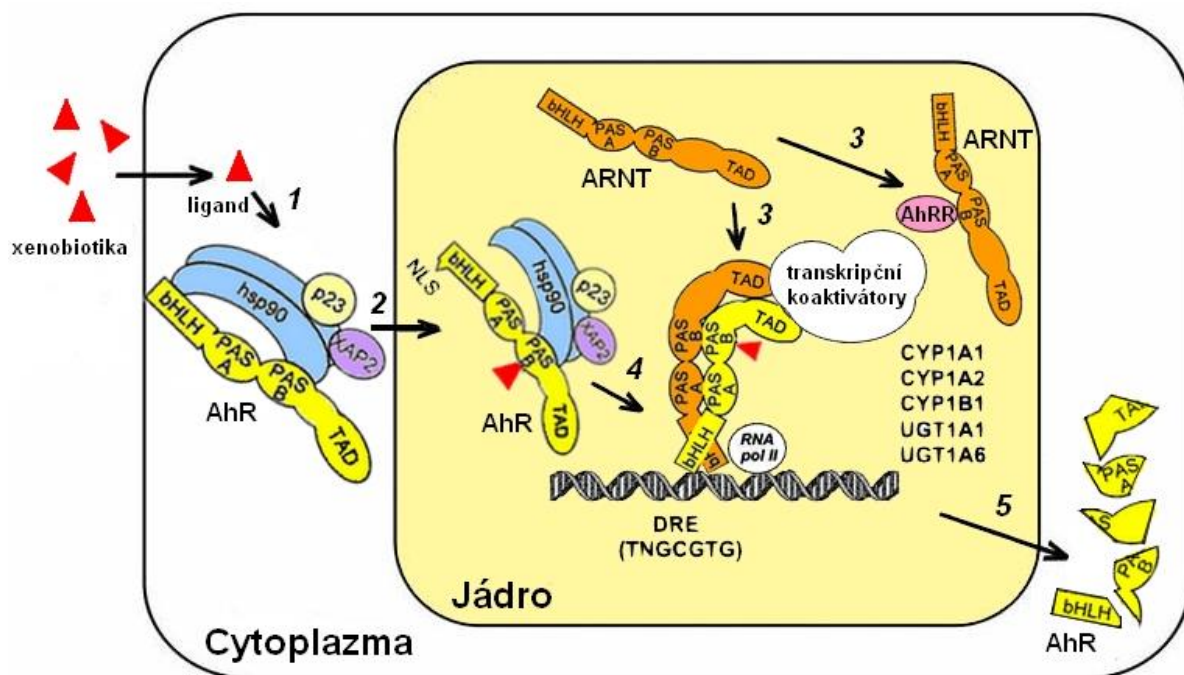
Doposud bylo odhaleno přes 400 exogenních ligandů aktivujících AhR. Jako exogenní ligandy lze jmenovat polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, indoly, karotenoidy, fenolické látky a flavonoidy. V těchto řadách je k nalezení i velmi toxický 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) (Ditrich *et* Kaina, 2010; Vrzal *et al.*, 2004). Právě tyto kontaminanty se hojně vyskytují v našich ekosystémech. Zdrojem mohou být pesticidy, cigaretový kouř, zplodiny z automobilů a továren. Kupodivu bylo prokázáno, že na první pohled nenápadným aktivátorem AhR je i některá listová zelenina a citrusové ovoce (Akamura *et al.*, 2003). Příkladem ligandů ze zastoupení endogenních sloučenin mohou být žlučová barviva, deriváty mastných kyselin a aminokyselin (Ditrich *et* Kaina, 2010).

Tento protein reguluje celou řadu fyziologických funkcí, jako je buněčná diferenciace, determinace pohlaví, vývoj a reprodukce organismu. Výše zmíněné ligandy mohou inhibovat apoptózu (u karcinogenních buněk) nebo apoptózu aktivovat (u lymfocytů). Mezi další negativa patří modulace buněčného cyklu a zvýšená proliferace transformovaných buněk (Burchiel *et* Luster, 1991; Hahn, 1998; Chramostová *et al.*, 2004). Tyto pochody korelují s toxickými účinky, jako je karcinogeneze, teratogeneze, oslabená imunita, hepatotoxicita, epiteliální hyperplazie a indukce enzymů (Nakata *et al.*, 2006).

Samotný gen AhR se vyskytuje na 7. chromozomu. Gen obsahuje 12 exonů, kódujících celkem 848 aminokyselin (Vrzal *et al.*, 2004). Aktivace receptoru souvisí s upregulací dalších genů všech tří fází a to konkrétně s CYP (CYP1A, CYP1B), UDP-glukuronosyltransferáz (UGT1A), glutathion S-transferáz (GSTA1), NAD(P)H oxidoreduktáz a ABC lékových transportérů (ABCG2) (Mimura *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004;).

Za nepřítomnosti ligandu se AhR vyskytuje v cytozolu v neaktivním komplexu se dvěma proteiny teplotního šoku (hsp90), jedním X-asociovaným protein (XAP2) a jedním kochaperonem (p23). V této konformaci je receptor transkripčně inaktivní, ale ligandem aktivovatelný. Výše zmíněné proteiny vytvářejí most mezi bHLH a PAS B doménami. Po navázání ligandu do ligand vazebné domény PAS B dochází ke konformační změně, která

vyústí ve zpřístupnění jaderného lokalizačního signálu (NLS). Poté je iniciován jaderný transport (Kewley *et al.*, 2004; Vrzal *et al.*, 2004). Jaderná translokace je doprovázena disociací chaperonových proteinů a heterodimerizací s ARNT přes bHLH a PAS domény (Kewley *et al.*, 2004; Pávek *et Dvořák*, 2008). Heterodimer se váže na promotor cílových genů, a to konkrétně s tzv. xenobiotickými nebo též dioxinovými responzivními elementy (XRE/DRE). Tyto responzivní elementy jsou charakteristické svou nesymetrickou sekvencí 5'-TnGCGTG-3', kde „n“ je libovolný nukleotid (Pávek *et Dvořák*, 2008). Heterodimer AhR/ARNT vytváří vazebnou jednotku spolu s transkripčními koaktivátory přes transaktivační domény (TAD) ARNT a AhR (Kewley *et al.*, 2004). Za tyto koaktivátory lze zmínit např. koaktivátor steroidního receptoru 1 (SRC-1), TATA vazebný protein (TBP) a TBP asociované faktory (TAF). V přítomnosti RNA polymerázy II dochází k iniciaci transkripce (Pávek *et Dvořák*, 2008). Po splnění úkolu nastává kompetitivní inhibice AhR díky vazbě AhRR s ARNT (Hahn *et al.*, 2009). Rovněž je rozpoznán jaderný exportní signál (NES) receptoru a ten je translokován zpět do cytoplazmy, kde je degradován 26S proteazomem (Obr. 2) (Pávek *et Dvořák* 2008; Vrzal *et al.*, 2004).



Obr. 2: Schéma signální transdukce po aktivaci aryl uhlovodíkového receptoru

Nakresleno podle Kewley *et al.*, 2004; Pávek *et Dvořák* 2008

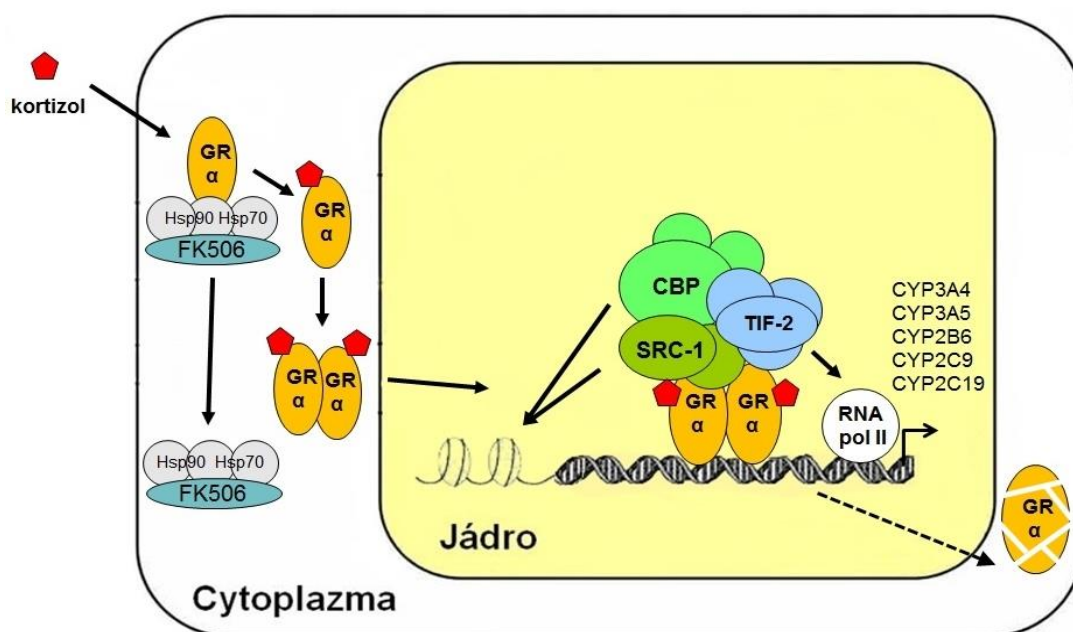
2.2.2 Glukokortikoidní receptor (GR)

I tento receptor vystupuje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor. Pro změnu patří do skupiny nukleárních hormonálních receptorů. Na expresi receptoru se podílí jeden gen čítající 9 exonů. Alternativním sestřihem exonu 9 je generováno hned několik izoform. Nejčastěji bývají exprimovány dvě izoformy, a to GR α a GR β , které se liší v C-konci (Hollenberg *et al.*, 1985). Transkripčně aktivní je pouze GR α , kdežto GR β neváže ligandy a působí antagonisticky vůči GR. Inhibice spočívá ve snížení pravděpodobnosti vzniku homodimerů GR α /GR α a vazby koaktivátorů na tento komplex (Bamberger *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 2013).

Cílovou skupinou ligandů jsou především endogenní sloučeniny glukokortikoidy. Tyto stresem uvolňované steroidní hormony jsou syntetizovány v kůře nadledvinek, ale regulují pochody ve všech tkáních organismu. Hrají nezastupitelnou úlohu v pochodech, jako je růst, vývoj, diferenciacce, proliferace, imunita, v neposlední řadě metabolismus glukózy, proteinů a lipidů. Nejdůležitější fyziologický ligand lidského GR je kortizol (Barnes, 1998; Novotná *et al.*, 2012; Sapolsky *et al.*, 2000). Receptor bývá aktivován i exogenními, a to synteticky připravenými glukokortikoidy. Z řad jedněch z nejvíce předepisovaných léčiv lze považovat dexametazon, beklometazon, betametazon a triamcinolon (Novotná *et al.*, 2012). Ty bývají voleny především pro jejich protizánětlivé nebo imunosupresivní účinky u astmatu, alergie, revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy a transplantace orgánů. Rovněž bývají předepisovány k léčbě rakoviny lymfoidního systému u leukémie, lymfomů a myelomů. Bohužel podávání glukokortikoidů nese i svou stinnou stránku. Jako negativní dopad na organismus by se dal považovat diabetes, glaukom, retardace růstu a hypertenze. Proto je více než žádoucí porozumět těmto faktorům na molekulární úrovni (Busill *et al.*, 2013; Miner *et al.*, 2005; Rhen *et al.*, 2005).

Existuje celé spektrum enzymů a proteinů, které jsou regulovány GR na transkripční úrovni. Jedná se o enzymy biotransformace především I. fáze, jako je CYP2B6; 2C9; 2C19; 3A5 a 3A4. Rovněž je tomuto receptoru podmíněna regulace některých dalších enzymů, jako jsou inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS), inducibilní cyklooxygenázy (COX-2), tyrosin aminotransferázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK), v neposlední řadě jsou regulovány cytokiny, chemokiny, kininy a jejich receptory (Newton, 2000). Některé z nich jsou upregulovány, jiné zase downregulovány. Výše zmíněný výčet je jen skromným zlomkem, neboť GR reguluje transkripci až 20 % genomu (Dvořák *et al.*, 2010; Galon *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2012)

V neaktivním stavu, tedy bez navázaného ligandu, je GR α lokalizován v cytosolu v komplexu se dvěma molekulami chaperonových proteinů (Hsp90 a hsp70) a FK506 vazebného proteinu (Pratt *et Toft*, 1997). Je-li receptor vystaven vazbě s glukokortikoidy, tak podstoupí sled konformačních změn, které zapříčiní disociaci s chaperony, dimerizaci receptoru a rovněž odкрытие jaderných lokalizačních signálů. V dalším kroku nastává nukleární translokace a vazba homodimeru do regulační sekvence cílových genů. Vazba je uskutečněna s glukokortikoidním responzivním elementem (GRE), což je pentadekametrická palindromická sekvence 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3', kde „n“ je náhodný nukleotid (Cairns *et al.*, 1991; Nordeen *et al.*, 1990). Aktivované GR selektivně rekrutují kofaktory, jako jsou SRC-1, TIF-2, p300/CBP. Toto seskupení nese charakter histonové acetyltransferázy, která po přidání acetylových skupin k histonům moduluje sbalenou DNA a umožní tak přístup RNA polymerázy II. Po odeznění signálu je GR degradován v cytosolu proteazom-ubikvitinovým systémem (Obr. 3) (Pávek *et Dvořák*, 2008).



Obr. 3: Schéma transkripční regulace exprese genů glukokortikoidním receptorem

Nakresleno podle Pávek *et Dvořák*, 2008

2.3 Alkaloidy

2.3.1 Definice a historie

Původní definice pojednává o alkaloidech jako o rostlinných, ryze přírodních, zásaditých, heterocyklických sloučeninách, které obsahují dusík a v mnoha případech mají farmakologicko-ekologický dopad (Aniszewski, 1994). Nicméně za posledních 200 let bylo učiněno mnoho objevů, na jejichž základě by bylo vhodné definici přeformulovat. S přihlédnutím k původu alkaloidů i z živočišné říše, uměle syntetizovaným nebo i k jejich existenci bez heterocyklu vyvstává spousta nesrovnalostí. Proto i v současné době je definice předmětem akademické diskuze (Bynum *et Porter*, 1994). Obtíže s definicí takto různorodé skupiny pocházejí i z podobnosti alkaloidů s jinými sloučeninami, jako jsou aminokyseliny, peptidy, nukleosidy, aminoglykosidy a antibiotika (Jakubke *et al.*, 1994).

Vznik názvu alkaloidy se datuje do roku 1819, kdy si německý lékárník W. Meißner, povšimnul společného „alkalického charakteru“ těchto sloučenin (Clayden *et al.*, 2001). I když došlo k izolaci prvního alkaloidu narkotinu už v roce 1803 (Wolley, 2001), člověk zneužívá tyto sloučeniny jako zdroje léčivých látek, jedů a lektvarů od nepaměti. Napříč historií se lidé setkávali s účinky alkaloidů již před zhruba 5000 lety, kdy byly u rituálních obřadů žvýkány listy koky na území Jižní Ameriky (Van Dyke *et Byck*, 1982). Téměř ze stejné doby, ale pro změnu ze starověkého Egypta, se dochovaly zmínky o léčivých účincích mléčného latexu z nezralých makovic (Bisset *et al.*, 1994). Svůj odkaz mají i ve středověku, kdy si evropské ženy kapaly do očí šťávu rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*) pro rozšíření zornic. Odtud se také dochovalo označení „bella-donna“, což v italském překladu znamená „krásná paní“. Alkaloidy mají v historii i své stinné místo. Byly zodpovědné za smrt řeckého filozofa Sokrata po požití bolehlavu. Tyto sloučeniny odpovídají za výše zmíněné fyziologické účinky byly izolovány v průběhu 19. a na počátku 20. století. Byly identifikovány jako stimulant kokain, analgetikum morfin, původce mydriázy atropin a za respirační selhání zodpovědný koniin (Bynum *et Porter*, 1994; Hendrickson *et al.*, 1970).

2.3.2 Výskyt a monitoring alkaloidů

Alkaloidy vystupují jako skupina s relativně hojným výskytem a celosvětovým pokrytím (Aniszewski, 1994). Běžně jsou situovány v krytosemenných rostlinách. Nezanedbatelný dopad na farmaceutický průmysl mají především blín, rulík a durman (čeleď lilkovitých), ocún a kýchavice (čeleď liliovitých), mák a vlaštovičník (čeleď makovitých) (Evans, 2009). Dokonce i u nahosemenných rostlin se najdou zástupci s léčivými účinky.

Paklitaxel z tisů, lykopodin z plavuní a palustrin z přesliček vystupují jako důležité činitele v boji proti rakovině. U hub jsou nechalně známé např. deriváty kyseliny lysergové z paličkovice nachové pro výrobu drog. Podobné sloučeniny se nacházejí i v živočišné říši. Zvláštní zájem je věnován extrémně toxickým kožním sekretům žab z čeledi pralesničkovitých. Sekrety obsahují neurotoxin batrachotoxin, který je 15x účinnější než kurare. Tuto strategii, jako obranu před predátory, si osvojili i někteří zástupci z řad brouků a motýlů (Evans, 2009; Wolley, 2001).

Miliardy lidí po celém světě jsou denně exponovány účinkům alkaloidů, ať už v podobě podaných léků nebo při konzumaci kávy a čaje. Na druhou stranu by bylo až na škodu nevyužít potenciál ukrývající se všude kolem. Proto je víc než potřebné věnovat značné úsilí monitoringu alkaloidních účinků (Aniszewski, 1994; Kutchan, 1995). Mnoho užitečných rostlin a živočichů se vyskytuje v nepřístupných částech světa, které jsou dány ať už neprostupným terénem nebo politickou situací. Některé potencionální zdroje alkaloidů nejsou vhodné k pěstování v laboratorních podmínkách nebo jen pomalu rostou (tis jako zdroj paklitaxelu). Někdy je požadovaný alkaloid přítomen pouze ve stopových množstvích (protirakovinový lék vinblastin z barvínku růžového) (Pelletier, 1983). Mnohdy žene vědce kupředu především touha po zisku léčiva bez vedlejších účinků (Wernsdorfer, 1994). Často volají po potřebě nových léčiv hrozby v podobě nových infekcí a rezistence mikroorganismů na stávající antibiotika. Z těchto a mnoha dalších důvodů je třeba přicházet s alternativními přístupy. Jedním takovým řešením by mohl být zisk uměle připravených alkaloidů cestou chemické syntézy (Aniszewski, 1994). Více bude o syntetických alkaloidech řečeno v kapitole 2.4. Syntetické alkaloidy a jejich syntéza.

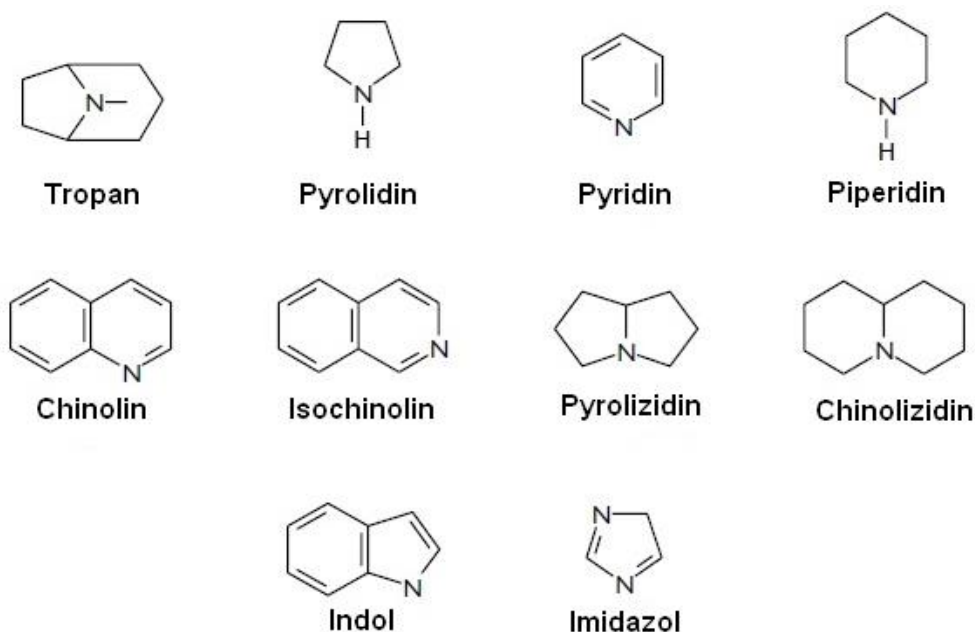
2.3.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jedná se o velice rozmanité sekundární biomolekuly, které nacházejí svůj základ v aminokyselinách nebo v komponentech účastnících se procesu transaminace (Dewick, 2002). Většina alkaloidů jsou dobře definované krystalické, zásadité, opticky aktivní, lipofilní látky, bez barvy a zápachu, ale hořké chuti. Za obvyčejného tlaku a při vyšších teplotách mají tendenci se rozkládat a většinou jsou prudce jedovaté. Kromě prvků uhlíku, vodíku a dusíku často alkaloidy obsahují i kyslík (Caron *et al.*, 1988; Manske, 1965). Nejčastěji se vyskytující struktury v alkaloidech jsou k vidění na obrázku 4. Na druhou stranu existuje i řada výjimek. Některé nízkomolekulární látky jako například koniin, nikotin a spartein jsou bez kyslíku, a tedy bez dárce vodíkové vazby. Z toho důvodu jsou za pokojové teploty kapalné. Ačkoliv

barevné alkaloidy jsou relativně vzácné, nejsou neznámé, například berberin je žlutý a soli sanguinarinu jsou měďnatě červené (Evans, 2009).

Jsou obvykle dobře rozpustné ve slabě polárních a nepolárních rozpouštědlech, a to konkrétně v alkoholu, chloroformu, etheru nebo jejich směsi. Také některá zásaditá organická rozpouštědla se nabízejí jako vhodná rozpouštědla alkaloidů (anilin, pyridin, piperidin) (Acamovic *et al.*, 2004; Woolley, 2001). Znalost rozpustnosti alkaloidů a jejich solí má značný farmaceutický význam, neboť jsou alkaloidní látky často podávány v roztoku. Na základě rozdílů v rozpustnosti je třeba volit i vhodný postup izolace alkaloidů z rostlin, a tím tak jejich oddělení od nealkaloidních složek (Evans, 2009).

Bazicitu alkaloidů je dána volným elektronovým párem na jejich atomech. Alkaloidy sice mohou existovat jako volné báze, ale ve většině případů vystupují jako soli. Soli vznikají po vazbě volného elektronového páru atomu N s H^+ některé karboxylové kyseliny jako například šťavelové, jablečné, vinné, maleinové a mléčné. Rovněž se mohou párovat s minerálními kyselinami, jako je kyselina chlorovodíková nebo sírová. V tomto případě jsou sloučeniny rozpustné ve vodě a jen mírně rozpustné v organických rozpouštědlech. Z tohoto důvodu je strychnin hydrochlorid mnohem více rozpustný ve vodě než jeho strychninová báze (Evans, 2009; Pelletier, 1983).



Obr. 4: Nejčastěji se vyskytující struktury v alkaloidech

Vytvořeno podle Wolley, 2001

2.3.4 Farmakologické účinky

Alkaloidy nabízejí široké spektrum biologických aktivit a níže zmíněné aplikace jsou jen špičkou ledovce. Některé další jsou k vidění v tabulce I. Tyto sloučeniny významně participují v klinické praxi. Jako jedno z možných uplatnění se nabízí využití těchto sloučenin jako histologických regulátorů metabolismu. Alkaloidy interagují s receptorem Na⁺ kanálu, a tak svým navázáním na receptor regulují tok iontů. Možným využitím se nabízí léčba srdeční arytmie v případě blokace těchto kanálů ajmalinem (Wolpert *et al.*, 2005).

Jiným přístupem je regulace mikrotubulů dělicího vřeténka. Alkaloidy vinblastin a vinkristin jsou zodpovědné za poškození těchto komponentů. Na základě toho dochází k přerušení mitózy během metafáze. Existuje mnoho aplikací této interakce, především v léčbě Hodgkinovy choroby a rakoviny (Wink, 2007).

Alkaloid berberin reguluje mikrobiální aktivitu inhibicí esteráz stejně jako DNA a RNA polymeráz. Navíc inhibuje buněčné dýchání a interkaluje se do DNA. Jeho uplatnění se nabízí i při léčbě AIDS, protože inhibuje HIV-1 reverzní transkriptázy (Spence *et al.*, 1995).

Jiným přístupem v léčbě bývá antagonismus s adenosinovými receptory. Za normálních podmínek po interakci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) se svými receptory dojde k inhibici nervových signálů a dilataci krevních cév mozku. Navázáním kofeinu a theobrominu na adenosinové receptory dochází k efektu přesně opačnému, tedy ke stimulaci CNS a zvýšení průtoku krve. Tímto principem je léčena například Parkinsonova choroba (Franco *et al.*, 2013; Palacios *et al.*, 2012).

Chinin a chinidin vystupují jako inhibitory syntézy nukleových kyselin na základě interkalace do DNA. Rovněž atakují ATPázy, čímž dochází k potlačení patogenu zimničky tropické. Tato antimalarika bývají v současnosti nahrazována syntetickými analogy pro menší dopad na organismus v podobě vedlejších účinků (Mihaly *et al.*, 1987; Muñoz *et al.*, 1996).

Tab. I: Alkaloidy aplikované v medicíně

Skupina léčiv	Biologický účinek	Název alkaloidu
Afrodiziakum	Povzbuzení libida	Yohimbin
Analgetikum	Tlumení bolesti	Kodein, Morfin
Anestetikum (lokální)	Znecitlivění v místě aplikace	Kokain, Lolin
Anthelmintikum	Eliminace helmintů (červů)	Arekolin, Harmalin
Antiarytmikum	Upravení srdeční činnosti	Chinidin, Chinin
Antibiotikum	Zabránění množení nebo eliminace mikroorganismů	Berberin, Kanthin-6-on
Antiemetikum	Potlačení zvracení	Hyoscyamin, Skopolamin
Antihypertenzivum	Snížení krevního tlaku	Cevadin, Reserpin, Rubijervin, Serpentin, Veratrin
Antimalarikum	Zabránění množení nebo eliminace prvoků způsobujících malárii	Alstonin, Berberin, Chinin
Antitusikum	Tlumení suchého kašle	Kodein, Narkotin
Antivirotikum	Zabránění množení nebo eliminace virů	Castanospermin, Dendrobin, Kalystegin
Diaforetikum	Uspadnění pocení	Akonitin
Diuretikum	Zvýšení diurézy (vylučování)	Chelerythrin, Spartein
Emetikum	Vyvolání zvracení	Emetin
Hypnotikum	Navození spánku	Skopolamin
Oftalmologikum	Zúžení zornice, snížení nitroočního tlaku	Fysostigmin, Pilocarpin
Sedativum	Uvolnění, uklidnění, ztráta strachu	Reserpin, Serpentin
Spasmolytikum	Relaxace hladkého svalstva	Papaverin, Tubokurarin
Sympatolytikum	Inhibice centrálního nervového systému	Reserpin, Serpentin
Sympatomimetikum	Stimulace centrálního nervového systému	Cathin, Efedrin, Kofein, Kokain, Lobelin
Léčba		Název alkaloidu
Alzheimerova choroba		Galantamin
Amébová úplavice		Emetin, Konessin
Impotence		Papaverin
Migréna		Ergotamin
Parkinsonova choroba		Tigloidin
Rakovina		Ellipticin, Baccatin, Maytansin, Vinblastin, Vinkristin, Kamptotecin, Demekolcin, Paklitaxel
Revmatismus		Akonitin, Kolchicin
Poporodní krvácení		Ergometrin, Palustrin

Tabulka byla vytvořena podle Wolley, 2001 (skupina léčiv, profylaxe a název alkaloidu); Aniszewski, 1994 (biologický účinek)

2.3.5 Klasifikace

Odhady hovoří přibližně o 30 000 známých alkaloidech, které vykazují obrovskou různorodost (McMurry, 2010). V důsledku toho bývá akceptováno hned několik systémů klasifikace (Evans, 2009). V širším hledisku mohou být sloučeniny hodnoceny z pohledu chemické struktury (podle heterocyklického systému) a biosyntetické dráhy (podle aminokyselinového prekurzoru). Pokud nejsou tyto poznatky prozatím známy, přihlíží se i k jejich podobnosti se známými sloučeninami z pohledu biologické a ekologické aktivity nebo k jejich původu v přírodě (Pelletier, 1983; Woolley, 2001). Přesto je vždy důležité zjistit o daném alkaloidu co nejvíce, neboť podobné alkaloidy mohou mít zcela odlišné biosyntetické dráhy a různé biologické dopady (Aniszewski, 1994). Alkaloidy jsou rozdělovány na tři hlavní typy a to na pravé alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy. Pravé alkaloidy jsou odvozeny od aminokyseliny a sdílejí heterocyklický kruh s dusíkem. V protoalkaloidech je dusík původem z aminokyselin také přítomen, ale není součástí heterocyklu. Pseudoalkaloidy jsou sloučeniny, u nichž základní uhlíková kostra není odvozena od aminokyselin, ale z jejich prekurzorů nebo postkurzorů. Mohou také vyplývat z aminačních i transaminačních reakcí. Stejně tak může být tento typ alkaloidů odvozen od neaminokyselinových prekurzorů, jako je tomu u steroidních nebo terpenoidních struktur (Jakubke *et al.*, 1994; Dewick, 2002). Základní principy klasifikace jsou naznačeny v tabulce II. Syntetické alkaloidy mohou být klasifikovány na základě výše zmíněných pravidel nebo jim může být přisuzována samostatná skupina (Aniszewski, 1994).

Tab. II: Klasifikace alkaloidů

Typ alkaloidu	Prekurzor	Skupina alkaloidu	Název alkaloidu
Pravé alkaloidy	Ornitin	Pyrolidinové	Hygrin, Kuskohygrin
		Tropanové	Atropin, Hyoscyamin Kokain, Skopolamin
		Pyrolizidinové	Europin, Homospermidin, Meteloidin, Retronecin
	Lysin	Piperidinové	Anaferin, Lobelin, Piperidin, Piperin Sedamin
		Chinolizidinové	Cytisin, Lupanin, Spartein
	Tyrosin	Isochinolinové	Anhalamin, Tyramin
		Tetrahydro- isochinolinové	Kodein, Morfin, Norkoklaurin, Papaverin, Tetrandrin, Thebain, Tubokurarin

Typ alkaloidu	Prekurzor	Skupina alkaloidu	Název alkaloidu
Pravé alkaloidy	Tyrosin/ Fenylalanin	Fenylethyl- isochinolinové	Autumnalin, Crinin, Galantamin, Galantin, Lykorin, Maritidin, Oxomaritidin, Vittatin
	Tryptofan	Indolové	Ajmalicin, Harmin, Psilocin, Tryptamin
		Chinolinové	Brucin, Cinchonidin, Chinidin, Chinin, Chlorochin, Strychnin
		Námelové	Ergobin, Ergokryptin Ergotamin
	Histidin	Imidazolové	Pilokarpin, Pilosin
	Arginin	Karbolinové	Saxitoxin, Tetrodotoxin
	Antranilová kyselina	Chinolizidinové	Peganin
		Chinolinové	Bucharin, Diktamin, Flindersin, Haplopin, Perforin, Skimianin
		Akridinové	Akronycin, Rutakridon
	Nikotinová kyselina	Pyridinové	Anabasin, Evolin. Evonolin, Evorin, Kassinin, Nikotin, Regelidin, Wilforin
Protoalkaloidy	Tyrosin	Fenylalkylaminové	Hordenin, Meskalin
	Tryptofan	Terpenoidní indolové	Yohimbin
	Ornitin	Pyrolizidinové	4-hydroxystachydrin, Stachydrin
Pseudoalkaloidy	Octová kyselina	Piperidinové	Koniin, Pinidin
	Pyruvátová kyselina	Fenylalkylaminové	Efedrin, Kathin, Kathinon
	Ferulová kyselina	Fenylalkylaminové	Kapsaicin
	Geraniol	Terpenové	Aktinidin, Akonitin, Atisin
	Saponiny	Steroidní	Cyklopamin, Cholestan, Jervin, Konessin, Solanidin, Tomatidin
	Adenin	Purinové	Kofein, Teobromin, Teofylin

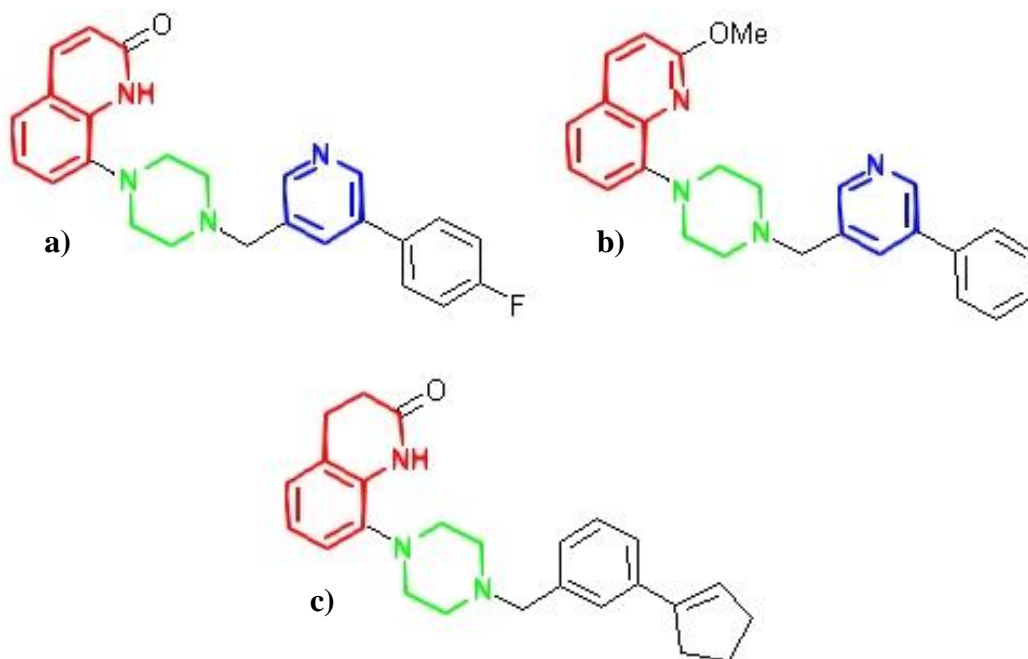
Tabulka byla vytvořena podle Aniszewski, 1994

2.4 Syntetické alkaloidy a jejich syntéza

V uplynulých čtyřiceti letech zaznamenaly syntetické studie mnoho inovací. Díky široké škále moderních metodik a nových činidel se organická syntéza stále posunuje vpřed ať už v oblasti syntézy léčiv, přírodních látek nebo komplikovaných struktur pro materiálovou chemii (Svoboda, 2000). Obecně by se dal rozvoj přisuzovat diktovaným potřebám společnosti, hospodářství či ekonomiky. Konkrétně lze zmínit snahu vyrábět vysoce a rychle působící substance, které selektivně působí na buněčné kompartmenty v množství, na které příroda nestačí. Dále lze zmínit také hledání méně pracných, lacinějších, ekologicky nezávadných a energeticky méně náročných syntéz (Liška, 1993; Sáenz *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Pro získání žádané aktivity nově syntetizovaných alkaloidů se organická syntéza opírá o strategie již dříve formulované. Při konstrukci se vychází z doposud známých poznatků dříve syntetizovaných struktur, struktur cílových receptorů nebo stále častěji i z hodnoty EC_{50} , což je koncentrace agonisty, při které je dosaženo 50 % maximálního efektu léčiva (E_{max}) (Dascombe *et al.*, 2007).

U komplexnějších struktur se využívá tzv. retrosyntetické analýzy. Jedná se o postup, o němž by se dalo hovořit jako o virtuální syntéze, kdy se postupuje od cílové sloučeniny (která má být syntetizována) směrem k výchozí látce. Ve výsledku je docíleno získání fragmentů (tzv. syntonů). Tyto dílčí syntony slouží jako stavební kameny a rovněž na jejich základě může být predikován charakter nově syntetizované sloučeniny (Liška, 1993). Principu bylo užito i v této práci při stanovení možných účinků testovaných sloučenin (Obr. 5). U všech těchto uměle syntetizovaných sloučenin se ve struktuře vyskytuje společný chinolinový, pyridinový a piperazinový heterocyklus. Tento poznatek byl využit při predikci možných vlastností testovaných sloučenin. Z toho důvodu bude v následujících kapitolách 2.4.1 Chinolinové deriváty, 2.4.2 Pyridinové deriváty a 2.4.3 Piperazinové deriváty věnována pozornost pouze sloučeninám, které tento heterocyklus obsahují. Takto vzniklý sumář biologických vlastností slouží jako teoretický návrh možných aplikací. Ovšem reálnost hypotéz je vždy nutné laboratorně verifikovat.



Obr. 5: Testované sloučeniny

Ve sloučeninách byly identifikovány tři společné heterocykly: chinolin (červeně), pyridin (modře) a piperazin (zeleně). **a)** KST-35 - 8-(4-((5-(4-fluorofenyl)pyridin-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)chinolin-2(1H)-on **b)** KST-41 - 2-methoxy-8-(4-((5-fenylpyridin-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)chinolin **c)** KAC-59-F - 8-(4-(3-(cyklopent-1-en-1-yl)benzyl)piperazin-1-yl)-3,4-dihydrochinolin-2(1H)-on

2.4.1 Chinolinové deriváty

Přírozně chinolinové alkaloidy obsahuje například keř rostoucí v tropické Americe *Galipea officinalis Hancock*, který si našel místo v lidovém léčitelství. Působí jako antipyretikum (proti horečce), antikonvulzivum (proti křečím) a rovněž pomáhá díky zklidňujícím účinkům při podráždění kůže. Z tohoto keře bylo získáno několik chinolinových alkaloidů, z nichž mezi nejvíce důležité patří galipin a kusparin (Rakotoson *et al.*, 1998). Plody *Evodia officinalis* se tradičně používají v korejské lidové medicíně pro tlášení bolesti při potížích zažívacího traktu, při poporodním krvácení a menstruaci. Důvodem jsou opět chinolinové alkaloidy, a to evokarpin a evodiamin. Kromě toho chinolinové alkaloidy z rodiny *Haplophyllum*, jako je skimianin, mají sedativní, hypotermické a antidiuretické využití (Aniszewski, 1994). Právě tyto biologické účinky a mnoho dalších, z nichž některé budou zmíněny v následující části této kapitoly, přilákaly množství pozornosti v oblasti lékařské chemie. V současné době jsou léčiva obsahující chinolinovou kostru jedněmi

z nejvíce privilegovaných přístupů v medicíně vůbec. Z toho důvodu bylo vyvinuto značné úsilí pro rozvoj syntetických metod těchto struktur (Wu *et al.*, 2013).

Největší potenciál chinolinových derivátů se ukrývá v boji proti malárii. Poté, co jsou infikovány erythrocyty hostitele, nastávají periodické záchvaty doprovázené horečkou, pocením, anémií a v případě nejvíce patogenního *Plasmodium falciparum* i smrtí (Fendrich, 2005). Prvním léčivem proti malárii byl bezpochyby chinin (Obr. 6a) získaný z kůry chinovníků. Je to účinná látka proti všem druhům prvoků *Plasmodium* způsobující malárii. Avšak z důvodu nemalého počtu vedlejších účinků bylo snahou nalézt vhodnější léčivo cestou chemické syntézy (Wernsdorfer, 1994). Možným řešením se nabízel objev některých 4- a 8-aminochinolinů (Dascombe *et al.*, 2007; Nevin, 2014). Po jejich objevu byly léčivé účinky chininu zastíněny, ale s příchodem rezistentních forem *Plasmodium* byla důležitost chininu opět zúročena. Proto je dnes chinin nejčastější inspirací při chemické syntéze chinolinových derivátů (Foley *et al.*, 1998). Z řad antimalarik bývá používán ze skupiny 4-aminochinolinů např. chlorochin atakující syntézu DNA parazita. Ze skupiny 8-aminochinolinů se jedná například o primachinin inhibující respirační řetězec (Francis *et al.*, 1997). Bohužel zmíněné skupiny antimalarik nesou nežádoucí účinky v podobě závratí, ztráty rovnováhy, nystagmu nebo fotofobie často jako důsledek degenerace neuronů (Nevin, 2014). S přihlédnutím k nežádoucím účinkům a rezistentním kmenům *Plasmodium* je důležitý monitoring biologické aktivity alkaloidů. Možnou dobře snesitelnou a účinnou alternativou by mohl být nově syntetizovaný 4-aminochinolinový derivát, jako je N^1 -(7-chloro-chinolin-4-yl)-2-methyl-propan-1,2-diamin (Obr. 6b) (Sáenz *et al.*, 2012).

Mezi antibakteriálními léky jsou chinolinové deriváty opět jedny z nejdůležitějších. V jejich řadách je snahou nalézt sloučeniny i proti agresivním onemocněním, vykazující mnohočetnou lékovou rezistenci, jako je například tuberkulóza způsobená bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (Dye *et al.*, 2010). Kromě toho jsou podávány u pacientů s AIDS, jejichž imunita je potlačena a jsou velmi citliví na oportunní mikrobiální infekce. V dnešní době se dává prostor především 3-karboxy-6-fluoro-4-chinolinovým derivátům, jako jsou norfloxacin (Obr. 6c), pefloxacin a ciprofloxacin (Gómez *et al.*, 2013). Právě tento typ chinolinů se významně podílí na inhibici syntézy štěpením bakteriální DNA v DNA-enzymových komplexech typu DNA gyrázy (topoizomeráza II) a topoisomerázy IV. Dalším zajímavým antibiotikem je delafloxacin, který je nyní v klinickém vývoji, a zdá se, že má vhodný profil proti mnoha chinolinu rezistentních gram-pozitivních i gram-negativních bakterií (Desai *et al.*, 2012).

U nejčastější formy cukrovky, tedy diabetes mellitus 2. typu (T2DM), je společným rysem nedostatečná citlivost tkání k účinkům inzulínu. Na základě toho je snížena schopnost absorpce glukózy. Tato forma cukrovky může korelovat s poškozením orgánů, slepotou a dokonce smrtí (Ikuma *et al.*, 2015). Po požití jídla je ze střeva exkretován glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1). GLP-1 stimuluje biosyntézu inzulínu a tím přispívá k normalizaci hladiny glukózy (Mest *et Mentlein*, 2005). Nicméně aktivní GLP-1 je rychle degradován dipeptidylpeptidázou IV (DPP-4). Inhibicí DPP-4 by byla udržena příslušná úroveň aktivního GLP-1 v plazmě, což by stimulovalo sekreci inzulínu. V současné době existuje celá řada antidiabetik, jako jsou např. agonisté γ receptoru aktivovaného proliferátory peroxizomů (PPAR γ), deriváty sulfonylurey a α -glukosidázové inhibitory. Ty vytvářejí příznivé účinky u pacientů s T2DM cestou efektivního zvýšení sekrece inzulínu nebo snížením množství glukózy v krevním řečišti. Tyto látky jsou však často spojovány s nežádoucími vedlejšími účinky včetně hypoglykémie, obezity a poruch zažívacího traktu. Výsledky ukázaly, že DPP-4 inhibitory na bázi 3H-imidazo[4,5-c]chinolin-4(5H)-onů (Obr. 6d) jsou účinnější a bezpečnější než konvenční antidiabetika (Gwaltney, 2008; Pei, 2008).

V rámci chinolinových derivátů byly testovány syntetické isoxazolyl pyrimido[4,5-b]chinoliny (Obr. 6e), které nacházejí mnohostranné uplatnění. Byly aplikovány proti edémům indukovaných karagenovou injekcí u myši. Některé sloučeniny vykazovaly výbornou protizánětlivou aktivitu, doprovázenou zmenšením otoku. Jiné sloučeniny z této skupiny prokázaly významný analgetický účinek, který byl dokonce vyšší než u referenčního léčiva indomethacinu (Rajanarendar *et al.*, 2012). Možným vysvětlením by mohla být inhibice prostaglandin E syntáz (PGES) jakožto enzymů v biosyntéze prostaglandinu E₂ (PGE₂). Ten vystupuje jako lipidový mediátor v různých buňkách a tkáních. PGES jsou rozděleny do tří izoform, z nichž mikrozomální PGE-1 jsou upregulovány prozánětlivými podněty, jako je například interleukin IL-1 β a faktor nádorové nekrózy (TNF- α). Bylo prokázáno, že příznaky řady zánětlivých onemocnění, jako je např. artritida, mohou být signifikantně sníženy supresí PGE₂. Tento fakt byl potvrzen na modelu mPGES-1 knockoutovaných myši. Inhibicí PGE-1 je dosažena absence PGE₂, kvůli níž nedochází ke stimulaci receptorů bolesti ani k prozánětlivým podmětům (Shiro *et al.*, 2015).

V současné době se o inhibitech především 5. rodiny fosfodiesteráz (PDE5) uvažuje jako o významném elementu v procesu učení a paměti. V případě zvýšení hladiny cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) dochází k nárůstu synaptické transmise v centrální nervové soustavě (Lu *et al.*, 1999). Proto se inhibitory PDE5 nabízejí jako slibný prostředek léčby

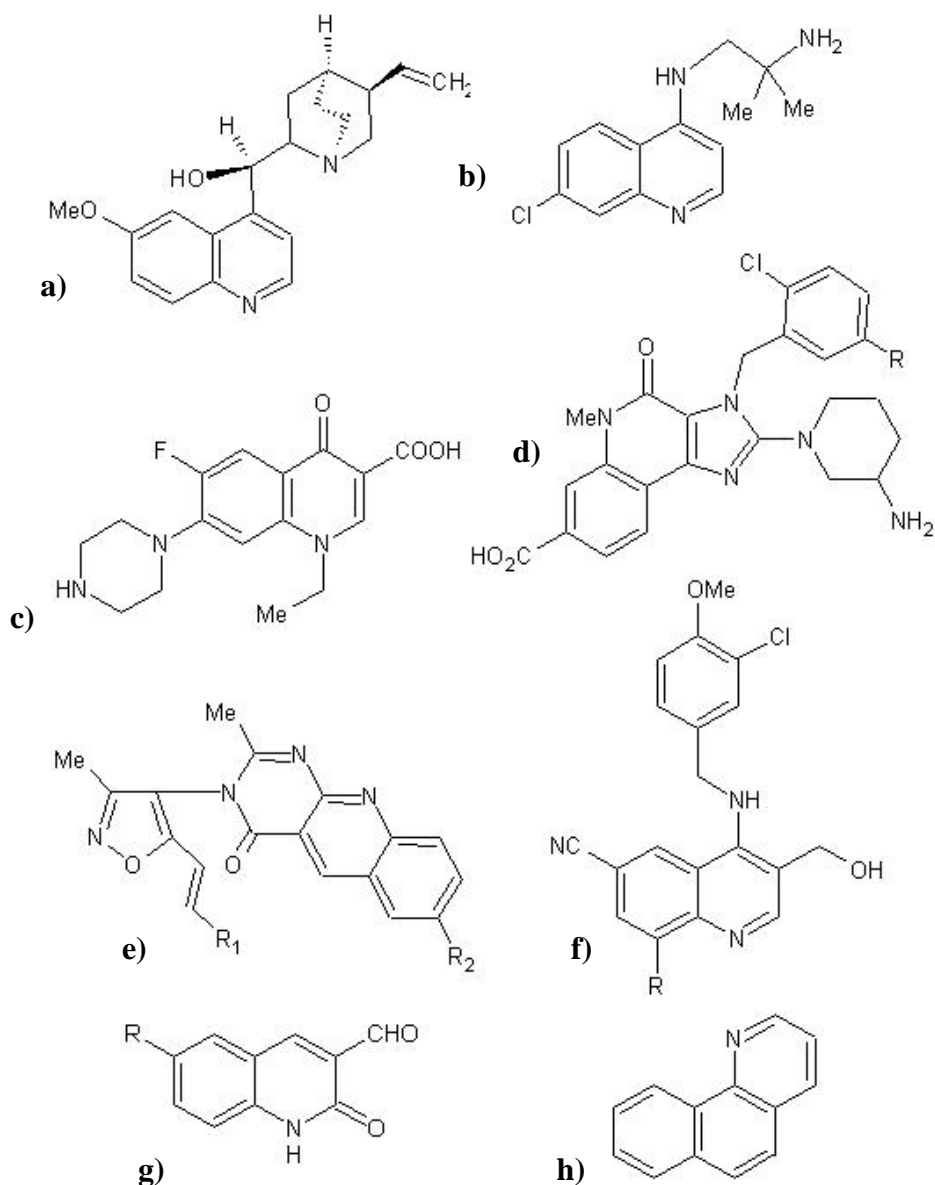
Alzheimerovy nemoci a jiných neurodegenerativních chorob. Tento fakt byl prověřován sérií syntetických chinolinových derivátů. Díky myšim modelu byly 4-[(3-chloro-4-methoxybenzyl)amino]-3-(hydroxymethyl)chinolin-6-karbonitrily (Obr. 6f) s variabilními substituenty v poloze C-8 stanoveny jako silné inhibitory PDE5. Jejich účinnost byla větší než u komerčně dostupných inhibitorů sildenafilu a vardenafilu (Fiorito *et al.*, 2013).

Chinolinové deriváty hrají důležitou roli i v boji proti volným radikálům. Ty vznikají při metabolických procesech jako vedlejší produkt látkové výměny v buňkách. Nejreaktivnější volné radikály jsou původem z molekuly kyslíku (ROS), které obsahují nepárový elektron. Tyto radikály interagují se svým prostředím ve snaze vytvoření elektronového páru, a tak získu stability. Bohužel tato interakce koreluje s procesy stárnutí, karcinogeneze a aterogeneze (Tyagi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013). V dnešní době jsou naděje na prevenci a případnou léčbu vkládány do derivátů 2-oxo-chinolin-3-karbaldehydu (Obr. 6g). Nemalá část testovaných sloučenin snižovala aktivitu ROS a dokonce v některých případech byly účinnější než komerčně dostupný antioxidant butylovaný hydroxytoluen (Zhang *et al.*, 2013).

Na druhou stranu ne vždy hraje chinolin ve sloučenině kladnou úlohu. Byla zkoumána interakce mezi AhR a aza-tricyklickými aromatickými sloučeninami, jako jsou 1,7-fenantrolin benzo[f]chinolin a benzo[h]chinolin (Obr. 6h) (Saeki *et al.*, 2003). Jedná se o sloučeniny mající strukturální podobnost s karcinogenem fenantrenem, který se dostává do ovzduší z průmyslových pecí, výfukových plynů a cigaret (Sogawa *et Fujii-Kuriyama*, 1997). V případě těchto aza-substituovaných derivátů bylo prokázáno až desetinásobné zvýšení aktivity AhR oproti samotnému fenantrenu. Testované sloučeniny byly sledovány i vzhledem k jejich halogenaci. Zde byla aktivace receptoru zvýšena i v řádu stonásobků vzhledem k počtu, poloze a typu samotného substituentu (Cl, Br, F). Aktivita ligandu byla přímo úměrná zvyšujícímu se počtu především Cl a Br atomů ve sloučenině (Saeki *et al.*, 2003). I některá antimalarika byla testována pro případnou aktivaci AhR. Jako hlavní induktory CYP1A1/2B byly stanoveny aminochinoliny, jako jsou amodiachinin a až s 12-ti násobně vyšší indukcí primachin (Fontaine *et al.*, 1998). Jak bylo naznačeno dříve, indukce specifických cytochromů P450 může urychlit metabolismus podaných léčiv a touto interakcí tak dochází ke snížení farmakologického účinku (Spatzenegger *et Jaeger*, 1995). Na druhou stranu o výše zmíněných CYP je známo, že hrají důležitou roli v aktivaci chemických látek na reaktivní mutageny a karcinogeny (Fontaine *et al.*, 1998).

Prednisolon a dexamethazon jsou účinné glukokortikoidy při léčbě zánětlivých onemocnění. Bohužel vynikají i vedlejšími účinky, jako je osteoporóza a hyperglykémie.

Z toho důvodu je dáván prostor tetrahydrochinolinovým agonistům GR. Bylo zjištěno, že po interakci s GR dochází k transrepresi, tedy k potlačení transkripce, čímž je modulována aktivita zánětlivých mediátorů včetně NFκB a AP-1. V tomto případě byl otok indukovaný karagenovou injekcí plně eliminován po 3 hodinách (Hudson *et al.*, 2011).



Obr. 6 : Vybrané chinolinové deriváty

Pokud je sloučenina zažita pod triviálním názvem, tak je uveden. Rovněž se mnoho substancí nachází ve fázi laboratorních nebo klinických testů, proto je užito i systematické názvosloví. Pokud vzorec reprezentuje více sloučenin, tak písmeno R symbolizuje variabilní substituenty: **a)** chinin **b)** N^1 -(7-chloro-chinolin-4-yl)-2-methylpropan-1,2diamin **c)** norfloxacin **d)** 3H-imidazo[4,5-c]chinolin-4(5H)-ony **e)** isoxazolyl-pyrimido[4,5-b]chinoliny **f)** 4-[(3-chloro-4-methoxybenzyl)amino]-3-(hydroxymethyl)chinolin-6-karbonitrily **g)** 2-oxo-chinolin-3-karbaldehydy **h)** benzo[h]chinolin

2.4.2 Pyridinové alkaloidy

Z pyridinových alkaloidů se do lidského povědomí nejvíce zapsal nikotin (Obr. 7a). Nikotin byl pojmenován podle latinského názvu rostliny tabáku *Nicotiana tabacum*, jejímž je hlavním alkaloidem. Těžko říci, jak daleko do historie sahá užívání tabáku, avšak kouření tabákového listí zavedli američtí indiáni. Pozornosti se mu dostávalo ať už při náboženských obřadech nebo při léčbě všech tehdejších neduhů (Aniszewski, 1994). V současné době nám nikotin ukazuje dvě tváře. Bezpochyby je to silný jed, který při dávce 60 mg může usmrtit člověka. Pro své agresivní účinky bývá prominentní složkou některých insekticidů. Rovněž je hlavním faktorem zodpovědným za těžkou závislost na kouření (Mayer, 2014; Rogers *et al.*, 2004). Na druhou stranu celá řada vědeckých publikací pojednává o negativní korelaci mezi kouřením a nemocemi, jako je schizofrenie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Fratiglioni *et Wang*, 2000; Chambers, 2009). I když je v cigaretovém kouři kromě nikotinu obsaženo přibližně 4700 dalších sloučenin, byl stanoven jako hlavní biologicky aktivní látka (Benowitz, 1996). Z tohoto důvodu je otevřena cesta vědcům při hledání požadovaných účinků nikotinu, jeho analogů, ale i jiných pyridinových derivátů.

Podanou rukou kuřákům při odvykací kúře by se v budoucnu mohl stát alkaloid ze štědrince odvislého (*Laburnum anagyroides*). Tento keř, běžně známý jako zlatý dešť, obsahuje cytisin. Nové klinické testy říkají, že pro odvykání je mnohem vhodnější než populární nikotinové náplasti a žvýkačky. Cytisin vystupuje jako parciální agonista, který dovede blokovat nikotinové acetylcholinové receptory. Léčba může být doprovázena nežádoucími účinky v podobě nevolnosti a poruch spánku. Přesto se předpokládá, že třetinová cena oproti terapii na bázi nikotinu a vyšší pravděpodobnost ve zbavení se kuřácké závislosti, budou dostatečně atraktivní pro poptávku na trhu (Rigotti, 2014).

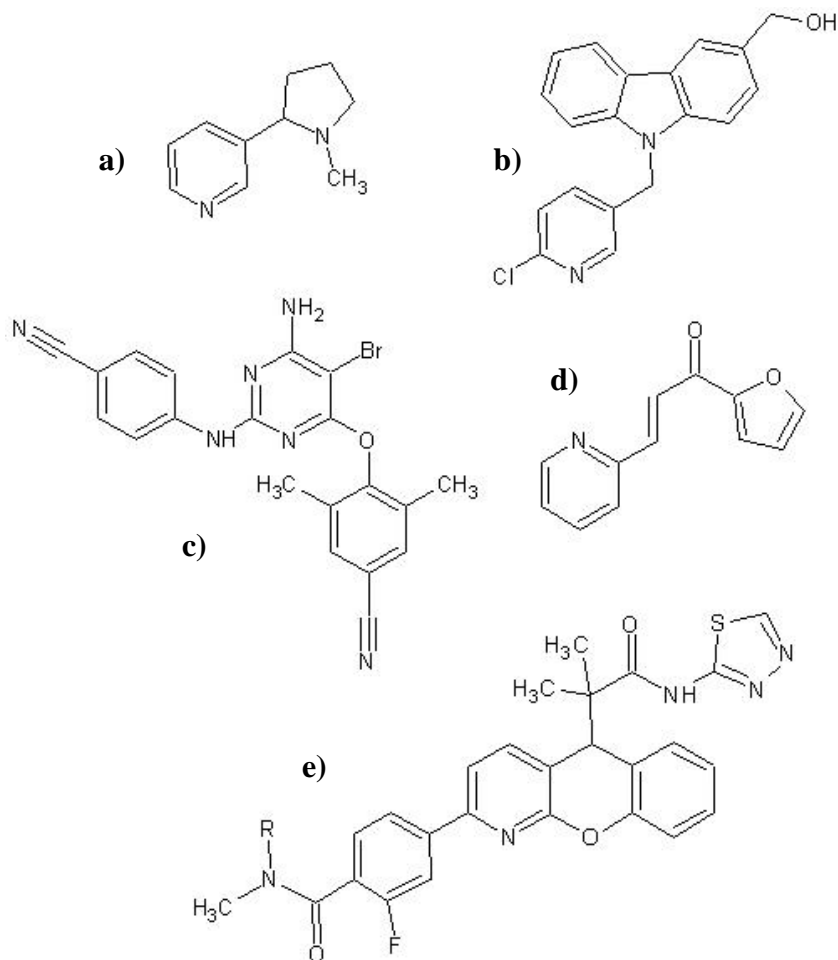
Schopnost karbazolových alkaloidů selektivně inhibovat růst nádoru byla již dříve uvedena u rakoviny plic, tlustého střeva a leukémie (Engler *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Riou *et al.*, 2002). Nově nalezenou odpovědí v boji proti rakovině prsu by mohl být syntetický karbazolový derivát 9-[(6-chloropyridin-4-yl)methyl]-9H-karbazol-3-karbinol (Obr. 7b). Tato sloučenina byla testována na buněčné linii lidského karcinomu prsu MCF-7. Ošetření buněčné kultury korelovalo se zastavením buněčného cyklu v S fázi a se zvýšením p53 jako proapoptického faktoru. Rovněž došlo i ke snížení cyklinu D1, A a cyklin dependentní kinázy 2 (CDK2), tedy důležitých regulátorů potřebných k přechodu do G2 fáze (Liu *et al.*, 2013).

Současná léčba viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) volá po nových zdrojích farmaceuticky aktivních látek, především z důvodu vysokého mutačního potenciálu, a tak vzniku rezistence na stávající léčiva (Fauci, 2007). Poměrně účinnou strategií jsou nekompetitivní alosterické inhibitory reverzní transkriptázy, které atakují syntézu řetězce DNA potřebného k integraci do genetického materiálu buňky. Krystalografická studie prokázala vazbu mimo aktivní místo, čímž je zapříčiněna konformační změna vedoucí k inaktivaci reverzní transkriptázy (Esnouf *et al.*, 1995; Spence *et al.*, 1995). K dnešnímu dni bývá pro klinické užití voleno několik léčiv s pyridinovým jádrem, jako je efavirenz, nevirapin, etravirin (Obr. 7c) a rilpivirin. V případě vysoce rezistentních kmenů HIV bývají upřednostňovány poslední dvě zmíněné látky (Li *et al.*, 2013; Schiller *et al.*, 2009).

Již dříve syntetizovaná sloučenina 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenon (FPP-3) (Obr. 7d) byla označena jako protizánětlivé činidlo. Nicméně novější studie pojednávají i o jejím chemopreventivním vlivu proti 7,12-dimethylbenz[a]antracenu (DMBA). DMBA vystupuje jako silný karcinogen, který má tendenci se kovalentně vázat do DNA a tvořit tak DNA adukty zodpovědné za iniciaci rakoviny. Možné mechanismy chemoprevence zahrnují buď inhibici cytochromů P450 jakožto enzymů zodpovědných za vznik ještě více reaktivních metabolitů nebo indukci enzymů II. fáze biotransformace (Kleiner *et al.*, 2002; Slaga *et al.*, 1979). FPP-3 splňoval obojí, neboť byla prokázána downregulace cílových enzymů AhR především CYP1A1 a CYP1B1 sníženou nukleární translokací receptoru. Rovněž byla zvýšena exprese enzymů GST (Hwang *et al.*, 2008).

Byly identifikovány nové selektivní modulátory GR jako 5H-chromeno[2,3-b]pyridiny (Obr. 7e). Právě tyto sloučeniny se ukázaly jako hlavní činitelé v transrepressi prozánětlivých transkripčních faktorů. Důsledkem je snížení GR závislých prozánětlivých mediátorů a cytokinů. Bylo prokázáno, že za jejich vysokou aktivitu srovnatelnou s prednisolonem zodpovídá halogenovaný fenyl vázaný na pyridin (Weinstein *et al.*, 2011).

Kortizol prostřednictvím aktivace GR spouští jaterní glukoneogenezi. Regulačním mechanismem je exprese 11- β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1 (11 β HSD1). Jedná se o enzym zodpovědný za konverzi neaktivního kortizonu na aktivní kortizol (Kotelevtsev *et al.*, 1997). Případná inhibice tohoto enzymu se jeví jako terapeuticky možný přístup v léčbě diabetu a jiných metabolických poruch. Byl identifikován silný inhibitor 11 β HSD1, tedy 4'-kyano-bifenyl-4-sulfo-(6-amino-pyridin-2-yl)-amid. Inhibice konverze byla úspěšná z 87 % (Bhat *et al.*, 2008).



Obr. 7 : Vybrané pyridinové deriváty

Pokud je sloučenina zažita pod triviálním názvem, tak je uveden. Rovněž se mnoho substancí nachází ve fázi laboratorních nebo klinických testů, proto je užito i systematické názvosloví. Pokud vzorec reprezentuje více sloučenin, tak písmeno **R** symbolizuje variabilní substituenty: **a)** nikotin **b)** 9-[(6-chloropyridin-4-yl)methyl]-9H-karbazol-3-karbinol **c)** etravirin **d)** 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenon **e)** 5H-chromeno[2,3-b] pyridiny

2.4.3 Piperazinové alkaloidy

Oproti pyridinovým a chinolinovým sloučeninám se piperazin se svými deriváty vyskytuje přirozeně v menším měřítku. Ovšem to neznamená, že by této skupině měla být věnována menší pozornost. Sloučeniny obsahující piperazin se nejvíce dostaly do lidského povědomí jako anthelmintikum, tedy jako prostředek proti helmintům (červům). V dnešní době je velká část tropických gastrointestinálních helmintů rezistentních proti přírodním piperazinům (Singh *et al.*, 2002). Právě kvůli menšímu výskytu v přírodních podmínkách a vznikající rezistenci je pozornost směřována k syntetickým analogům. Produkty chemické

syntézy se uplatňují jako nejrůznější inhibitory, o nichž je více pojednáno v následující části této kapitoly.

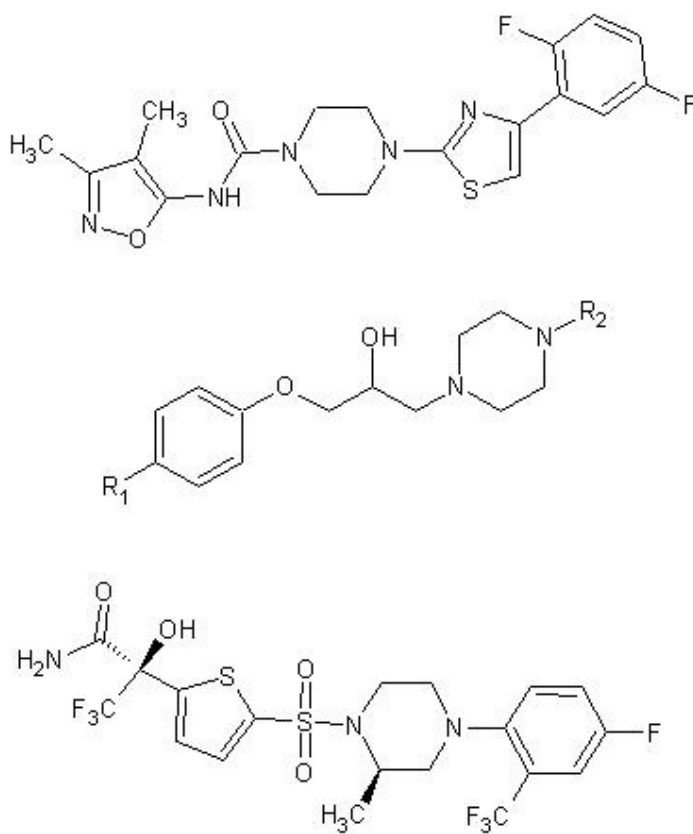
Možné využití piperazinových derivátů se nabízí u Chagasovy choroby. Ta je způsobena parazitickým prvokem *Trypanosomou cruzi*. Akutní onemocnění se projevuje většinou jen s mírnými příznaky. Pokud ovšem není infekce léčena, může dojít k poškození srdce, gastrointersticiálního traktu a dokonce ke smrti jedince. I když se jedná o onemocnění především Jižní a Střední Ameriky, jsou neustále hlášeny nové případy i z USA, Japonska a států Evropy (Keenan *et al.*, 2013). Rostoucí riziko podporuje i fakt, že neexistuje žádná účinná vakcína proti Chagasově nemoci. V dnešní době se užívají některá antimykotika, jako je benznidazol (Bern, 2011). Bohužel se jedná o dvouměsíční proceduru, která se nevyhne vedlejším účinkům. Pro zefektivnění léčby se nabízí 1-[fenyl(pyridin-3-yl)methyl]piperazinové deriváty fenarimolu. Na myším modelu byla po pěti dnech zaznamenána signifikantní redukce parazita (Keenan *et al.*, 2013). Možným vysvětlením se nabízí inhibice enzymu CYP51, který je důležitým faktorem v syntéze sterolů. Na základě toho dochází k narušení membránové fluidity a permeability parazita (Urbina, 2002).

Syntetické deriváty mohou sehrát svou roli i u endokannabinoidních neurotransmiterů, jako je např. anandamid a oleamid. Jedná se o ligandy schopné aktivovat kanabinoidní receptory 1 a 2 (CB1/2). Již dříve bylo zjištěno, že se CB1 účastní některých nežádoucích stavů, jako je bolest, úzkost, deprese a poruchy spánku. Na druhou stranu CB2 je vysoce exprimován v imunitních orgánech, jako je slezina a je rovněž zapojen v regulaci zánětlivé a imunitní odpovědi (Benito *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2010). Proto některé terapeutické přístupy uvažují o zvýšené aktivaci těchto receptorů jako o možném řešení těchto dysfunkcí. Z toho důvodu se inhibice amidhydrolázy mastných kyselin nabízí jako vhodná volba, neboť právě tento enzym hydrolyticky deaktivuje výše zmíněné neurotransmitery. K dnešnímu dni bylo testováno několik sloučenin jako inhibitory těchto amidhydroláz. Jednalo se o thiazolové sloučeniny obsahující piperazin. Největší aktivitu vykazoval 4-[4-(2,4-difluorofenyl)thiazol-2-yl]-N-(3,4-dimethylisoxazol-5-yl)piperazin-1-karboxamid (Obr. 8a). Prozatím byla sloučenina testována jako možné analgetikum, ale teoreticky by mohla být vhodná i jako řešení pro výše zmíněné dysfunkce (Kono *et al.*, 2013).

Sloučeniny obsahující piperazin nacházejí uplatnění i jako blokátory vápníkových kanálů. Na základě toho nedochází k influxu vápenatých iontů (Ca^{2+}) do buňky. Ta pak tedy není stimulována ke svalovému stahu nebo šíření nervového vzruchu. Jelikož jsou vápníkové kanály v těle všudypřítomné, může dojít k terapeuticky využitelným fyziologickým změnám (Clapham, 2007; Perez-Reyes, 2003). Proto selektivní blokátory vápníkových kanálů mohou

mít vysoký potenciál pro léčbu některých typů rakoviny, hypertenze, srdeční arytmie a poruch souvisejících s CNS, jako je například epilepsie. Rozvoj těchto blokátorů přišel relativně nedávno díky slibnému farmakokinetickému profilu 1-(2-hydroxy-3-fenoxypropyl) piperazinových derivátů (Obr. 8b) (Park *et al.*, 2013).

I piperazinové deriváty jsou stejně jako pyridinové angažovány ve vztahu inhibice 11β HSD1. Stejným mechanismem přes GR, jak bylo popsáno v předešlé kapitole, působí i piperazin sulfonamidy. I v tomto případě úspěšnost inhibice přesáhla 80 %. Pro svou vysokou buněčnou aktivitu a mikrozomální stabilitu se o (R)-3,3,3-trifluoro-2-(5-(((R)-4-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)fenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)thiofen-2-yl)-2-hydroxypropanamidu (Obr. 8c) uvažuje jako o vhodném kandidátovi pro klinickou praxi (Wan *et al.*, 2012).



Obr. 8 : Vybrané piperazinové deriváty

Pokud vzorec reprezentuje více sloučenin, tak písmeno R symbolizuje variabilní substituenty:

a) 4-[4-(2,4-difluorofenyl)thiazol-2-yl]-N-(3,4-dimethylisoxazol-5-yl)piperazin-1-karboxamid **b)** 1-(2-hydroxy-3-fenoxypropyl)piperazinové deriváty **c)** R)-3,3,3-trifluoro-2-(5-(((R)-4-(4-fluoro-2-(trifluoromethyl)fenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)thiofen-2-yl)-2-hydroxypropanamid

3. CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
- 2) Stanovení viability vybraných buněčných linií pomocí MTT.
- 3) Stanovení míry aktivace jaderných receptorů v buněčných liniích.
- 4) Vypracování diplomové práce a multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Tab. III: Seznam použitých chemikálií

Reagencie	Firma	Katalogové číslo
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	ULTRA Scientific	48599
Adenozin-5'-trifosfát (ATP)	Sigma-Aldrich	A6419
D-Luciferin	Sigma-Aldrich	L9504
Dexamethazon (DEX)	Sigma-Aldrich	D4902
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner	30016-APO
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	43819
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner	30061-APO
<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> médium (DMEM)	Sigma-Aldrich	D6546
Fetální bovinní sérum (FBS)	PAA	A15-144
Heptahydrát síranu hořečnatého	Sigma-Aldrich	M5921
Hygromycin B (HygB)	Sigma-Aldrich	H7772
Chlorid draselný	Lach-Ner	30383-APO
Chlorid sodný	Lach-Ner	30093-APO
Koenzym A (CoA)	Sigma-Aldrich	C4282
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich	E6511
L-glutamin	Sigma-Aldrich	G8540
Lyzační pufr	Promega	E3971
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich	65542
Methyltetrazoliová sůl (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Mifepriston (Ru486)	Santa Cruz Biotech.	sc-203134
Neesenciální aminokyseliny	Sigma-Aldrich	M7145
Oktylfenol etoxylát (Triton X-100)	Serva	37240
Penicilin-streptomycin (ATB)	Sigma-Aldrich	P4333
Resveratrol (RVT)	Sigma-Aldrich	R5010
Testované látky (KST-35, KST-41 a KAC-59-F)	poskytl doktor Nisar Ullah ze SA	
Trisacetát pufr	Sigma-Aldrich	T 8280
Trypanová modř	Sigma-Aldrich	T6146
Trypsin-EDTA 0,25%	Sigma-Aldrich	T4049

4.1.2 Roztoky

kultivační médium:

500 ml DMEM
5 ml L-glutamin
5 ml Neesenciální aminokyseliny
5 ml Penicilin-streptomycin
50 ml Fetální bovinní sérum

10x fosfátový pufr (PBS, pH = 7,4-7,5):

40 g Chlorid sodný
1 g Chlorid draselný
16,05 g Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu
sodného
1 g Dihydrogenfosforečnan draselný
500 ml destilované vody

substrát pro luciferázu:

5 mg D-Luciferin
9,6 mg Adenozin-5'-trifosfát
6,83 mg Koenzym A
168 mg Dithiothreitol
1,32 ml Pufr-trisacetát 1M (pH 7,8)
1,23 mg Kyselina ethylendiamintetraoctová
30,3 mg Heptahydrát síranu hořečnatého
Vše doplnit na 30 ml destilovanou vodou

4.1.3 Laboratorní přístroje

Tab. IV: Seznam použitých laboratorních přístrojů

Název a typ přístroje	Firma
Inkubátor Mitre 4000 Series	Contherm Scientific
Laminární flowbox Safe Fast Top	Faster
Luminometr/Spektrofotometr Infinite M200	Tecan
Membránová pumpa	KNF Lab
Minicentrifuga Z100 M	Hermle
Mikroskop HT-NIB-100	All Pro Corporation
Skříňový mrazicí box MDF-U53V	Sanyo
Ultrazvuková čistička Sonorex RK 31 H	Bandelin
Vodní lázeň LCB 22D	Labtech
Vortex Reax top	Heidolph

4.1.4 Biologický materiál

4.1.4.1 AZ-GR

Pro potřeby monitoringu ligandů GR byla zkonstruována stabilně transfekovaná buněčná linie AZ-GR. Jedná se o linii odvozenou od lidských rakovinových buněk děložního čípku. Tato buněčná linie vznikla po transfekci linie HeLa (ECACC No. 93021013) reportérovým plazmidem. Vlastní plazmid pGL-4.27-GRE obsahuje tři kopie GRE, reportérový gen *luciferázu* a gen rezistence proti hygromycinu B (HygB). Po expozici ligandu GR dochází k „*de novo*“ expresi genu *luciferázy*. Luciferázovou aktivitu je možné měřit po 14-ti hodinové inkubaci. AZ-GR zůstává plně funkční i po 16. pasáži. Tato buněčná linie je vhodná pro preklinické testy léčiv (Novotná *et al.*, 2012).

4.1.4.2 AZ-AhR

Transkripční aktivita AhR byla měřena na stabilně transfekované buněčné linii AZ-AhR. I v tomto případě byla buněčná linie získána po transfekci plazmidem pGL-4.27, avšak responzivní elementy byly nahrazeny právě DRE. Linie HepG2 (ECACC No. 85011430), jež byla transfekována, je odvozena z buněk lidského hepatocelulárního karcinomu. Linie byla zvolena vzhledem k funkčnosti AhR. Šestihodinová inkubace s testovanými látkami je dostatečná pro evaluaci AhR transkripční aktivity. Buněčná linie zůstává plně responzivní i po 15. pasáži. AZ-AhR má slibný potenciál při studiu cytotoxicity sledovaných sloučenin (Novotná *et al.*, 2011).

4.2 Metody

4.2.1 Rozmrazení buněk

Při práci ve flowboxu bylo třeba dodržovat sterilních podmínek práce. Samotné roztoky včetně dalších pomůcek byly rovněž sterilní. Vždy před samotnou prací došlo k ohřátí kultivačního média DMEM obohaceného o další složky, 1x PBS a trypsinu na 37 °C ve vodní lázni.

V případě dlouhodobého skladování buněk například v mrazáku (-80 °C) nebo tekutém dusíku bylo nutné jejich rozmrazení. U buněk skladovaných v tekutém dusíku došlo nejdříve k odvětrání par ve flowboxu za následného umístění mikrozkušavky s buněčnou suspenzí do vodní lázně na dobu 2 minut (při skladování v mrazáku odvětrání nebylo potřebné). Následně byla buněčná suspenze přenesena spolu s 1 ml média do předem

připravené sterilní kultivační láhve se 4 ml média. Kultivační láhev byla umístěna do inkubátoru (5% CO₂, 37 °C a 95% vlhkost). Další den bylo médium vyměněno.

4.2.2 Trypsinizace a počítání buněk

Za trypsinizaci nebo též pasážování jsou považovány kroky nezbytné k obnovení příliš konfluentní kolonie buněk. Konfluence je hodnocena mikroskopicky. Díky trypsinizaci lze předcházet kontaktní inhibici, dále deficitu živin a nedostatku místa k dělení buněk. Tento postup byl opakován přibližně každé 3 dny. Následné kroky byly prováděny výhradně ve sterilním prostředí flowboxu. Z kultivační láhve bylo odsáto médium. Adherované buňky byly promyty 5 ml 1x PBS (37 °C) za opětovného odsátí. Pro přerušení mezibuněčných kontaktů, adherentních vztahů mezi buňkami a dnem láhve byl přidán 1 ml trypsinu. Po 3 minutové inkubaci (5% CO₂, 37 °C a 95% vlhkost) bylo pro neutralizaci proteolytické aktivity trypsinu přidáno 9 ml média. Byla provedena resuspendace buněk pomocí pipetovacího sérologického nástavce, čímž bylo docíleno homogenní suspenze. Poté bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze za následného smísení s 90 µl trypanové modři. Pro stanovení koncentrace buněk v suspenzi bylo 10 µl přepipetováno do tzv. Bürkerovy komůrky a překryto krycím sklíčkem. Výpočet získaný na základě průměrného počtu buněk v deseti velkých čtvercích vynásobený faktorem 10⁵ referoval o počtu buněk celkové populace. Vzhledem k této znalosti bylo provedeno ředění tak, aby byly v kultivační láhvi přítomny cca 2-3 miliony buněk v 15 ml média. Jednou týdně (na víkend) došlo k přidání antibiotika HygB o finální koncentraci 0,3 mg/l. Kultivační láhev s buňkami byla umístěna do inkubátoru pro obnovení adherentních vztahů mezi buňkami a dnem láhve.

4.2.3 MTT test

4.2.3.1 Princip MTT testu

Test je založen na faktu, že v buňkách mrtvých nebo poškozených jsou inaktivní mitochondriální dehydrogenázy. Na druhou stranu v buňkách bez poškození jsou tyto enzymy funkční. Právě u těchto buněk jsou schopny dehydrogenázy redukovat methylnitrotetrazoliovou sůl (MTT) žluté barvy na formazan barvy tmavě fialové. Míra redukce přímo úměrně souvisí s viabilitou buněk (Wan *et al.*, 1994).

4.2.3.2 Metodika MTT testu

Pro potřeby experimentu byly buňky umístěny do kultivačních desek (v 96 jamkovém formátu). Postup byl do jisté míry podobný s trypsinizací, ale s tím rozdílem, že bylo kultivováno 20 000 buněk spolu s 200 µl média (37 °C) na 1 jamku kultivační desky. Za těchto podmínek byly kultivační desky umístěny do inkubátoru do dalšího dne.

Následný den bylo médium z jamek odstraněno a nahrazeno přidavkem 200 µl média (37 °C), které obsahovalo rovněž 0,2 µl testované sloučeniny KST-35, KST-41 nebo KAC-59-F o určité koncentraci 0,01; 0,1; 1 a 10 mmol/l a pro KAC-59-F i 50 mmol/l. Ve výsledku tak byly zásobní roztoky 1000x naředěny a výsledná koncentrace se pohybovala řádově v µmol/l (v dalších případech budou u reagensií uvedeny pouze finální koncentrace). Rovněž došlo k ošetření některých buněk negativní kontrolou 0,1% methanolem (MeOH) a pozitivní kontrolou 2% Tritonem X-100. Jednotlivé sloučeniny byly aplikovány v tetraplikátech. Takto sterilně ošetřené kultury byly opět přeneseny do inkubátoru, kde inkubace probíhala do dalšího dne.

Třetí den probíhalo samotné měření, pro které nebyla práce ve sterilním prostředí nutná. Kultivace s testovanými látkami byla přerušena po vylití média do výlevky. Kapky ulpělé na okraji jamek byly osušeny buničinou. Poté došlo k promytí jamek 1x PBS za opětovného vylití a osušení. K samotným buňkám bylo přidáno do každé jamky 100 µl MTT o koncentraci 0,3 mg/ml (37 °C). Následně byla kultivační deska inkubována v inkubátoru po dobu 30-60 minut v závislosti na tvorbě krystalů fialového formazanu. Po inkubaci buněk bylo médium vylito a krystaly byly rozpuštěny přidavkem 70 µl dimethylsulfoxidu (DMSO). Rozpuštění probíhalo 5 minut za občasného promíchání. Ke kvantitativnímu vyhodnocení viability buněk bylo využito absorpční spektrofotometrie při vlnové délce 570 nm.

4.2.4 Gene Reporter Assay

4.2.4.1 Princip Gene Reporter Assay

Tato metoda bývá volena pro bližší charakterizaci genové exprese ať už na úrovni regulačních sekvencí, enhancerů nebo transkripčních faktorů. Pro tyto potřeby bývají nejčastěji transfekovány nádorové buněčné linie reportérovým plazmidem. Samotný konstrukt je charakteristický zaklonováním rezponzivního elementu před reportérový gen nejčastěji *luciferázu*. Za těchto předpokladů transkripční aktivita sledovaného receptoru přímo souvisí s mírou exprese genu *luciferázy*. Následně vzniká funkční enzym zodpovědný

za luminiscenci. Za přítomnosti substrátu luciferinu a kosubstrátů O_2 a ATP dochází k monoxygenaci luciferinu. Díky katalytické aktivitě luciferázy je generováno světlo. Emise světla přímo úměrně reportuje o koncentraci luciferázy (Bronstein *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 2008). Ve snaze stanovit, zda jsou testované látky agonisty nebo antagonisty sledovaných receptorů, byly pro potřeby experimentu navrženy dva tzv. módy. Jednalo se o mód agonistický, díky němuž bylo možné určit schopnost testovaných látek aktivovat receptor. V druhém případě se jednalo o mód antagonistický, který byl předurčen k identifikaci inhibitorů receptoru.

4.2.4.2 Metodika Gene Reporter Assay

I v tomto případě byly buňky za sterilních podmínek umístěny do 96 jamkových kultivačních desek. Buňky byly kultivovány v hustotě 20 000 buněk spolu s 200 μ l média (37 °C) na 1 jamku kultivační desky. Poté byly kultivační desky umístěny do inkubátoru do dalšího dne.

Druhý den bylo médium z jamek odstraněno a nahrazeno přídatkem 200 μ l média (37 °C) obsahující další suplementy v závislosti na zvoleném módu. U agonistického módu obou dvou buněčných linií (AZ-AhR a AZ-GR) byly buňky ošetřeny přídatkem testovaných sloučenin (KST-35, KST-41 a KAC-59-F) o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 μ mol/l. Rovněž byl, jako negativní kontrola zvolen MeOH. Jako pozitivní kontrola byl pro linii AZ-AhR použit aktivátor AhR, tedy dioxin (TCDD) o koncentraci 5 nmol/l. U linie AZ-GR došlo k přídatku pozitivní kontroly dexamthazonu (DEX) o koncentraci 100 nmol/l. Pro antagonistický mód byl u linie AZ-AhR samotný TCDD zvolen jako negativní kontrola. Pozitivní kontrola sestávala rovněž z TCDD, ale ještě také z antagonisty AhR resveratrolu (RVT) o koncentraci 100 μ mol/l. V dalších jamkách byly buňky kultivovány s TCDD a testovanými sloučeninami. Pro linii AZ-GR byl za negativní kontrolu zvolen DEX. Pozitivní kontrola byla tvořena rovněž DEX, ale také antagonistou GR mifepristonem (Ru486) o koncentraci 5 μ mol/l. Zbývající jamky s buňkami byly ošetřeny přídatkem DEX s testovanými sloučeninami. Testované látky byly nanášeny v hexaplikátu. Kultivační desky připravené za sterilních podmínek byly umístěny do inkubátoru do dalšího dne.

Následující den bylo médium s reagenciemi vyklepnuto do výlevky. Každá jamka byla promyta 35 μ l 1x PBS. Obsah desky byl opět vyklepnut a zbylé kapky ulpělé na okrajích byly osušeny buničinou. Buňky byly smíseny s 25 μ l lyzačního pufru pro linii AZ-AhR a 22 μ l pro linii AZ-GR. Dno a víko kultivační desky bylo po uzavření slepeno páskou. Poté došlo k umístění desky na 20 minut do mrazáku (-80°C). Během této doby byl rozmrazen substrát

pro luciferázu ve vodní lázni. Následně byly rozmrazeny i buňky za pokojové teploty. Poté byl obsah jamek zhomogenizován. Z takto získaného lyzátu byly přeneseny 3 μ l původem z linie AZ-AhR nebo 20 μ l z AZ-GR do 96 jamkové desky určené k měření luminiscence. K lyzátu linie AZ-AhR bylo přidáno 30 μ l substrátu luciferázy a pro AZ-GR došlo k přidavku 100 μ l substrátu. Následně bylo provedeno samotné měření aktivity luciferázy pomocí luminometru.

4.2.5 Verifikace aktivity luciferázy

4.2.5.1 Princip verifikace aktivity luciferázy

Jedná se o postupy, díky nimž je možné potvrdit či vyvrátit potencionální antagonismus sledovaných sloučenin. Následující kroky vedou k odhalení případného inhibitoru katalytické aktivity luciferázy, který by se mohl jevit pouze na základě metody Gene Reporter Assay jako antagonist. Pro ověření postačovalo provést experiment pouze s jednou buněčnou linií, neboť se od sebe nelišily v neseném reportérovém genu.

4.2.5.2 Metodika verifikace aktivity luciferázy

Stejně jako u předchozích experimentů bylo do 96 jamkové kultivační desky umístěno na jednu jamku 20 000 buněk AZ-AhR linie spolu s 200 μ l média (37 °C) za sterilních podmínek. Následně došlo k umístění kultivační desky do inkubátoru do dalšího dne.

Druhý den bylo médium z jamek odstraněno a nahrazeno přidavkem 200 μ l média (37 °C) obsahující 0,2 μ l TCDD (5 nmol/l) na jamku. Takto ošetřená kultivační deska byla opět umístěna do inkubátoru do dalšího dne.

Třetí den byl obsah jamek vyklepnut do výlevky. Zbylé kapky ulpělé na okrajích byly osušeny buničinou. Buňky byly smíseny se 100 μ l lyzačního pufru. Kultivační deska byla uzavřena víkem a slepena páskou. Poté došlo k umístění desky na 20 minut do mrazáku (-80°C). Následně byla lyzační směs rozmrazena při pokojové teplotě a následně homogenizována. Celkem bylo sbíráno 600 μ l lyzátu, který byl 10x naředěn lyzačním pufrem. Z celkového objemu 6 ml byl lyzát 4x po 1 ml přenesen do mikrozkuavek. Do mikrozkuavek bylo rovněž jednotlivě přidáno po 1 μ l MeOH a 1 μ l KST-35, KST-41 nebo KAC-59-F pouze o koncentracích 10 μ mol/l. Z takto získaného lyzátu byly přeneseny 3 μ l do 96 jamkové desky určené k měření luminiscence. Následně bylo přidáno 30 μ l substrátu luciferázy. Poté byla měřena aktivita luciferázy pomocí luminometru.

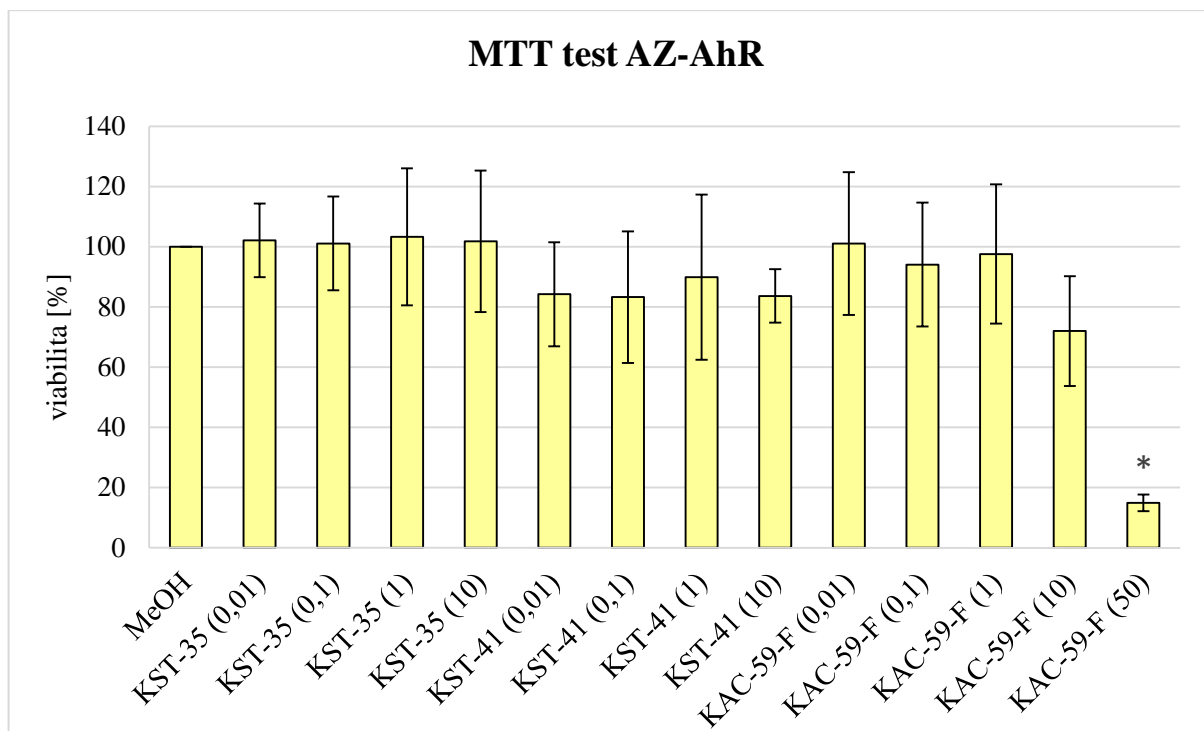
5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv testovaných látek na viabilitu buněčných linií AZ-AhR a AZ-GR

Bylo sledováno cytotoxické působení testovaných látek na buněčné kultury AZ-AhR a AZ-GR. Cytotoxicita byla určena MTT testem a parametry byly měřeny spektrofotometriky při vlnové délce 570 nm. Buněčné linie byly ošetřeny přidavkem KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ a pro KAC-59-F i 50 $\mu\text{mol/l}$. Jako pozitivní kontrola byl zvolen detergent 2% Triton X-100. Změna úrovně viability buněčných kultur v závislosti testovaných látek byla vztažena k negativní kontrole 0,1% MeOH. Experimenty byly provedeny ve třech na sobě nezávislých opakováních.

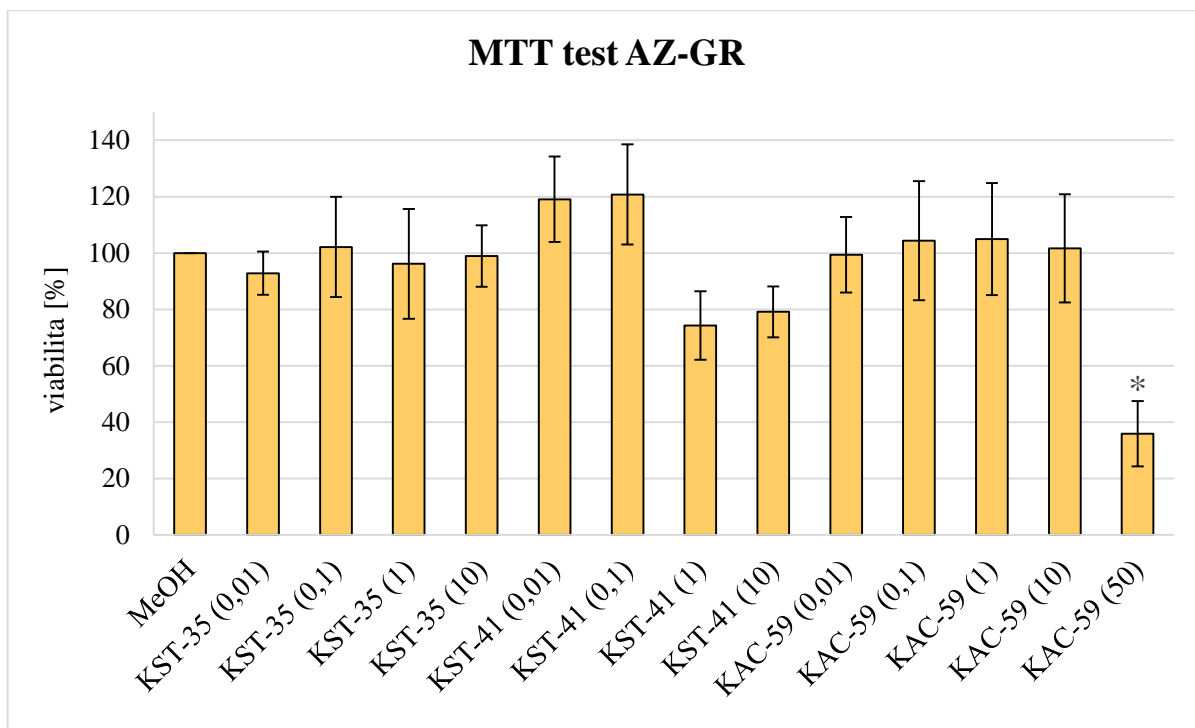
Většina testovaných koncentrací daných látek nevykazovala vůči buněčné linii AZ-AhR cytotoxický účinek (Obr. 9). Snížení viability bylo možné pozorovat u všech koncentrací sloučeniny KST-41. Jednalo se přibližně o 15% pokles, který nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Na rozdíl od předešlé sloučeniny, u KAC-59-F o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ byl pokles už znatelný. Životaschopnost buněk zde byla snížena o 74 %. Na základě tohoto zjištění byla v metodě Gene Reporter Assay použita jako hraniční pouze koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$.

I v případě MTT testu s linií AZ-GR nedošlo většinou k přílišnému odchýlení od 100 %, nicméně i zde se najdou výjimky (Obr. 10). Stejně jako u linie AZ-AhR bylo pozorováno snížení viability u sloučeniny KST-41. Pokles byl pozorován u koncentrací 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$, avšak i v tomto případě se nejednalo o statisticky významný jev. Naopak testovaná látka KAC-59-F o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ způsobila výrazný cytotoxický účinek. Snížení životnosti buněk kultury odpovídalo 64 %. Takto snížená životaschopnost byla dostatečnou indikací k tomu, aby nebyla tato koncentrace u následné Gene Reporter Assay použita.



Obr. 9: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci testovaných sloučenin

Buněčná kultura AZ-AhR byla vystavena účinkům (zleva do prava) MeOH (methanol; 0,1%) - negativní kontrola, KST-35/KST-41 (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$, KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10), (50) - testovaná sloučenina KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 50 $\mu\text{mol/l}$. Úroveň viability buněčné linie byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).



Obr. 10: Viabilita buněčné linie AZ-GR po aplikaci testovaných sloučenin

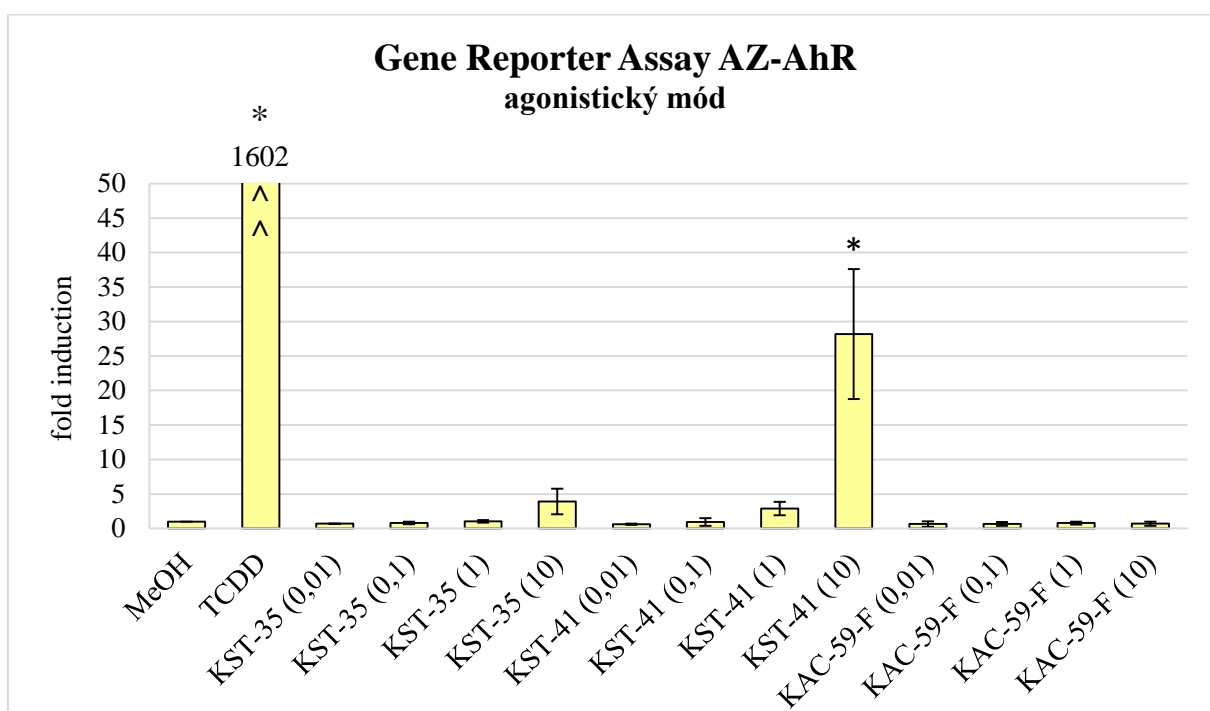
Buněčná kultura AZ-GR byla vystavena účinkům (zleva do prava) MeOH (methanol; 0,1%) - negativní kontrola, KST-35/KST-41 (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$, KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10), (50) - testovaná sloučenina KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 50 $\mu\text{mol/l}$. Úroveň viability buněčné linie byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

5.2 Vliv testovaných látek na aktivitu receptorů u linií AZ-AhR a AZ-GR

Metodou Gene Reporter Assay byla stanovena transkripční aktivita sledovaného receptoru v přítomnosti voleného derivátu přírodních látek. Transkripční aktivita receptoru byla zjištěna na základě indukce reportérového genu *luciferázy*. Samotná katalytická aktivita luciferázy byla měřena po přidání substrátu. Aktivace receptorů u agonistického módu byla vyjádřena pomocí tzv. fold induction (FI). Tato hodnota byla vypočítána jako podíl aktivit enzymu luciferázy pro testované látky a negativní kontroly. Výsledné hodnoty u testovaných koncentrací tedy odpovídají násobkům hodnoty negativní kontroly. U antagonistického módu byly výsledky pro lepší přehlednost vyjádřeny v procentech negativní kontroly. Na základě zjištěné cytotoxicity u MTT testu byly během této metody aplikovány testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 10; 1; 0,1 a 0,01 $\mu\text{mol/l}$. Výsledné grafy byly získány zprůměrováním tří nezávislých experimentů, u nichž byly reagenty aplikovány v hexaplikátu.

5.2.1 Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód)

Působení sloučeniny KST-41 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo statisticky významné, neboť FI odpovídala 28 (Obr. 11). V menší míře probíhala aktivace receptoru i u koncentrace 1 $\mu\text{mol/l}$, kdy byla hodnota FI rovna 3. Rovněž bylo zaznamenáno čtyřnásobné zvýšení aktivity luciferázy u KST-35 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Podobný trend zvyšující se aktivace AhR v závislosti zvyšující se koncentrace u sloučeniny KAC-59-F nebyl pozorován. Hodnoty byly vztaženy k negativní kontrole 0,1% MeOH. Za pozitivní kontrolu byl zvolen modelový agonista TCDD o koncentraci 5 nmol/l, jemuž odpovídala FI 1602.



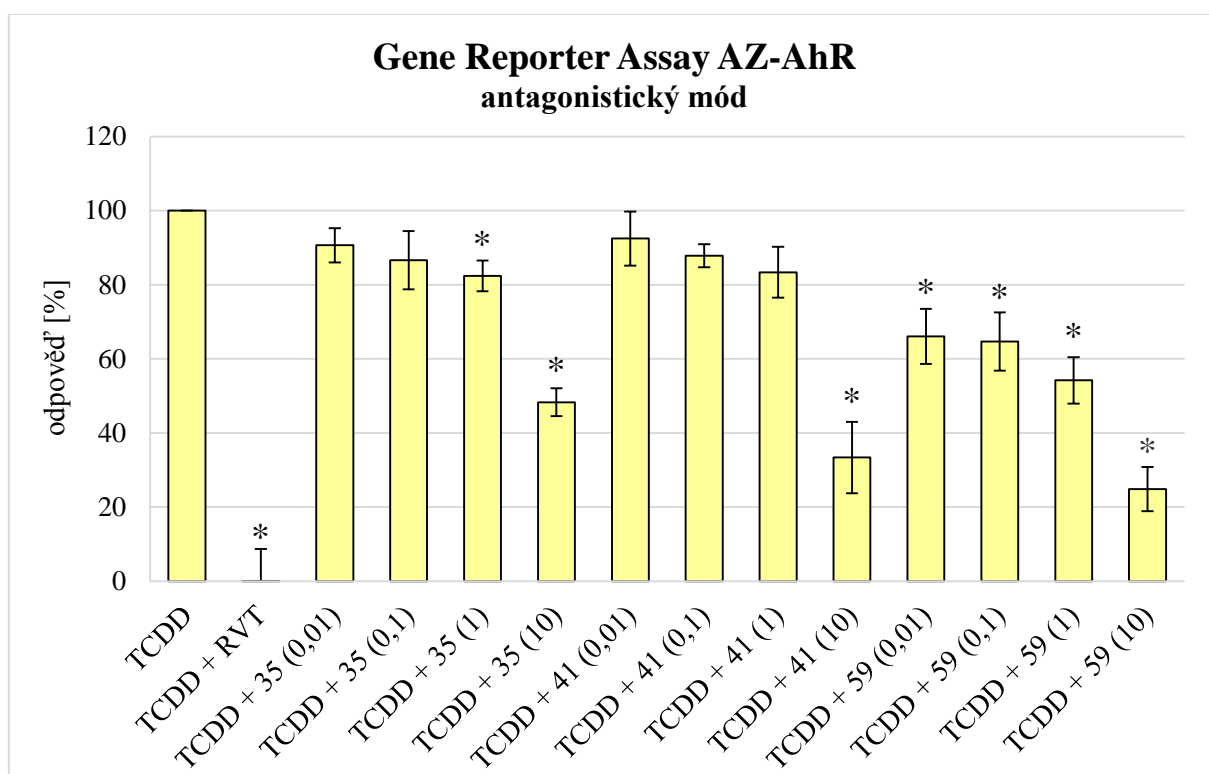
Obr. 11: Transkripční aktivita AhR u buněčné linie AZ-AhR (aktivace)

Buněčná kultura AZ-AhR byla vystavena účinkům (zleva do prava) MeOH (methanol; 0,1%) - negativní kontrola, TCDD (dioxin; 5 nmol/l) - pozitivní kontrola, KST-35/KST-41/KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a byla vyjádřena jako fold induction. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. >>1602 - hodnota FI pro pozitivní kontrolu.

* - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

5.2.2 Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód)

Při sledování inhibice receptorové aktivity bylo pozorováno u všech sloučenin podobné chování (Obr. 12). Zvyšující se koncentrace byla přímo úměrná poklesu transkripční aktivity receptoru AhR. Ke statisticky významnému snížení došlo u vzorků obsahujících TCDD včetně KST-35 (1 a 10 $\mu\text{mol/l}$), KST-41 (10 $\mu\text{mol/l}$) a KAC-59-F pro všechny testované koncentrace. Nejvyšší anti-aryl uhlovodíková aktivita byla sledována u nejvyšších volených koncentrací. Procentuálně se jednalo o pokles ve výši 51 % u KST-35, o 66 % u KST-41 a v případě KAC-59-F dokonce o 75 %. Hodnoty byly vztaženy k negativní kontrole TCDD. Jako pozitivní kontrola byla zvolena kombinace TCDD (5 nmol/l) včetně RVT (100 $\mu\text{mol/l}$), kdy došlo k poklesu aktivity na 1 % negativní kontroly.

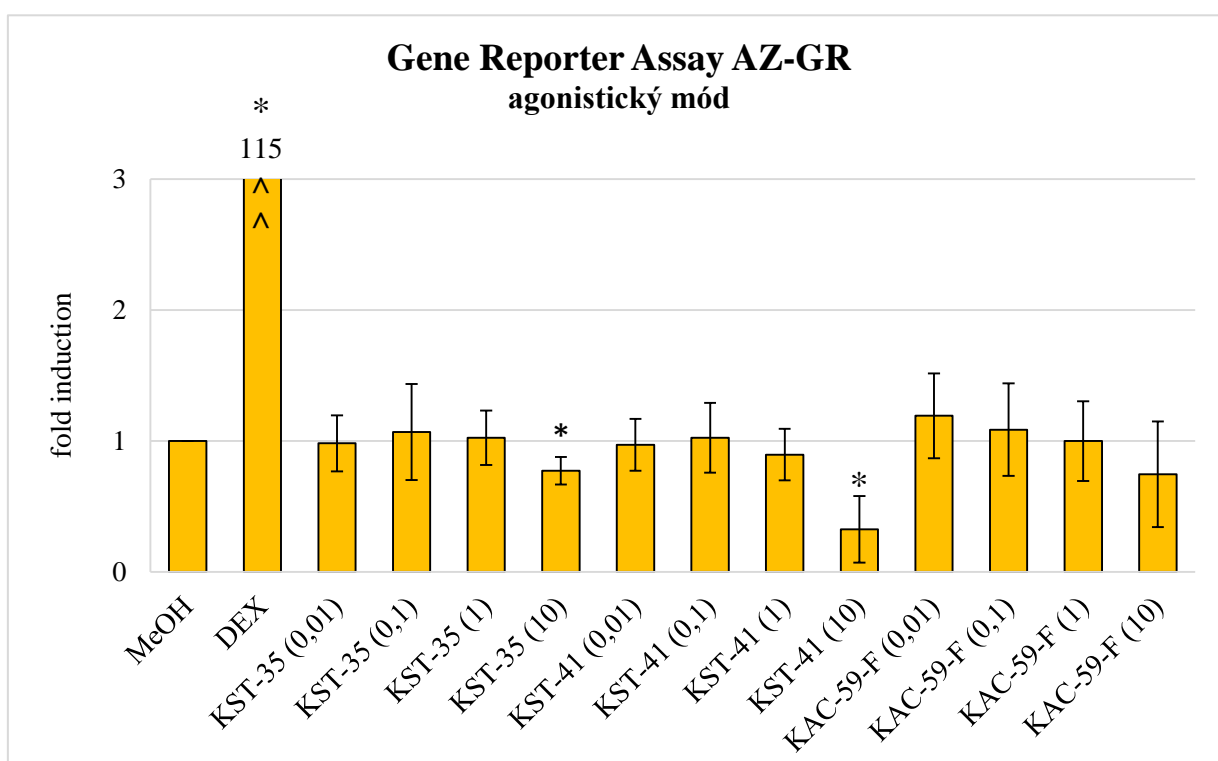


Obr. 12: Transkripční aktivita AhR u buněčné linie AZ-AhR (inhibice)

Buněčná kultura AZ-AhR byla vystavena účinkům (zleva do prava) TCDD (dioxin; 5 nmol/l) - negativní kontrola, TCDD + RVT (dioxin; 5 nmol/l + resveratrol; 100 $\mu\text{mol/l}$) - pozitivní kontrola, TCDD + KST-35/KST-41/KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s dioxinem. Úroveň transkripční aktivity byla vyjádřena v procentech negativní kontroly. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

5.2.3 Aktivace transkripční aktivity GR (agonistický mód)

Významná aktivace receptoru GR nebyla pozorována (Obr. 13). Hodnoty FI se pohybovaly na úrovni negativní kontroly 0,1% MeOH. Na druhou stranu byl zaznamenán pokles u všech sloučenin při nejvyšších testovaných koncentracích, tedy 10 $\mu\text{mol/l}$. Přibližně se jednalo o 25% snížení u sloučenin KST-35 a KAC-59-F. U KST-41 byla transkripční aktivita snížena dokonce o 63 %. Za pozitivní kontrolu byl zvolen modelový glukokortikoid DEX o koncentraci 100 nmol/l, u něhož FI dosáhla hodnoty 115.

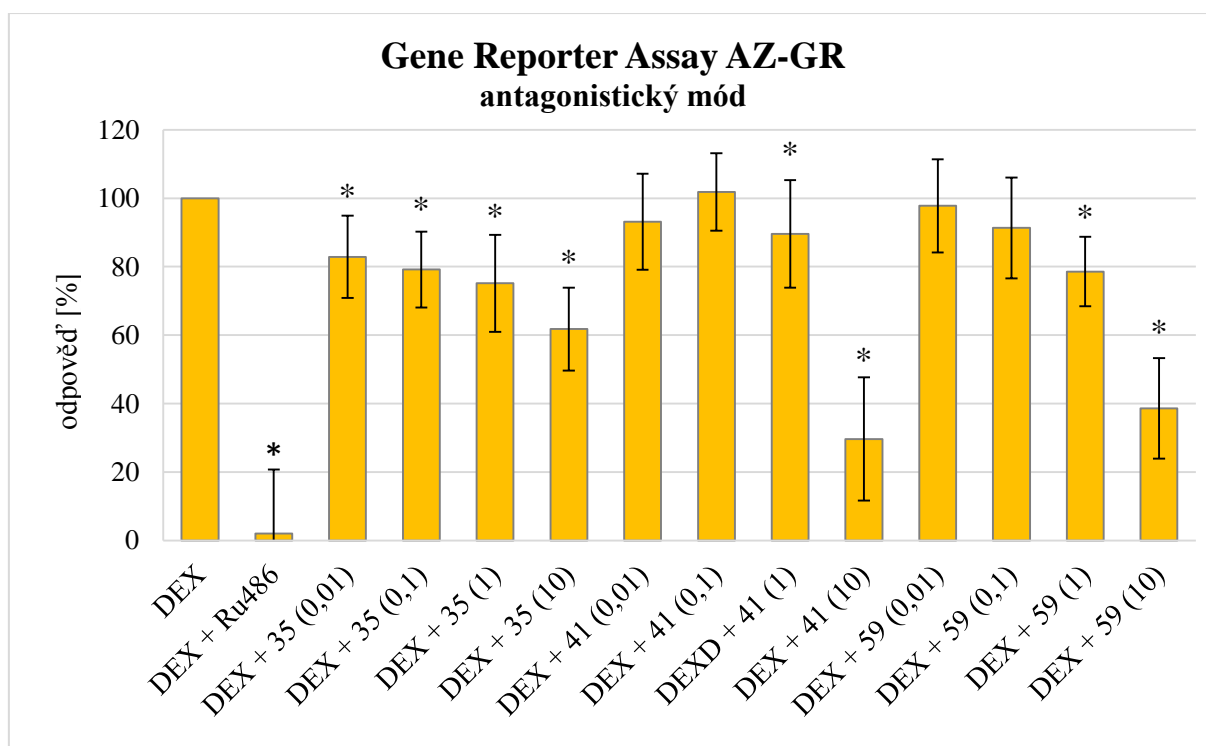


Obr. 13: Transkripční aktivita GR u buněčné linie AZ-GR (aktivace)

Buněčná kultura AZ-GR byla vystavena účinkům (zleva do prava) MeOH (methanol; 0,1%) - negativní kontrola, DEX (dexamethazon; 100 nmol/l) - pozitivní kontrola, KST-35/KST-41/KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a byla vyjádřena jako fold induction. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. >>115 - hodnota FI pro pozitivní kontrolu. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

5.2.4 Inhibice transkripční aktivity GR (antagonistický mód)

Aplikované sloučeniny vykazovaly anti-glukokortikoidní aktivitu (Obr. 14). Jistý antagonisticky vzestupný trend byl pozorovaný u všech sloučenin většiny volených koncentrací. Testované látky se chovaly podle jistého pravidla: čím vyšší koncentrace, tím vyšší byla schopnost inhibovat aktivitu GR. I když bylo toto chování pozorováno u všech sloučenin, ne u všech koncentrací se dalo hovořit o statisticky významné události. Studentův t-test vyhodnotil statisticky významný pokles receptorové aktivity u následujících sloučenin (včetně koncentrací): KST-35 (0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$), KST-41 (1 a 10 $\mu\text{mol/l}$) a KAC-59-F (1 a 10 $\mu\text{mol/l}$). Nejmarkantnější inhibiční působení bylo pozorováno u vysokých koncentrací (10 $\mu\text{mol/l}$). Pokles procentuálně odpovídal 38 % u KST-35, 70 % u KST-41 a přídavek KAC-59-F snížil aktivaci receptoru o 60 %. Hodnoty byly stanoveny na základě negativní kontroly DEX (100 nmol/l). Jako pozitivní kontrola byl zvolen opět DEX, ale v kombinaci glukokortikoidního antagonisty Ru486 (5 $\mu\text{mol/l}$) byla snížena aktivita na 1 % kontroly.

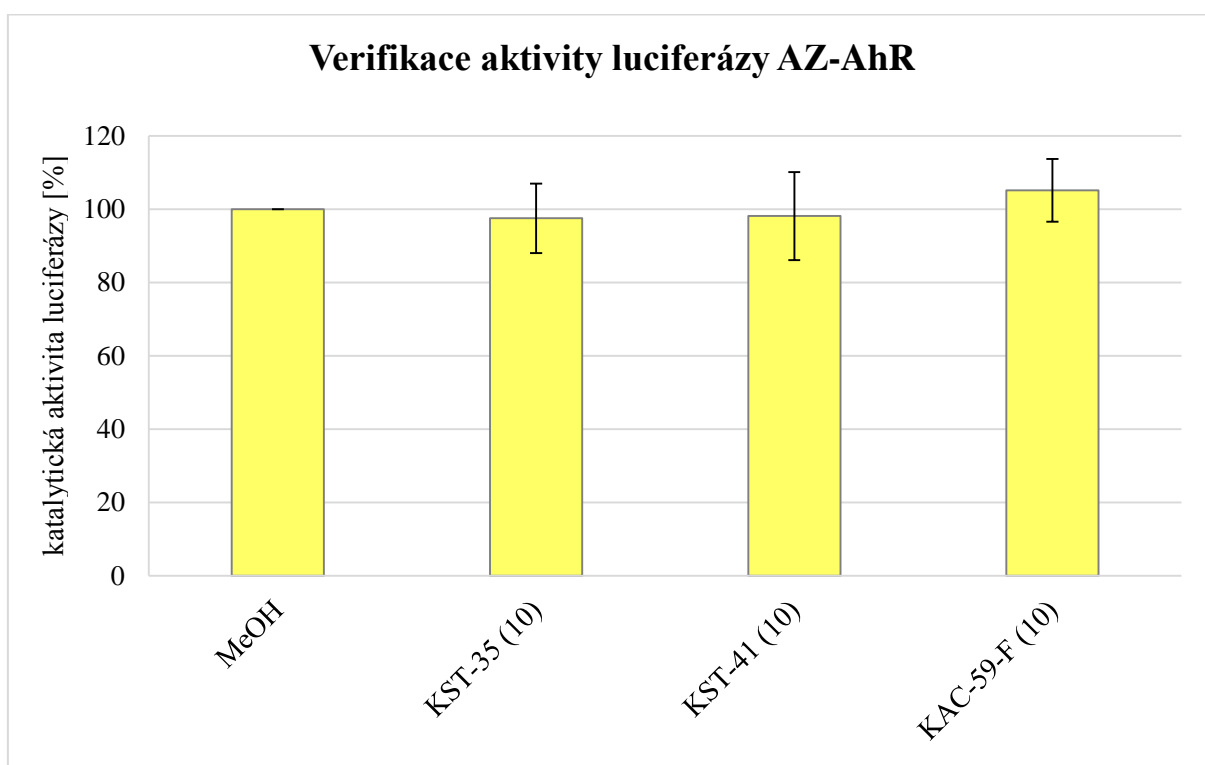


Obr. 14: Transkripční aktivita GR u buněčné linie AZ-GR (inhibice)

Buněčná kultura AZ-GR byla vystavena účinkům (zleva do prava) DEX (dexamethazon; 100 nmol/l) - negativní kontrola, DEX + Ru486 (dioxin; 5 nmol/l + mifepriston; 5 $\mu\text{mol/l}$) - pozitivní kontrola, DEX + KST-35/KST-41/KAC-59-F (0,01), (0,1), (1), (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s dexamethazonem. Úroveň transkripční aktivity byla vyjádřena v procentech negativní kontroly. Výsledky byly získány jako průměr tří na sobě nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

5.3 Vliv testovaných látek na katalytickou aktivitu luciferázy u linie AZ-AhR

Experimentálně bylo vyvráceno potencionální inhibiční působení testovaných látek vůči luciferáze (Obr. 15). Katalytická aktivita enzymu se pohybovala na úrovni negativní kontroly 0,1% MeOH u všech látek. Na základě těchto poznatků může být snížená receptorová aktivita AhR i GR přisuzována pouze antagonismu zkoumaných látek. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny v procentech negativní kontroly. Bylo pozorováno mírné zvýšení i snížení katalytické aktivity, které nepřekročilo hranici 5 %. Jednalo se o anomálii, která nebyla statisticky významná.



Obr. 15: Aktivita luciferázy u buněčné linie AZ-AhR

Buněčná kultura AZ-AhR byla vystavena účinkům (zleva do prava) MeOH (methanol; 0,1%) - negativní kontrola, KST-35/KST-41/KAC-59-F (10) - testované sloučeniny KST-35, KST-41 a KAC-59-F o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Úroveň katalytické aktivity byla vyjádřena v procentech negativní kontroly. Výsledky byly získány jako průměr dvou na sobě nezávislých experimentů. * - hodnota byla stanovena jako statisticky významná na základě Studentova t-testu ($p < 0,05$).

6. DISKUZE

Nemalé množství užívaných léčiv je založeno na bázi chinolinů, pyridinů a piperazinů. Jelikož se jedná o žádané artikly klinické praxe, bylo v praktické části diplomové práce věnováno značné pozornosti sloučeninám obsahující výše jmenované struktury. U sloučenin byla testována schopnost ovlivnit transkripční aktivitu jaderných receptorů. Pro posouzení interakce byly zvoleny receptory AhR a GR. Právě tyto receptory vystupují jako klíčové regulátory celé řady enzymů. Jako možný dopad na organismus se nabízí ovlivnění metabolismu léčiv, žlučových kyselin, homeostázy cholesterolu, imunity a také buněčného cyklu (Abel et Haarmann-Stemann, 2010). Proto je potřebné sledovat schopnost látek tyto receptory aktivovat, případně deaktivovat. Pro monitoring aryl uhlovodíkové a glukokortikoidní aktivity testovaných sloučenin KST-35, KST-41 a KAC-59-F byly použity stabilně transfekované linie AZ-AhR a AZ-GR. Rovněž byla stanovena cytotoxicita těchto sloučenin.

Testované koncentrace byly voleny tak, aby co nejvíce reprezentovaly suplementaci za fyziologických podmínek. Na základě toho bylo vytvořeno koncentrační rozpětí 0,01; 0,1; 1; 10 a v případě KAC-59-F i 50 $\mu\text{mol/l}$. Toto rozhodnutí bylo podpořeno tím, že většina látek exogenního původu bývá aplikována řádově v $\mu\text{mol/l}$ (Liguori *et al.*, 2012). Limitujícím faktorem pro použití vyšších koncentrací byla snížená rozpustnost derivátů přírodních látek. Byla sledována interakce sloučenin s vysoce afinitními receptory, které jsou transkripčně aktivní i při velice nízkých koncentracích. Při vyšších koncentracích by mohlo dojít ke snížení specifity účinku. Skutečnost, zda byla koncentrační škála vhodnou volbou, byla nejprve verifikována vzhledem k její cytotoxicitě. Testované sloučeniny nevykazovaly signifikantní pokles viability obou buněčných linií s výjimkou sloučeniny KAC-59-F o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Zde se pokles životnosti buněk pohyboval v rozmezí 65-75 %. Pro vymezení užšího rozsahu farmaceuticky využitelných koncentrací byly nutné další experimenty.

Při sledování agonistického působení testovaných sloučenin vůči AhR byla zaznamenána zvýšená aktivace receptoru. Nicméně statisticky významné zvýšení bylo pozorováno pouze u KST-41 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Působení sloučeniny odpovídalo 28 násobku negativní kontroly. V kontrastu s modelovým agonistou TCDD, u něhož se FI rovnala 1602, se zdála být aktivace pomocí KST-41 nicotná. Na druhou stranu nebylo vhodné tuto informaci ignorovat. Aktivace AhR antimalarikem primachinem, obsahujícím chinolin, byla stanovena jako hlavní induktor CYP1A1/2B s 12-ti násobně vyšší indukcí (Fontaine

et al., 1998). Testovaná sloučenina by podobně jako primachin mohla indukcí cytochromů P450 urychlit metabolismus podaných léčiv, a tak snížit jejich farmakologický účinek (Spatzenegger et Jaeger, 1995). Indukce jmenovaných enzymů by mohla hrát roli i v aktivaci chemických látek na reaktivní mutageny a karcinogeny (Fontaine *et al.*, 1998). U sloučenin KST-31 a KAC-59-F zvýšená transkripční aktivita AhR zaznamenána nebyla.

Sloučeniny byly hodnoceny i vzhledem k jejich antagonistickému účinku. Kromě schopnosti aktivovat receptor byla u sloučeniny KST-41 prokazatelná i deaktivace AhR. V běžné praxi bývá tento stav označován pojmem parciální agonista. Sloučeniny toho typu bývají schopny vyvolat měřitelnou odpověď, ale i inhibici odezvy plného agonisty. Interakce bývá vysvětlována kompeticí s plným agonistou o vazebné místo receptoru. Ve výsledku tak parciální agonisté vystupují jako funkční antagonisté (Bachleda *et al.*, 2010). Antagonismus receptoru byl pozorován i u sloučenin KST-35 a KAC-59-F. Ty lze definovat jako plné antagonisty, neboť u nich jako u KST-41 agonistické chování zaznamenáno nebylo. Anti-aryl uhlovodíková aktivita byla přímo úměrná zvyšující se koncentraci testovaných sloučenin. Deriváty přírodních látek blokovaly odpověď vyvolanou TCDD ve výši 51 % u KST-35, 66 % u KST-41 a v případě KAC-59-F dokonce 75 %. Jak antagonistické chování, tak i výskyt pyridinu v chemické struktuře vykazuje podobnost s dříve testovanou sloučeninou FPP-3 (Hwang *et al.*, 2008). Substance byla označena za chemopreventivní činidlo. V experimentu bylo sledováno 50% snížení aktivace AhR vyvolané DMBA. DMBA vystupuje jako silný karcinogen, který shodou okolností stejně, jako TCDD patří do rodiny polycyklických aromatických uhlovodíků. Jelikož oba experimenty vykazují vysoké známky similarity, je tedy důvodné uvažovat i o chemopreventivním vlivu testovaných látek.

Na základě výsledku bylo patrné, že žádná z látek nevystupuje jako agonista GR. Proto by jejich případná medikace u astmatu, alergie, revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy, transplantace orgánů a některých typů rakoviny byla zbytečná, dokonce i nebezpečná. Právě v těchto případech se totiž očekává zvýšení exprese cílových genů GR (Busill *et Cidlowski*, 2013; Miner *et al.*, 2005; Rhen *et Cidlowski*, 2005). Na druhou stranu byl zaznamenán signifikantní antagonismus těchto sloučenin a to především u koncentrací 10 $\mu\text{mol/l}$. Zde byl účinek DEX snížen o 38 % u KST-35, o 70 % u KST-41 a přídavek KAC-59-F snížil aktivaci receptoru o 60 %. Glukokortikoidy mimo jiné navozují stavy úzkosti a deprese (Eda *et al.*, 2015). Antagonizace GR receptorů by mohla tyto stavy zvrátit. Jako silný antagonist se nabízí mifepriston, který byl použit i během našeho experimentu jako pozitivní kontrola u AZ-GR linie. Na druhou stranu je mifepriston schopný vazby i s progesteronovým receptorem (PR). Z důvodu neselektivní interakce se od jeho aplikace

jako antidepresiva odpouští. V dnešní době je mifepriston znám spíše jako prostředek chemické interrupce. Po obsazení PR nedochází k vazbě progesteronu. Pro raná stádia těhotenství je progesteron nezbytný, proto zabránění účinku progesteronu vede k potratu (Maria *et al.*, 1988). Jelikož jsou testované sloučeniny antagonisté GR stejně jako mifepriston, lze u nich počítat s podobným dopadem na organismus.

U všech testovaných sloučenin byl zjištěn výskyt chinolinu, pyridinu a piperazinu. Už dříve bylo poukázáno na jejich biologickou významnost, ale proč jednotlivé sloučeniny vykazovaly různé antagonistické působení, to nevysvětluje. Proto bylo třeba stanovit odlišnosti mezi testovanými sloučeninami. Sloučeniny, kromě jmenovaných heterocyklů, obsahovaly také halogenovaný substituent (KST-35), methoxy skupinu (KST-41) a neplanární molekulu pentenu (KAC-59-F). Z výsledků vyplývá, že sloučeniny KST-41 a KAC-59-F vykazovaly v průměru o 20 % vyšší antagonistické působení než KST-31. Působení KST-41 a KAC-59 bylo zhruba srovnatelné s tím rozdílem, že u KST-41 byla zaznamenána o 10 % vyšší anti-glukokortikoidní aktivita a KAC-59-F vykazovala o 10 % vyšší anti-aryl uhlovodíkovou aktivitu. Na základě těchto poznatků byla postulována hypotéza. Přítomnost methoxy skupiny by mohla korelovat s nejvyšším sledovaným antagonismem vůči GR. Analogicky by jako významný původce antagonismu AhR mohl být substituent penten. Právě tyto poznatky by mohly být užitečné při syntéze nových sloučenin. Nicméně pro platnost této domněnky je třeba dalších testů.

Byla provedena rentgenová krystalografie ligand vazebné domény GR vážící mifepriston a 6-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-2,2,4,4-tetramethyl-2,3,4,7,8,9-hexahydro-1H-cyklopenta[h]chinolin-3-on (QCA-1093). V kombinaci s počítačovou simulací byl odhalen mechanismus zodpovědný za antagonistickou konformaci receptoru. V obou dvou případech byl pozorován vznik vodíkové vazby mezi ligandem a aminokyselinou vazebné domény receptoru. Vodíková vazba byla vytvořena mezi keto skupinou mifepristonu nebo skupinou isoxazolu sloučeniny QCA-1093 a argininem 611 (Eda *et al.*, 2015). Testované deriváty přírodních látek mají společný výskyt keto skupiny i chinolinu jako výše jmenované sloučeniny. Jelikož je sledována jistá strukturální podobnost, lze se domnívat, že antagonistické chování je zapříčiněno stejnou interakcí. K zodpovězení otázek, zda se ligand váže na receptor reverzibilně či ireverzibilně, jestli se opravdu váže do vazebné domény nebo působí alostericky, by bylo třeba dalších studií.

7. ZÁVĚR

Byla testována série syntetických derivátů přírodních látek (KST-35, KST-41 a KAC-59-F) ve vztahu ovlivnit transkripční aktivitu aryl uhlovodíkového (AhR) a glukokortikoidního (GR) receptoru. Jelikož se jednalo o nově syntetizované sloučeniny, doposud neexistovala žádná odborná publikace, která by o těchto sloučeninách více pojednávala. Konvenčním MTT testem byla stanovena jejich cytotoxicita. Pro stanovení aryl uhlovodíkové a glukokortikoidní aktivity byly použity stabilně transfekované buněčné linie AZ-AhR a AZ-GR, vzhledem k jejich funkčnosti jmenovaných receptorů. Buněčné linie byly vystaveny testovaným sloučeninám o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Transkripční aktivita byla stanovena metodou Gene Reporter Assay. Při sledování agonistického působení testovaných sloučenin vůči AhR byla zaznamenána zvýšená aktivace receptoru u KST-41 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Působení sloučeniny odpovídalo 28 násobku negativní kontroly. U sloučeniny byla sledována i blokáce odpovědi vyvolané dioxinem (TCDD) ve výši 66 % při stejné koncentraci. Na základě toho byla sloučenina KST-41 identifikována jako parciální agonista AhR. Látky KST-35 a KAC-59-F byly identifikovány jako plní antagonisté AhR, neboť vykazovaly pouze anti-aryl uhlovodíkovou aktivitu. Deaktivace receptoru odpovídala 51% poklesu transkripční aktivity u KST-35 a v případě KAC-59-F dokonce 75 % při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Antagonistická aktivita byla přímo úměrná zvyšující se koncentraci testovaných sloučenin. Podobný trend vykazovaly sloučeniny i ve vztahu s GR. Zde byl účinek dexamethazonu (DEX) snížen o 38 % u KST-35, o 70 % u KST-41 a přírůstek KAC-59-F snížil aktivaci receptoru o 60 %. Zjištěné hodnoty poukazují na možné chemopreventivní a antidepressivní využití testovaných substancí. U KST-41 je nutné uvažovat o interakci se současně podanými léky. Rovněž by daná sloučenina mohla být zodpovědná za aktivaci chemických látek na reaktivní mutageny a karcinogeny vzhledem k aktivaci AhR. Bylo upozorněno na možnou spojitost i mezi výskytem methoxy skupiny (KST-41) a nejvyšším sledovaným antagonismem vůči GR. V roli antagonismu vůči AhR byla s největší pravděpodobností směřodátná přítomnost substituentu pentenu (KAC-59-F). Tato diplomová práce poukazuje na farmakologický význam testovaných sloučenin. Jsou zde obsaženy informace, které by v budoucnu mohly být využity pro syntézu nových sloučenin. Z těchto důvodů je cesta dalšímu výzkumu otevřena.

8. LITERATURA

8.1 Vědecké publikace

Abel, J., Haarmann-Stemmann, T. (2010): An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry* 391(11): 1235 - 1248.

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Yoshida, T., Maitani, T. (2003): Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26(12): 1754 - 1760.

Aniszewski, T. (1994): The biological basis of quinolizidine alkaloids. *Science of Legumes* 1: 1 - 24.

Bachleda, P., Vrzal, R., Dvorak, Z. (2010): Resveratrol enhances NK cell cytotoxicity: possible role for aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Cellular Physiology* 225(2): 289 -290.

Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., de Castro, M., Chrousos, G. P. (1995): Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 95(6): 2435 - 2441.

Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Núñez, E., Castillo, A. I., Romero, J. (2008): Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *British Journal of Pharmacology* 153(2): 277 - 285.

Benowitz, N. L. (1996): Pharmacology of nicotine: Addiction and therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 597 - 613.

Bern, C. (2011): Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine* 364(26): 2527 - 2534.

Bhat, B. G., Hosea, N., Fanjul, A., Herrera, J., Chapman, J., Thalacker, F., Stewart, P. M., Rejto, P. A. (2008): Demonstration of proof of mechanism and pharmacokinetics and pharmacodynamics relationship with 4'-cyano-biphenyl-4-sulfonic acid (6-amino-pyridin-2-yl)-amide (PF-915275), an inhibitor of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, in cynomolgus monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324(1): 299 - 305.

Bisset, N. G., Bruhn, J. G., Curto, S., Holmstedt, B., Nyman, U., Zenk, M. H. (1994): Was opium known in 18th dynasty ancient Egypt? An examination of materials from the tomb of the chief royal architect Kha. *Journal of Ethnopharmacology* 41(1-2): 99 - 114.

Bock K. W. (2003): Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochemical Pharmacology* 66(5): 691 - 696.

Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., Kricka, L. J. (1994): Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical Biochemistry* 219(2): 169 - 181.

Burchiel, S. W., Luster, M. I. (2001): Signalling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clinical Immunology* 98(1): 2 - 10.

Busillo, J. M., Cidlowski, J. A. (2013): The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 24(3): 109 - 119.

Cairns, C., Gustafsson, J. A., Carlstedt-Duke, J. (1991): Identification of protein contact sites within the glucocorticoid/progestin response element. *Molecular Endocrinology* 5(4): 598 - 604.

Caron, C., Hoizey, M. J., Le Men-Olivier, L., Massiot, G., Zeches, M., Choisy, C., Le Magrex, E., Verpoorte, R. (1988): Antimicrobial and antifungal activities of quasi-dimeric and related alkaloids. *Planta Medica* 54(5): 409 - 412.

Clapham, D. E. (2007): Calcium signalling. *Cell* 131(6): 1047 - 1058.

Dascombe, M. J., Drew, M. G. B., Evans, P. G., Ismail, F. M. D. (2007): Rational design strategies for the development of synthetic quinoline and acridine based antimalarials. *Frontiers in Drug Design & Discovery* 3: 559 - 609.

Desai, N. C., Rajpara, K. M., Joshi, V. V. (2012): Synthesis and characterization of some new quinoline based derivatives endowed with broad spectrum antimicrobial potency. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22(22): 6871 - 6875.

Ditrich, C., Kaina, B. (2010): The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31(8): 1319 - 1328.

Dvořák, Z., Pávek, P. (2010): Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metabolism Reviews* 42(4): 621 - 637.

Dye, C., Williams, B. G. (2010): The population dynamics and control of tuberculosis. *Science* 328(5980): 856 - 861.

Eda, M., Kuroda, T., Kaneko, S., Aoki, Y., Yamashita, M., Okumura, C., Ikeda, Y., Ohbora, T., Sakaue, M., Koyama, N., Aritomo, K. (2015): Synthesis and biological evaluation of cyclopentaquinoline derivatives as nonsteroidal glucocorticoid receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 58(12): 4918 - 4926.

Engler, T. A., Furness, K., Malhotra, S., Sanchez-Martinez, C., Shih, C., Xie, W., Zhu, G., Zhou, X., Conner, S., Faul, M. M., Sullivan, K. A., Kolis, S. P., Brooks, H. B., Patel, B., Schultz, R. M., DeHahn, T. B., Kirmani, K., Spencer, C. D., Watkins, S. A., Considine, E. L., Dempsey, J. A., Ogg, C. A., Stamm, N. B., Anderson, B. D., Campbell, R. M., Vasudevan, V., Lytle, M. L. (2003): Novel, potent and selective cyclin D1/CDK4 inhibitors: indolo[6,7-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(14): 2261 - 2267.

Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., Stuart, D. (1995): Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature Structural Biology* 2(4): 303 - 308.

Fauci, A. S. (2007): 25 years of HIV/AIDS science: reaching the poor with research advances. *Cell* 131(3): 429 - 432.

Fendrich, Z. (2005): Malárie a její léčba. *Klinická Farmakologie a Farmacie* 19(2): 89 - 94.

Fiorito, J., Saeed, F., Zhang, H., Staniszewski, A., Feng, Y., Francis, Y. I., Rao, S., Thakkar, D. M., Deng, S. X., Landry, D. W., Arancio, O. (2013): Synthesis of quinoline derivatives: discovery of a potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 60: 285 - 294.

Foley, M., Tilley, L. (1998): Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology & Therapeutics* 79(1): 55 - 87.

Fratiglioni, L., Wang, H. X. (2000): Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behavioral Brain Research* 113(1-2): 117 - 120.

Fukasawa, T., Suzuki, A., Otani, K. (2007): Effects of genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes on the pharmacokinetics of benzodiazepines. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 32(4): 333 - 341.

Francis, S. E., Sullivan, D. J., Goldberg, D. E. (1997): Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology* 51: 97 - 123.

Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., Martínez-Pinilla, E. (2013): Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients* 5(10): 4159 - 4173.

Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart- Bornstein, M., O'Shea, J. J., Chrousos, G. P., Bornstein, S. R. (2002): Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB Journal* 16(1): 61 - 71.

Gómez C. M. M., Kouznetsov, V. V. (2013): Recent developments on antimicrobial quinoline chemistry. *Formatex* 23: 665 - 667.

Gwaltney, S. L. (2008): Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase IV. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8(17): 1545 - 1552.

Hagenbuch, B., Meier, P. J. (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609(1): 1 - 18.

Hahn, M. E. (1998): The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121(1-3): 23 - 53.

Hahn, M. E., Allan, L. L., Sherr, D. H. (2009): Regulation of constitutive and inducible AHR signalling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochemical Pharmacology* 77(4): 485 - 497.

Hendrickson, A., Wilson, M. E., Toyne, M. J. (1970): The distribution of optic nerve fibers in *Macaca mulatta*. *Brain Research* 23(3): 425 - 427.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M. (1985): Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047): 635 - 641.

Hudson, A. R., Higuchi, R. I., Roach, S. L., Adams, M. E., Vassar, A., Syka, P. M., Mais, D. E., Miner, J. N., Marschke, K. B., Zhi, L. (2011): Discovery of orally available tetrahydroquinoline-based glucocorticoid receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(6): 1697 - 1700.

Hwang, Y. P., Han, E. H., Choi, J. H., Kim, H. G., Lee, K. J., Jeong, T. C., Lee, E. S., Jeong, H. G. (2008): Chemopreventive effects of Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-inducible genotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228(3): 343 - 350.

Chambers, R. A. (2009): A nicotine challenge to the self-medication hypothesis in a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Journal of Dual Diagnosis* 5(2): 139 - 148.

Chang, C. C., Kuo, I. C., Lin, J. J., Lu, Y. C., Chen, C. T., Back, H. T., Lou, P. J., Chang, T. C. (2004): A novel carbazole derivative, BMVC: a potential antitumor agent and fluorescence marker of cancer cells. *Chemistry & Biodiversity* 1(9): 1377 - 1384.

Chramostová, K., Vondráček, J., Šindlerová, L., Vojtěšek, B., Kozubík, A., Machala, M. (2004): Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196(1): 136 - 148.

Ikuma, Y., Hochigai, H., Kimura, H., Nunami, N., Kobayashi, T., Uchiyama, K., Umezome, T., Sakurai, Y., Sawada, N., Tadano, J., Sugaru, E., Ono, M., Hirose, Y., Nakahira, H. (2015): Discovery of 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-4(5H)-ones as potent and selective dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors: use of a carboxylate prodrug to improve bioavailability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(4): 779 - 790.

Keenan, M., Alexander, P. W., Diao, H., Best, W. M., Khong, A., Kerfoot, M., Thompson, R. C., White, K. L., Shackelford, D. M., Ryan, E., Gregg, A. D., Charman, S. A., von Geldern, T. W., Scandale, I., Chatelain, E. (2013): Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(7): 1756 - 1763.

Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A. (2004): The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(2): 189 - 204.

Kim, S. K., Novak, R. F. (2007): The role of intracellular signalling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacology & Therapeutics* 113(1): 88 - 120.

King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., Tephly, T. R. (2000): UDP-glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism* 1(2): 143 - 161.

Klingenberg, M. (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75(2): 376 - 386.

Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy* 94: 913 - 918.

Kono, M., Matsumoto, T., Kawamura, T., Nishimura, A., Kiyota, Y., Oki, H., Miyazaki, J., Igaki, S., Behnke, C. A., Shimojo, M., Kori, M. (2013): Synthesis, SAR study, and biological evaluation of a series of piperazine ureas as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(1): 28 - 41.

Kotelevtsev, Y., Holmes, M. C., Burchell, A., Houston, P. M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C. R., Seckl, J. R., Mullins, J. J. (1997): 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26): 14924 - 14929.

Köhle, Ch., Bock, K. W. (2008): Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochemical Pharmacology* 77(4): 689 - 699.

Kutchan, T. M. (1995): Alkaloid biosynthesis [mdash] the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell* 7(7): 1059 - 1070.

Lewis, D. F. V., Watson, E., Lake, B. G. (1998): Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutation Research* 410(3): 245 - 70.

Li, A., Ouyang, Y., Wang, Z., Cao, Y., Liu, X., Ran, L., Li, C., Li, L., Zhang, L., Qiao, K., Xu, W., Huang, Y., Zhang, Z., Tian, C., Liu, Z., Jiang, S., Shao, Y., Du, Y., Ma, L., Wang, X., Liu, J. (2013): Novel pyridinone derivatives as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) with high potency against NNRTI-resistant HIV-1 strains. *Journal of Medicinal Chemistry* 56(9): 3593 - 3608.

Liguori, M. J., Lee, C. H., Liu, H., Ciurlionis, R., Ditewig, A. C., Doktor, S., Andracki, M. E., Gagne, G. D., Waring, J. F., Marsh, K. C., Gopalakrishnan, M., Blomme, E. A., Yang, Y.

(2012): AhR activation underlies the CYP1A autoinduction by A-998679 in rats. *Frontiers in Genetics* 213(3): 1 – 13.

Liu, C. H., Lin, C., Tsai, K. J., Chuang, Y. C., Huang, Y. L., Lee, T. H., Huang, L. J., Chan, H. C. (2013): Biological evaluation of 9-[(6-chloropyridin-4-yl)methyl]-9H-carbazole-3-carbinol as an anticancer agent. *Oncology Reports* 29(4): 1501 - 1509.

Lu, Y. F., Kandel, E. R., Hawkins, R. D. (1999): Nitric oxide signalling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 19(23): 10250 - 10261.

Maria, B., Stampf, F., Goepp, A., Ulmann, A. (1988): Termination of early pregnancy by a single dose of mifepristone (RU 486), a progesterone antagonist. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 28(3): 249 - 255.

Mayer, B. (2014): How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Archives of Toxicology* 88(1): 5 - 7.

Mest, H. J., Mentlein, R. (2005): Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia* 48(4): 616 - 620.

Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999): Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes and Development* 13(1): 20 - 25.

Mihaly, G. W., Ching, M. S., Klejn, M. B., Paull, J., Smallwood, R. A. (1987): Differences in the binding of quinine and quinidine to plasma proteins. *British Journal of Clinical Pharmacology* 24(6): 769 - 774.

Miner, J. N., Hong, M. H., Negro-Vilar, A. (2005): New and improved glucocorticoid receptor ligands. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14(12): 1527 - 1545.

Muñoz, R., García, E., De la Campa, A. G. (1996): Quinine specifically inhibits the proteolipid subunit of the F₀F₁ H⁺-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 178(8): 2455 - 2458.

Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T. (2006): Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21(6): 437 - 457.

Nevin, R. L. (2014): Idiosyncratic quinoline central nervous system toxicity: Historical insights into the chronic neurological sequelae of mefloquine. *International Journal of Parasitology. Drugs and Drug Resistance* 4(2): 118 - 125.

Newton, R. (2000): Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55(7): 603 - 613.

Nordeen, S. K., Suh, B. J., Kuhnel, B., Hutchison, C. A., (1990): Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Molecular Endocrinology* 4(12): 1866 - 1873.

Novotná, A., Pávek, P., Dvořák, Z. (2011): Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environmental Science & Technology* 45(23): 10133 -10139.

Novotná, A., Pávek P., Dvořák, Z. (2012): Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47(5): 842 - 847.

Oakley, R. H., Cidlowski, J. A. (2013): The biology of the glucocorticoid receptor: new signalling mechanisms in health and disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132(5): 1033 - 1044.

Palacios, N., Gao, X., McCullough, M. L., Schwarzschild, M. A., Shah, R., Gapstur, S., Ascherio, A. (2012): Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Movement Disorders* 27(10): 1276 - 1282.

Patel, K. D., Davison, J. S., Pittman, Q. J., Sharkey, K. A. (2010): Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 17(14): 1393 - 1410.

Pávek, P., Dvořák, Z. (2008): Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 9(2): 129 - 143.

Pei, Z. (2008): From the bench to the bedside: dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a new class of oral antihyperglycemic agents. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 11(4): 512 - 532.

Perez-Reyes, E. (2003): Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews* 83(1): 117 - 161.

Pratt, W. B., Toft, D. O. (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews* 18(3): 306 - 360.

Rajanarendar, E., Nagi Reddy, M., Rama Krishna, S., Rama Murthy, K., Reddy, Y. N., Rajam, M. V. (2012): Design, synthesis, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic activity of novel isoxazolyl pyrimido[4,5-b]quinolines and isoxazolyl chromeno[2,3-d]pyrimidin-4-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 55: 273 - 283.

Rakotoson, J. H., Fabre, N., Jacquemond – Collet, I., Hannedouche, S., Fourasté, I., Moulis, C. (1998): Alkaloids from *Galipea officinalis*. *Planta Medica* 64(8): 762 - 763.

Ren, R., Oakley, R. H., Cruz – Topete, D., Cidlowski, J. A. (2012): Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology* 153(11): 5346 - 5360.

Rhen, T., Cidlowski, J. A. (2005): Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. *The New England of Journal Medicine* 353(16): 1711 - 1723.

Rogers, A. J., Denk, L. D., Wax, P. M. (2004): Catastrophic brain injury after nicotine insecticide ingestion. *The Journal of Emergency Medicine* 26(2): 169 - 172.

Rigotti, N. A. (2014): Cytisine-a tobacco treatment hiding in plain sight. *The New England Journal of Medicine* 371(25): 2429 - 2430.

Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Mégnin-Chanet, F., Hélène, C., Mergny, J. L. (2002): Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(5): 2672 - 2677.

Saeki, K., Matsuda, T., Kato, T. A., Yamada, K., Mizutani, T., Matsui, S., Fukuhara, K., Miyata, N. (2003): Activation of the human Ah receptor by aza-polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26(4): 448 - 452.

Sáenz, F. E., Mutka, T., Udenze, K., Oduola, A. M., Kyle, D. E. (2012): Novel 4-aminoquinoline analogs highly active against the blood and sexual stages of *Plasmodium* in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(9): 4685 - 4692.

Simon, T. M., Kopish, A., Kopish K. (2008): Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes* 21: 23 - 26.

Singh, D., Swarnkar, C. P., Khan, F. A. (2002): Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in livestock in India. *Veterinary Parasitology* 16: 115 - 130.

Shiro, T., Fukaya, T., Tobe, M. (2015): The chemistry and biological activity of heterocycle - fused quinolinone derivatives: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 397 - 408.

Schiller, D. S., Youssef-Bessler, M. (2009): Etravirine: a second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clinical Therapeutics* 31(4): 692 - 704.

Schinkel, A. H., Jonker, J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(1): 3 - 29.

Slaga, T. J., Gleason, G. L., DiGiovanni, J., Sukumaran, K. B., Harvey, R. G. (1979): Potent tumor-initiating activity of the 3,4-dihydrodiol of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mouse skin. *Cancer Research* 39 (6): 1934 - 1936.

Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1997): Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *Journal of Biochemistry* 122(6): 1075 - 1079.

Spatzenegger, M., Jaeger, W. (1995): Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 27(3): 397 - 417.

Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S., Johnson, K. A. (1995): Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267(5200): 988 - 993.

Tirona, R. G., Kim, R. B. (2005): Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(6): 1169 - 1186.

Tyagi, Y. K., Kumar, A., Raj, H. G., Vohra, P., Gupta, G., Kumari, R., Kumar, P., Gupta, R. K. (2005): Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 40(4): 413 - 420.

Urbina, J. A. (2002): Chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design* 8(4): 287 - 295.

Van Dyke, C., Byck, R. (1982): Cocaine. *Scientific American* 243(3): 128 - 141.

Vrzal, R., Stejskalová, L., Monostory, K., Maurel, P., Bachleda, P., Pávek, P., Dvořák, Z. (2009): Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 179(2-3): 288 - 296.

Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers* 148(1): 3 - 10.

Wan, Z. K., Chenail, E., Li, H. Q., Ipek, M., Xiang, J., Suri, V., Hahm, S., Bard, J., Svenson, K., Xu, X., Tian, X., Wang, M., Li, X., Johnson, C. E., Qadri, A., Panza, D., Perreault, M., Mansour, T. S., Tobin, J. F., Saiah, E. (2012): Discovery of HSD-621 as a Potential Agent for the Treatment of Type 2 Diabetes. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 4(1): 118 - 123.

Wan, H., Williams, R., Doherty, P., Williams, D. F. (1994): A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science* 5: 154 - 159.

Wang, Z., Xing, X., Xue, L., Gao, F., Fang, L. (2013): Synthesis of 3H-pyrrolo[2,3-c]quinolin-4(5H)-ones via Pd-catalyzed cross-coupling reaction and cyclization. *Organic and Biomolecular Chemistry* 11(42): 7334 – 7341.

Weinstein, D. S., Gong, H., Doweiko, A. M., Cunningham, M., Habte, S., Wang, J. H., Holloway, D. A., Burke, C., Gao, L., Guarino, V., Carman, J., Somerville, J. E., Shuster, D., Salter-Cid, L., Dodd, J. H., Nadler, S. G., Barrish, J. C. (2011): Azaxanthene based selective glucocorticoid receptor modulators: design, synthesis, and pharmacological evaluation of (S)-4-(5-(1-((1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-5H-chromeno[2,3]pyridyl-2-fluoro-N,N-dimethylbenzamide (BMS-776532) and its methylene homologue (BMS-791826). *Journal of Medicinal Chemistry* 54(20): 7318 - 7333.

Wernsdorfer, W. H. (1994): Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica* 56(2-3): 143 - 156.

Wink, M. (2007): Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids: from DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. *The Alkaloids. Chemistry and Biology* 64: 1 - 47.

Wolpert, C., Echternach, C., Veltmann, C., Antzelevitch, C., Thomas, G. P., Spehl, S., Streitner, F., Kuschyk, J., Schimpf, R., Haase, K. K., Borggreffe, M. (2005): Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2(3): 254 - 260.

Zamek-Gliszczyński, M. J., Hoffmaster, K. A., Nezasa, K., Tallman, M. N., Brouwer, K. L. R. (2006): Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 447 - 486.

Zanger, U. M., Schwab, M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138(1): 103 - 141.

Zhang, Y., Fang, Y., Liang, H., Wang, H., Hu, K., Liu, X., Yi, X., Peng, Y. (2013): Synthesis and antioxidant activities of 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff-base derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23(1): 107 - 111.

8.2 Knižní zdroje

Acamovic, T., Colin, S., Stewart, T., Pennycott, W. (2004): Poisonous plants and related toxins, CABI Publishing, Cambridge, 362 s., ISBN 0-85199-614-0.

Bynum, W. F., Porter, R. (1994): Companion encyclopedia of the history of medicine, Routledge, New York, 1771 s., ISBN 978-0-415-09242-5.

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. (2001): Organic chemistry, Oxford University Press, Oxford, 1512 s., ISBN 978-0-1985-0346-0.

Dewick, P. M. (2002): Medicinal natural products. A biosynthetic approach, John Wiley & Sons, New York, 507 s., ISBN 0-471-49640-5.

Evans, W. C. (2009): Alkaloids in: Pharmacopoeial and related drugs of biological origin, Elsevier, 354 – 415 s., ISBN 978-0-7020-2933-2.

Ferenčík, M., Škárka, B., Novák, M., Turecký, B. (2000): Biochémia, Alfa, Bratislava, 924 s., ISBN 80-88968-18-2.

Hodgson, E. (2010): A textbook of modern toxicology, John Wiley & Sons, New Jersey, 648 s., ISBN 978-0-470-46206-5.

Jakubke, H. D., Jeschkeit, H., Eagleson, M. (1994): Concise encyclopedia chemistry, Walter de Gruyter, 1205 s., ISBN 3-11-011451-8.

Liška, F. (1993): Organická syntéza: syntonový přístup, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 339 s., ISBN 80-7080-176-X.

Manske, R. H. F. (1965): The alkaloids. Chemistry and physiology, Academic Press, New York, 673 p., ISBN 978-0-12-469508-5.

McMurry, J. (2010): Fundamentals of organic chemistry, Brooks/Cole, Belmont, 672 s., ISBN 978-1-4390-4971-6.

Pelletier, S. W. (1996): Alkaloids: chemical and biological perspectives, John Wiley & Sons, New York, 393 s., ISBN 978-0-08-042797-3.

Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V. (2011): Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, Karolinum, Praha, 162 s., ISBN 978-80-246-1917-0.

Svoboda, J. (2000): Organická syntéza I, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 302 s., ISBN 80-7080-385-1.

Woolley, J. G. (2001): Plant Alkaloids in: Encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group, Leicester, 1-11s., ISBN 0-470-01590-X.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

11βHSD1	11- β -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1
ABC	ATP vazebná doména (<i>ATP binding cassette</i>)
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AhRR	represor aryl uhlovodíkového receptoru
AIDS	syndrom získaného imunodeficitu (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
AP-1	aktivační protein 1
ARNT	nukleární translokátor aryl uhlovodíkového receptoru
ATB	penicilin-streptomycin
ATP	adenozin-5'-trifosfát
AZ-AhR	linie odvozená z buněk lidského hepatocelulárního karcinomu
AZ-GR	linie odvozená od lidských rakovinových buněk děložního čípku
bHLH	bazický helix-smyčka-helix
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CB	kanabinoidní receptor
CBP	vazebný protein pro CREB
CDK2	cyklin dependentní kinázy 2
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CNS	centrální nervový systém
CoA	koenzym A
COX-2	inducibilní cyklooxygenázy 2
CREB	vazebný protein pro cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CYP	cytochrom P450
DEX	dexamethazon
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]antracen
DMEM	komerční médium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPP-4	dipeptidylpeptidáza IV
DTT	dithiothreitol
EC₅₀	koncentrace agonisty, při níž je dosaženo 50 % maximálního efektu léčiva

EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
E_{max}	maximální efekt léčiva
ER	estrogenní receptor
FBS	fetální bovinní sérum
FK506	vazebný protein glukokortikoidního receptoru
FPP-3	1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenon
GLP-1	glukagonu podobný peptid 1
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	responzivní element glukokortikoidního receptoru
GST	glutathion-S-transferáza
HIV-1	virus lidské imunodeficiencie typu 1
Hsp70	protein teplotního šoku o velikosti 70 kDa (<i>heat shock protein</i>)
Hsp90	protein teplotního šoku o velikosti 90 kDa (<i>heat shock protein</i>)
HygB	hygromycin B
IL-1β	interleukin rodiny 1
iNOS	inducibilní syntázy oxidu dusnatého
KAC-59-F	8-(4-(3-(cyklopent-1-en-1-yl)benzyl)piperazin-1-yl)-3,4-dihydrochinolin-2(1H)-on
KST-35	8-(4-((5-(4-fluorofenyl)pyridin-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)chinolin-2(1H)-on
KST-41	2-methoxy-8-(4-((5-fenylpyridin-3-yl)methyl)piperazin-1-yl)chinolin
MeOH	methanol
MCF-7	linie odvozená z buněk lidského karcinomu prsu
MTT	methyltetrazoliová sůl
NADH	nikotinamidadenindinukleotid - redukována forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát - redukována forma
NES	nukleární exportní signál
NFκB	nukleární faktor κ B
NLS	nukleární lokalizační signál
OAT	organické aniontové transportéry
OATP	transportní peptid organických aniontů
OCT	organické kationtové transportéry
p23	kochaperonový protein o velikosti 23 kDa
p53	nádorový supresorový protein o velikosti 53 kDa
p300	koaktivátor nukleárních receptorů o velikosti 300 kDa

PAS (B)	Per-ARNT-Sim doména (B)
PBS	fosfátový pufr s přídatkem chloridu sodného
PDE5	fosfodiesterázy rodiny 5
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykinázy
PGES	prostaglandin E syntázy
PGE₂	prostaglandin E ₂
PPARγ	receptor aktivovaný peroxizomovými proliferátory γ
PR	progesteronový receptor
PXR	pregnanový X receptor
QCA-1093	6-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-2,2,4,4-tetramethyl-2,3,4,7,8,9-hexahydro-1H-cyklopenta[h]chinolin-3-on
RAR	receptor pro kyselinu <i>trans</i> -retinovou
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
Ru486	mifepriston
RVT	resveratrol
RXR	receptor pro kyselinu <i>cis</i> -retinovou
SA	Saudská Arábie
SRC-1	koaktivátor steroidního receptoru 1
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
TAF	TBP asociované faktory
TBP	TATA vazebný protein
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin
TIF-2	koaktivátor nukleárních receptorů o velikosti 160 kDa
TNF-α	faktor nádorové nekrózy α
UDP	uridin-5-difosfát
XAP2	X-asociovaný protein 2