UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Příprava nových látek odvozených od (–)-sanguinolignanu A a jejich antihelmintická aktivita

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Eva Janůjová**
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**doc. RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.**
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eva Janůjová
Název práce	Příprava nových látek odvozených od (–)-sanguinolignanu A a jejich antihelmintická aktivita
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Tato diplomová práce se zabývá identifikací a vývojem biologicky aktivních látek s antihelmintickou aktivitou, které vychází z přírodních rostlinných sekundárních metabolitů fenylpropanoidového typu. Primárně byl tento typ látek vyvinut z důvodu jejich pozorované antileishmaniální aktivity. Leishmanióza, nemoc způsobená parazity rodu *Leishmania*, se vyskytuje zejména v tzv. zemích třetího světa. Cílem této práce je vývoj nových derivátů vycházejících z aktivního laktonu dříve vyvinutého v naší skupině a prozkoumání jejich aktivity na *C. elegans*, než bude možno otestovat jejich antileishmaniální aktivitu.
Klíčová slova	Leishmanióza, fenylpropanoidy, cytotoxicita, SAR, strukturní modifikace, antihelmintická aktivita
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Eva Janůjová
Title of thesis	Synthesis of new substances derived from (-)-sanguinolignan A and their antihelmintic activity
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
The year of presentation	2021
Abstract	This Diploma thesis deals with the identification and development of biologically active substances with antihelmintic aktivity. Basic structural motive is based on natural plant secondary metabolites of the phenylpropanoid type. Primarily this type of substances was developed for their observed antileishmanial activity. Leishmaniasis, a disease caused by parasites of the genus Leishmania, occurs mainly in the so-called third world countries. The aim of this work is to develop new derivatives based on the active lactone previously developed in our group and to investigate their activity on *C. elegans*, prior they will be tested on their antileishmanial activity.
Keywords	Leishmaniasis, fenylpropanoids, cytotoxicity, SAR, structure modifications, antihelmintic activity
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne 17.5. 2021 .....

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, PhD. za jeho vstřícnost, ochotu, cenné rady a připomínky po celou dobu zpracování práce. Upřímné poděkování patří také Mgr. Daniele Koutské (Konrádové), Ph.D. za její trpělivost a ochotu především v začátcích mé práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. a Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D. za jejich odborné rady při vedení biologického testování připravených látek. A v neposlední řadě patří dík celému kolektivu katedry chemické biologie za jejich podporu a pomoc při práci v laboratoři. Závěrem bych chtěla poděkovat Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci, díky jejíž finanční podpoře tato diplomová práce vznikla (IGA_PrF_2021_011).

OBSAH

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE 7

2 TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1 LEISHMANIÓZA 8

2.1.1 Patogeneze 9

2.1.2 Rozšíření a epidemiologie 10

2.1.3 Klinické projevy 12

2.1.4 Léčba 15

2.2 VYBRANÉ SEKUNDÁRNÍ METABOLITY A JEJICH ANTIPARAZITICKÁ AKTIVITA 20

2.2.1 Lignany a neolignany 20

2.2.2 Kumariny 24

2.2.3 Flavonoidy 25

2.2.4 *CAENORHABITIS ELEGANS* – JAKO MODELOVÝ SYSTÉM PRO TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY 27

2.3 PŘEDCHÁZEJÍCÍ VÝSLEDKY VE SKUPINĚ 30

2.3.1 Syntéza Sanguinolignanu A – výstřel na slepo, co zasáhl cíl 30

2.3.2 Syntéza a modifikace fenylsulfonyl laktonu 31

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 33

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 33

3.2 METODY A MATERIÁL 33

3.3 ORGANICKÁ SYNTÉZA 35

3.3.1 Syntéza fenyl sulfonyl bicyklolaktonu (2) 35

3.3.2 Reakce s fenyl sulfonyl bicyklolaktonem 37

3.3.3 Click chemie – reakce azidu (+)-6 s acetylenovými substráty 40

3.3.4 Syntéza acetylenových látek 41

3.4 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ PŘIPRAVENÝCH LÁTEK 44

3.4.1 Antihelmintická aktivita 44

4 VÝSLEDKY A DISKUSE 45

4.1 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-3 – SYNTÉZA 45

4.2 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-3 – ZNÁMÉ MODIFIKACE 45

4.3 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-3 – MODIFIKACE LAKTONOVÉHO KRUHU 46

4.4 CLICK CHEMIE 48

4.4.1 Syntéza nekomerčně dostupných acetylenů 11b-e – využité Ohira-Besmann reagentu 50
4.5 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ 51
4.5.1 Vyhodnocení antihelmintické aktivity 51
5 ZÁVĚR 53
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 54
7 PŘÍLOHY 64
7.1 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-3 64
7.2 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-4A 65
7.3 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-4B 66
7.4 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-5 67
7.5 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-6 68
7.6 ^{1}H A ^{13}C NMR SPEKTRA LÁTKY (+)-7 69

SEZNAM ZKRATEK

ADP – adenosin fosfát

B.t. – bod tání

$CD4^+$ – CD (cluster designation) znaky spadající pod pomocné lymfocyty, které zahajují specifickou imunitní odpověď

CL – cutaneous leishmaniasis (kožní leishmanióza)

CpG – cytosin-fosfát-guanin

CR3 – komplementový receptor 3

C3b – vzniká štěpením komplementoru 3, důležitý především při opsonizaci

d – dublet

dd – dublet dubletu

DCM – dichlormethan

DMC – 2‘,6‘-dihydroxy-4‘-methoxychalkon

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

epi-SA – epimer sanguinolignanu A

eq. – ekvivalent

EtOAc – ethylacetát

E4P – D-erythro-4-fosfátem

FML – fukosa-manosa ligand

HIV – human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)

IC_{50} – half maximal inhibitory concentration (polovina maximální inhibiční koncentrace)

LML – lokalizovaná mukózní leishmanióza

LPG – lipofosfoglykan

l.t. – laboratorní teplota

m – multiplet

MCL – mukokutánní leishmanióza

MeOH – methanol

nm – nanometr

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NaOMe – methanolát sodný

p – pentet

PANC-1 – pancreatic cell line 1 (pankreatická buněčná linie 1)

PE – petrolether

PEP – fosfoenolpyruvát

PKDL – post-kala-azar dermální leishmanióza

Ppm – parts per milion (počet částic na milion)

PSG – promastigotní sekreční gel

ROS – reaktivní kyslíkové formy

RVO – rotační vakuová odparka

s – singlet

SA – sanguinolignan A

SAR – structure activity relatioship (vztah struktury a aktivity)

t – triplet

tt – triplet tripletu

TEA – triethylamin

THF – tetrahydrofuran

TLC – tenkovrstevná chromatografie

TMS – trimethylsilan

VL – visceral leishmaniasis (útrobní leishmanióza)

WHO – světová zdravotnická organizace

δ – chemický posun

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Leishmanióza je nemoc způsobená prvoky rodu *Leishmania.* Každoročně tato nemoc postihne až 350 miliónů lidí po celém světě. Především se jedná o tzv. země třetího světa, mezi které patří např. Indie a dále pak země severní Afriky a Jižní Ameriky. Parazité rodu *Leishmania* jsou fyziologicky velmi podobní parazitům rodu *Trypanosoma,* kteří způsobují spavou anebo Chagasovu nemoc. Léčba leishmaniózy, která je přenášena hmyzem infikovaným parazity rodu *Leishmania*, je v současné době poměrně složitá z důvodu zvyšující se rezistence prvoků vůči léčbě a také kvůli vedlejším účinkům používaných léčiv.[1]

V rámci naší laboratoře se zaměřujeme na vývoj nových látek, které by vykazovaly kýženou antileishmaniální aktivitu. Látky, které jsou v této souvislosti vyvíjeny, strukturně vychází z přírodních rostlinných sekundárních metabolitů fenylpropanoidového typu, ale jsou připravovány *de novo* pomocí organické syntézy. U některých látek tohoto typu, zejména u dimerů fenylpropanoidů, tedy lignanů, byly totiž pozorovány zajímavé antiparazitické vlastnosti.[2] Tato práce tematicky navazuje na předcházející studii v naší skupině,[3] ve které bylo zjištěno, že bicyklický lakton vykazuje zajímavé antileishmaniální vlastnosti. V tomto ohledu se zdá, že za pozorovanou aktivitu je zodpovědný cyklopropanový motiv, který ale musí být substituován dvěma elektron akceptorními skupinami na uhlíku C2. V rámci této práce navážeme na již dříve prováděný výzkum, ale z důvodu COVID-19 situace nebudeme jej moci rozšířit dále do oblasti antileishmaniálních vlastností. Důvodem je, že testování na tento typ vlastností je prováděno ve spolupráci s laboratoří prof. Jaffeho na Hebrejské Univerzitě v Izraeli. Z tohoto důvodu jsme se tedy rozhodli otestovat připravené látky na jejich antihelmintickou aktivitu ve spolupráci se skupinou Dr. Kadlecové (katedra Experimentální Biologie).

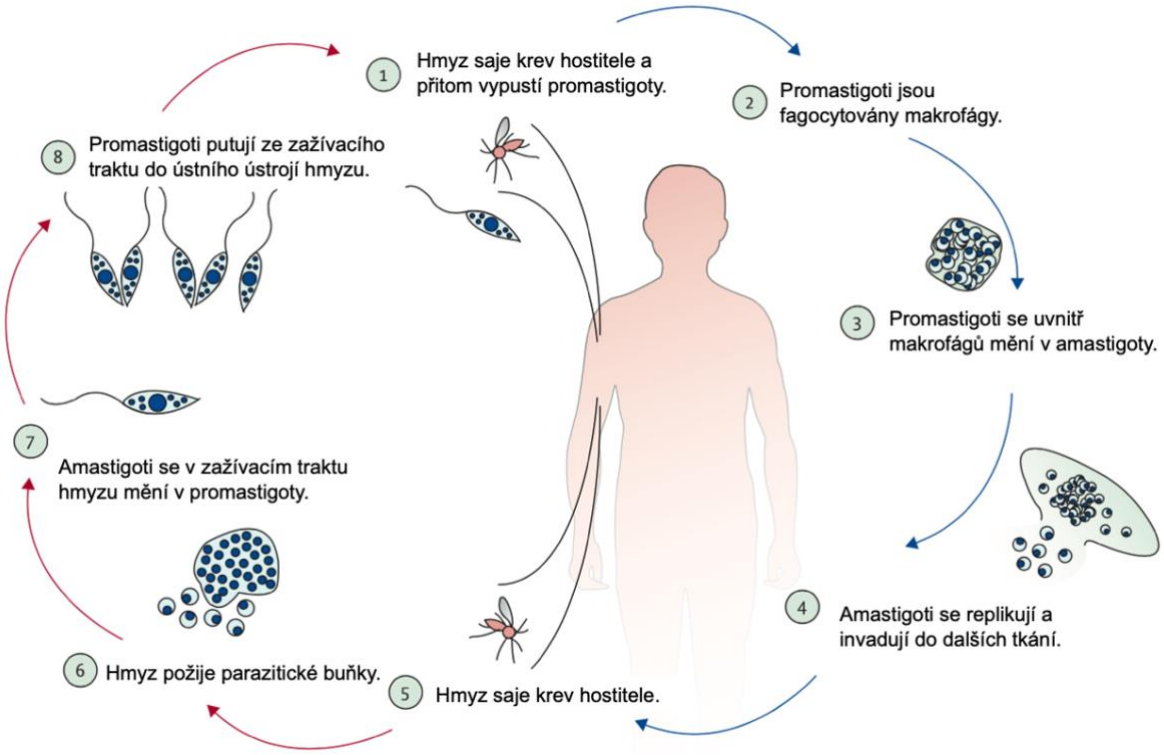
Cílem této práce je tedy (a) vypracovat literární rešerši na téma vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou vybraných antileishmaniatik (původní projekt) a následně popsat, jak a proč probíhá testování látek na *C. elegans*, které slouží jako modelový organismus pro studium antihelmintické aktivity; (b) navázat na předchozí výzkum a vytvořit novou knihovnu chemických látek, respektive prozkoumat cesty k ní, která bude obsahovat strukturně modifikované látky založené na bicyklolaktonu vyvinutým Dr. Koutskou (Konrádovou). Jinými slovy pokusit se přispět k objasnění vlivu substituce na cyklopropanu k zachování biologické aktivity. Všechny produkty pak budou charakterizovány pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 LEISHMANIÓZA

Leishmanióza je od roku 2010 zařazena Světovou zdravotnickou organizací (WHO) na seznam „opomíjených nemocí“. Od té doby se WHO snaží kontrolovat šíření této nemoci v rámci světové populace. Leishmanióza je nemoc způsobená parazity rodu *Leishmania*.[4] Dosud bylo popsáno asi 20 druhů prvoků *Leishmania,* kteří vykazují patogenitu pro člověka.[5] Naštěstí valná většina těchto parazitů je přenášena a způsobuje infekce u dalších savců, respektive dalších obratlovců.[6] Přenos je primárně zprostředkován bodnutím samičkou písečné mouchy rodu *Phlebotomus a Lutzomyia,* kdy z těchto dvou rodů až 100 různých druhů je schopno infikovat lidské hostitele a způsobit leishmaniózu u člověka.[7]

Životní cyklus (Obr. 1) parazitických prvoků rodu *Leishmania* je rozdělen do dvou fází.[8] V první fázi dochází ke kousnutí infikovanou písečnou mouchou a tímto kousnutím se do kůže hostitele dostávají metacykličtí promastigoti.[9] Ti jsou fagocytovány hostitelskými buňkami, převážně makrofágy. Ve fagolysozomech makrofágů se promastigoti transformují na amastigoty.[8] Tato přeměna promastigotů na amastigoty je způsobena vzrůstající teplotou a snížením pH uvnitř fagolysozomu. Amastigoti se replikují a následně se šíří v těle hostitele, kde mohou infikovat další makrofágy, a to jak lokálně, tak i ve vzdálenějších tkáních, a způsobit leishmaniózu. Ve druhé fázi, pokud hmyz nasaje krev z tohoto hostitele, dochází k dokončení životního cyklu *Leishmanie*. Hmyz totiž požije amastigoty a ti se v jeho střevě transformují na procyklického nektomonádního promastigota (neinfekčního). V této formě pak promastigot putuje až do ústního ústrojí. V ústním ústrojí a částečně ještě i v trávícím traktu se tito neinfekční promastigoti diferencují na leptomonádní promastigoty (infekční), kteří jsou zodpovědní za sekreci PSG gelu (promastigote secretary gel). Právě PSG gel je klíčový pro přenos do hostitelských buněk, neboť lokálně neutralizuje imunitní systém hostitele a umožňuje infekční promastigoty penetrovat do makrofágů.[9]



Obr. 1: Životní cyklus prvoků rodu *Leishmania*. Převzato a upraveno z Reithinger, R.; Dujardin, J. C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S., Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.*, **2007**, 7, 581–596, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.

2.1.1 Patogeneze

Aby mohli parazité přežít v hostitelském organismu, vytvořili si obranné mechanismy, které jsou schopné obejít či vyřadit různé imunitní odpovědi hostitele. V některých případech jsou dokonce parazité schopni využít imunitní odpovědi hostitelského organismu nebo dokonce zasáhnout do jeho signálních drah, jen aby se mohli „zabydlet“ a rozšířit infekci po celém hostitelském organismu. U různých druhů *Leishmanie* byly identifikovány jedinečné virulentní faktory, které podporují patogenezi u savčích hostitelů. Některé faktory pomáhají při přichycení a na následné pohlcení parazita do makrofágů a dendritických buněk, jiné faktory naopak podporují intracelulární přežití parazitů. Parazité jsou také schopni „modifikovat“ signální dráhy uvnitř hostitelské buňky tak, aby se vyhnuli leishmanicidním imunitním reakcím organismu. Tento mechanismus má obecně za následek mnohem horší průběh onemocnění.[10]

Z mechanistického pohledu je „pohlcení“ promastigotů makrofágy proces zprostředkovaný aktivním receptorem (C3b) a vlastními molekulami parazita, které jsou přítomné na parazitu a také v PSG gelu při vstupu parazita do těla hostitele.[11] Z pohledu promastigotů, jejich povrch je nejčastěji pokryt lipofosfoglykany (LPG) – polymerem opakujících se fosfocukerných jednotek, které jsou připojeny

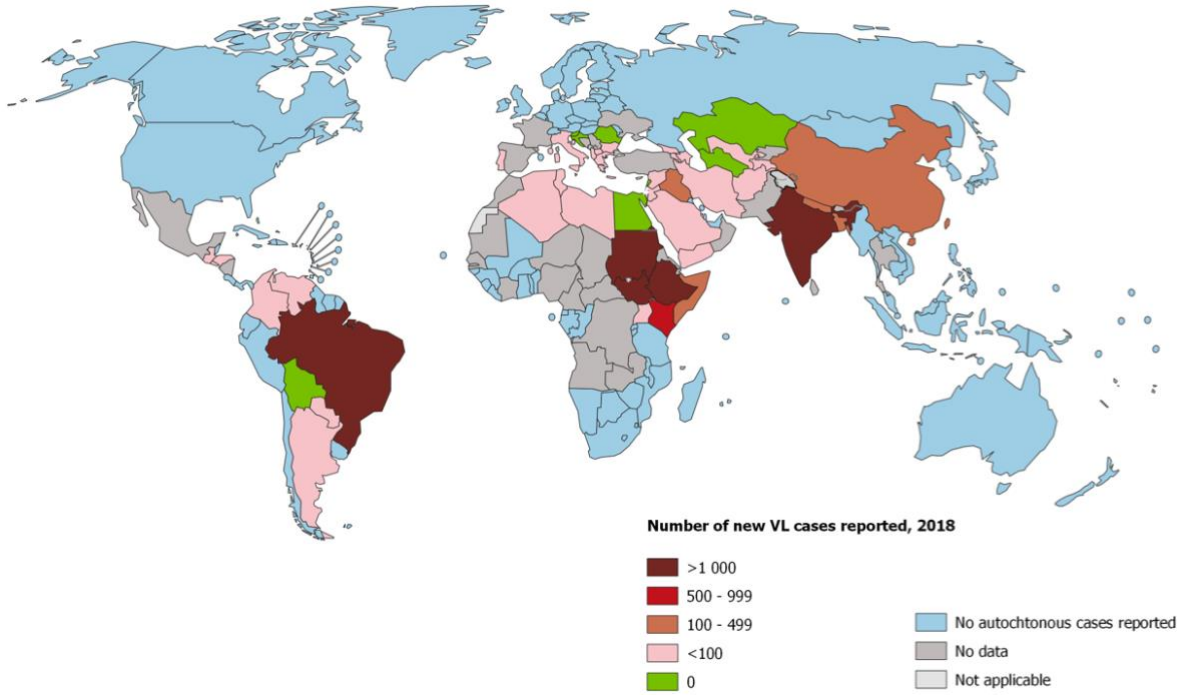
ke glykolipidovým molekulám. Tyto glykolipidy pak slouží k udržení fosfocukerných zbytků na povrchu parazita. Tento typ molekul se následně váže na receptor CR3 a také na povrch makrofága, čímž usnadňuje jeho uchycení.[12] Přítomnost (koncentrace) polymerů LPG byla identifikována jako důležitý faktor virulence u *L. donovani* a *L. major*.[13]

Poté, co parazité vstoupí do hostitelských buněk prostřednictvím interakce s povrchovými molekulami, jsou pohlceni a tím vzniká fagolysozom.[14] Fagolysozom je místem pro akumulaci reaktivní kyslíkové formy (ROS), která je zodpovědná za eliminaci intracelulárních patogenů, avšak parazité *Leishmania* inhibují tvorbu komplexu s NADPH. Hlavní zbraň obranného mechanismu tedy nemůže být spuštěna. Inhibice komplexace s NADPH tedy vede k inhibici tvorby ROS a hlavní „zbraň hromadného ničení" v těle hostitele pro prvoky z rodu *Leishmania* je tak zneškodněna.[15] Parazité také mohou ovlivňovat vývoj fagosomů v nevyvinutých dendritických buňkách kostní dřeně (nemohou však již působit na vyvinuté fagosomy). Což může způsobit přenos parazitů do lymfatických uzlin a způsobit rozšíření infikace dále do těla hostitele (vážnější formy leishmaniózy).[16] Parazité jsou také schopni účinně ovlivňovat vývoj fagolysozomů, a tím si zajistit přežití uvnitř hostitelských buněk.[10]

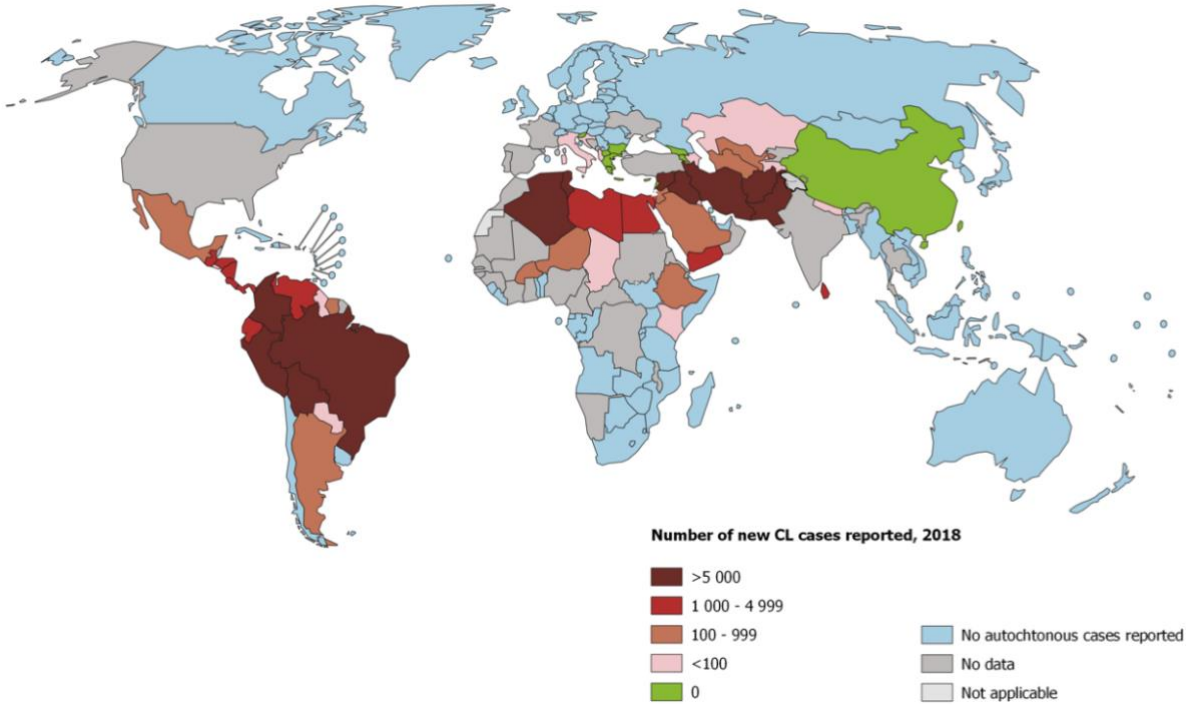
2.1.2 Rozšíření a epidemiologie

Leishmaniální parazité jsou přenášeni na člověka (hostitele) nezávisle na biotopu, kde žije (od měst po pouště a deštné pralesy napříč všemi kontinenty). Limitace jeho výskytu je tak spojena pouze s výskytem (schopností přežít) jeho vektoru (pouštních mušek).[17] Přestože se vyskytuje téměř po celém světě (Obr. 2 a 3), nejvíce postiženými oblastmi jsou některé části Afriky (Keňa, Súdán, Etiopie a Somálsko), jižní, střední a jihozápadní Asie, Brazílie a Latinské Ameriky.[(int1)] Každoročně se objeví až 1,3 miliónů nových případů leishmaniózy. Leishmanióza je devátá nejrozšířenější infekční choroba na světě a zároveň druhá nejčastější příčina úmrtí u onemocnění řazených do tropických chorob. Větší úmrtnost než na leishmaniózu se mezi parazitárními chorobami těší pouze malárie *(Plasmodium, Trypanosoma)* a lymfatické filariózy *(Wuchereria bancrofti*).[17] I přesto se tak tato nemoc řadí mezi tři nejvíce opomíjené tropické choroby.[18] Neexistuje jednoduché vysvětlení, proč je leishmanióza do značné míry celosvětově ignorována. Kromě toho, že postihuje především nejchudší oblasti světa, je to také pro její složitou epidemiologii a klinickou různorodost. Klíčové faktory způsobující komplexnost leishmaniózy a její šíření nelze odvodit pouze od široké genetické diverzity prvoků rodu *Leishmania,* či z důvodu komplexní interakce mezi přirozenými hostiteli a jejich prostředí. V potaz se musí vzít totiž i výrazné regionální rozdíly v klinických projevech nemoci, rozdílné zdravotní stavy

pacientů či přidružené rizikové faktory.[19] Je ale důležité si uvědomit, že změny klimatu a další enviromentální vlivy mohou v budoucnosti značně rozšířit geografický dosah vektorů (pouštních mušek) a tudíž i přenos leishmaniózy.[20]



Obr. 2: Mapa zobrazující rozšíření viscerální formy leishmaniózy. Převzato a upraveno z internetového zdroje (1).



Obr. 3: Mapa zobrazující rozšíření kožní formy leishmaniózy. Převzato a upraveno z internetového zdroje (2).

2.1.3 Klinické projevy

Nejčastěji jsou popisovány dvě nebo tři klinické formy leishmaniózy, z nichž největší zastoupení má kožní a viscerální.[4] Různé druhy prvoků rodu *Leishmania,* způsobujících leishmaniózu po infikaci hostitelů, mají odlišné klinické projevy. Dle závažnosti se pak mohou projevovat „pouze“ samohojícími se kožními lézemi, ale mohou také skončit jako život ohrožující viscerální choroby.[21]

Viscerální leishmanióza (VL) je obvykle způsobena *L. donovani*, která se vyskytuje především v oblastech Asie a Afriky, a *L. infantum*, která je typická pro středomořské oblasti, Střední východ, Střední Asii a Jižní a Střední Ameriku. Tyto druhy způsobují nejzávažnější systémovou formu leishmaniózy, která bývá pro hostitele fatální, pakliže je neléčena.[22] Charakteristické příznaky VL jsou především kolísavá horečka, splenomegalie[23] výrazné blednutí a úbytek na hmotnosti.[24] Mimo tyto typické příznaky lze také pozorovat změny v epidermálních strukturách např. suché, křehké a depigmentované vlasy; řasy jsou naopak dlouhé a hedvábné. V pozdních fázích se objevuje pancytopénie, hepatomegalie a hypergamaglobulinémie. Akutní podvýživa je typickým příznakem velkého rozmnožení parazita v hostiteli, zejména pak u malých dětí (Obr. 4).[23]

Obr. 4: Dítě trpící viscerální leishmaniózou (VL). Převzato z internetového zdroje (3).

Nástup VL může být buď akutní, nebo postupný, až „zákeřný“. Doba inkubace se pohybuje od 2 týdnu až po 8 měsíců a bez léčby nemoc většinou končí smrtí do 2 let od propuknutí nemoci, většinou v důsledku sekundární bakteriální infekce nebo těžké anémie. Některým infikovaným lidem se však příznaky mohou projevit až za několik let po infikaci v okamžiku, kdy je jejich imunita potlačena například v důsledku jiného onemocnění (tzv. koinfekce, viz níže).[25]

Komplikací provázející léčbu VL je tzv. post-kala-azar dermální leishmanióza (PKDL) způsobená *L. donovani*. Rizikovými faktory pro vznik této formy VL leishmaniózy je neúplná (nedokončená) léčba a vystavení ultrafialovému světlu.[26] Při této nemoci vznikají na kůži léze (Obr. 5), které pak pro pacienty představují především estetické problémy.[27] Patofyziologie tohoto typu leishmaniózy je pravděpodobně spojena s imunitní odpovědí hostitele proti zbytkovým dermálním parazitům.[26] Zdá se totiž, že parazité přežívají v kůži i po léčbě.[28] Dalším problémem komplikujícím léčbu VL je koinfekce s HIV. Obě tyto onemocnění sdílejí imunopatologický mechanismus zahrnující makrofágy a dendritické buňky, což má při koinfekci za následek zrychlenou progresi obou nemocí kvůli zvýšené replikaci jednotlivých patogenů.[29] Jinými slovy, VL je velmi závažné onemocnění vyžadující specifickou a neodkladnou léčbu.[24]

Obr. 5: Muž trpící post-kala-azar dermální leishmaniózou. Převzato z internetového zdroje (4).

Kožní leishmanióza (CL) se vyskytuje hlavně v tropických a neotropických oblastech. CL je spíše než název jedné nemoci názvem souboru onemocnění s velkým spektrem klinických příznaků. Na rozdíl od VL je CL výjimečně zakončena smrtí hostitele,[8] a je způsobována větším množstvím poddruhů *Leishmania spp.* V závislosti na hostiteli se také liší odpověď hostitele na tuto infekci.

Ve velké většině případů totiž hostitelé ani nepocítí přítomnost parazita a CL nepropukne.[30] Pakliže nemoc propukne, pak se obvykle nejprve objeví malý erytémem v místě, kde došlo ke kousnutí písečnou muškou. Poté se erytém vyvine v papulu a následně v uzlík, který se postupně mění ve vřed (2 týdny až 6 měsíců po infekci). V konečné fázi se přemění v lézi (Obr. 6). Tato léze je typická pro lokalizovanou kožní leishmaniózu (LCL). Tyto léze se pak liší případ od případu ve své závažnosti, klinickém vzhledu a zejména v čase, za jak dlouho dojde spontánnímu vyléčení.[31] Čím je doba léčení delší, tím dochází k větší pravděpodobnosti šíření parazitů přes lymfatický systém a postižení lymfatických žláz.[32] U lézí dochází k proměnlivé tendenci u samohojení (2–6 měsíců od nástupu onemocnění), v závislosti na druhu parazita, který infikuje organismus. Spontánní hojení obvykle vede k celoživotní ochraně před leishmaniózou, která může, ale také nemusí být omezenou pouze na určitý druh *Leishmania spp.* Po zahojení však na kůži zůstane celoživotní jizva, která kvůli své velikosti u většiny hostitelů způsobuje nemalá doživotní traumata.[33]

Obr. 6: Léze u kožní formy leishmaniózy. Převzato z internetového zdroje (5).

Další formy leishmaniózy, ať už akutní, nebo postupně se rozvíjející, jsou méně časté, neidentifikované anebo lékaři ignorovány. Tyto formy jsou obvykle kombinací několika primárních stavů, anebo vznikají jako důsledek prodělání jedné z hlavních forem leishmaniózy. Jedná se o lokalizovanou leishmaniální lymfadenopatii, lokalizovanou mukózní leishmaniózu (LML), mukokutánní leishmaniózu (MCL), difúzní a diseminovanou CL a již výše zmíněnou post-kala-azar dermální leishmaniózu. Ačkoliv je patogeneze VL a CL poměrně dobře prozkoumána, u MCL je stále nejasná.[34]

2.1.4 Léčba

2.1.4.1 Vakcinace

Ideální formou léčby leishmaniózy by bylo vytvoření imunity organismu. Že tento přístup je teoreticky možný je zřejmé, neboť lidé vyléčení, resp. ti, kteří prodělali CL, získávají doživotní imunitu (minimálně) vůči *Leishmania spp.,* kterým byli infikováni. Na druhé straně i přes značné úsilí doposud nebyla vyvinuta a schválena žádná vakcína proti leishmanióze. Zatím pouze existuje několik studií, které se jejím vývojem zabývají. Vakcíny, které již byly vyvinuty a testovány, se dají rozdělit do tří skupin – vakcíny první, druhé a třetí generace. Do první generace patří využití mrtvých buněk parazitů *Leishmania*, frakciovaných antigenů *Leishmania* a živých atenuovaných buněk.[35] Mrtvé buňky parazitů měly úspěch především v léčbě leishmaniózy u zvířat (psů) a zdály se být vhodným kandidátem i pro využití v lidské medicíně.[36] Avšak neuspěly v průběhu třetí fáze klinického testování kvůli své malé účinnosti.[37] Existují dva prototypy využívajících frakciovaných antigenů CaniLeish a Leishmune. Tyto vakcíny jsou využívány v prevenci u psí leishmaniózy a zabraňují také jejímu přenosu ze psa na člověka.[38] Právě frakciované vakcíny by se asi daly využít především v nejvíce ohrožených oblastech.[39] Přípravek Leishmune je založen na ligandu fukosy-manósy (FML) a saponinu jako adjuvantu. FML je exprimován ve všech cyklech *Leishmanie,* a proto může být použit jako vhodný antigen u psí a lidské sérodiagnostiky. FML užité v Leishmune byly purifikovány z promastigotů *L. donovani*.[38] CaniLeish je jedinou schválenou vakcínou v Evropě (užití u zvířat). Tato vakcína byla připravena z extrahovaných sekretovaných proteinů *L. infantum.* U psů očkovaných takto připravenou vakcínou se imunitní odpověď vyvinula již během 3 týdnů od aplikace.[35]

Živé atenuované buňky parazitů byly taktéž testovány na zvířecích modelech. Tito parazité jsou přijímáni hostitelskými buňkami podobným způsobem jako virulentní parazité a přetrvávají v nich určitou dobu bez replikace, což umožní hostiteli vyvinout imunitní odpovědi proti parazitickým antigenům. Právě radiologicky oslabení a biochemicky pozměnění parazité poskytovali myším nejlepší ochranu, avšak možnost jejich přeměny zpět na virulentní znemožňuje jejich použití u lidí. Cílená eliminace genů virulence by pak mohla být vhodnou cestou, jak překonat tento problém.[34]

Do vakcín druhé generace se řadí rekombinantní proteiny, které jsou připraveny pomocí geneticky upravených buněk. Bylo připraveno několik rekombinantních proteinů, které ale našly využití zatím pouze u zvířat. Jeden z nich je protein Leish-111F, který je kódován třemi geny – *L. major* homologem eukaryotického thiol-specifického antioxidantu, *L. major* protein-1, induktorem stresu a *L. braziliensis* elongančním

a iniciačním faktorem. V kombinaci s adjuvans monofosforyl lipidem A (MPL-SE) vykazoval ochranné účinky u myší trpících viscerální nebo kožní leishmaniózou, ale selhal u psů infikovaných *L. infantum*.[34] Navzdory tomu se jedná o prvního kandidáta na vakcínu proti leishmanióze u lidí a byl již testován na dobrovolnících v Americe, u kterých účinně indukoval ochrannou imunitu u zdravých jedinců.[35]

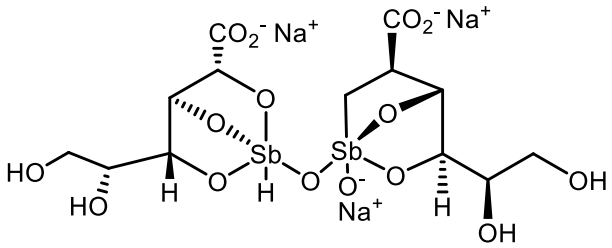
Třetí generaci tvoří DNA vakcíny, jejichž výhodou je nízká cena, trvalá exprese vložených antigenů a účinné vytvoření efektorových a paměťových imunitních odpovědí.[40] Navíc jediným konstruktem může být produkováno i více antigenů. A pokud nedochází k metylaci na CpG ostrůvcích u bakteriální DNA, tato vakcína by nám měla poskytnout i další výhody jako je aktivace k produkci interleukinu-12, který může připravit $CD4^+$ T-buňky na jejich transformaci na Th1 buňky.[41]

Vakcinace je nejefektivnějším způsobem, jak kontrolovat tento typ infekčního onemocnění. Abychom ale vyvinuli úspěšnou vakcínu, tak musíme nejprve pochopit imunobiologické interakce mezi patogenem-hostitelem, vybrat vhodného kandidáta, ze kterého budeme brát patogenní informaci, a i zvolit správné adjuvans/nosiče pro vybranou vakcínu. Kromě toho musí být vakcína schopna vyvolat dlouhodobou imunitu a musí být identifikovány všechny typy imunitní ochrany, které vakcína produkuje, ohodnotit účinnost vakcíny a vyzkoušet ji v klinickém testování na lidech. Jedním z hlavních důvodů, proč vývoj vakcinace proti leishmanióze trvá tak dlouho, je velké množství parazitů, kteří musí jít touto vakcínou zabít. V ideálním případě by totiž měla být vyvinutá vakcína, která bude účinná proti všem druhům.[34]

2.1.4.2 Chemoterapie

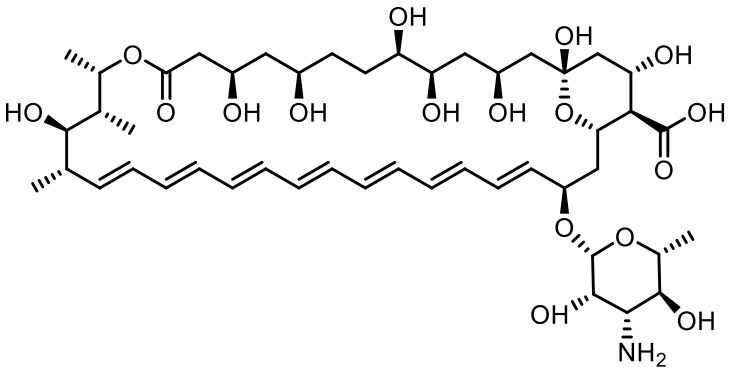
Zatím nejúčinnější možností léčby leishmaniózy je chemoterapie. Nejčastěji používaná léčiva jsou pentavalentní antimoniání látky, amfotericin B, miltefosin a paromomycin.[1] Pentavalentní antimoniální látky jako antimonoglukonát sodný (Obr. 7) a meglumin antimoniát jsou standardní léčbou pro kožní a viscerální formu leishmaniózy již od 60. let 20. století.[42] Jsou podávány jak intramuskulárně, tak intravenózně. Bohužel intramuskulární cesta je velmi bolestivá a léčivo vykazuje mnoho vedlejších účinků jako je nauzea, slabost a také hepatotoxicitu a kardiotoxicitu.[43] V dnešní době jejich využití limitováno zvyšující se rezistencí parazitů v endemických oblastech vůči této léčbě.[44] Mechanismus účinku antimoniálních látek nebyl prozatím zcela objasněn. Pravděpodobně jejich antileishmaniální účinek závisí na *in vivo* redukci formy Sb^V na toxičtější Sb^{III}, který následně přítomné parazity otráví. Bylo prokázáno, že vůči Sb^V jsou citliví pouze amastigoti.[45] Působení Sb^V ovlivňuje bioenergetiku parazita *Leishmania* za inhibice glykolýzy, ß-oxidace mastných kyselin a inhibice fosforylace

ADP.[46] Bylo také zjištěno, že může způsobovat nespecifické blokování SH skupin na proteinech amastigotů, čímž způsobuje inhibici topoizomerásy I.[47]



Obr. 7: Struktura antimonoglukonátu sodného.

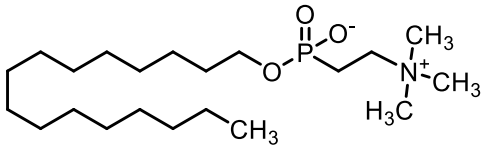
V důsledku zvyšující se rezistence parazitů na pentavalentní antimoniální látky se začal využívat amfotericin B (Obr. 8). Tato látka je v dnešní době užívána jako hlavní lék pro léčbu viscerální leishmaniózy, ikdyž i u amfotericinu B se začíná objevovat rezistence.[48] Amfotericin B je antimykotické antibiotikum s makrolidovým skeletem, které bylo objeveno již v roce 1956 v bakterii *Streptomyces nodusus*.[49] Leishmanicidní aktivita amfotericinu B je způsobena jeho selektivitou k substituovaným sterolům, konkrétně ergosterolu. Tato selektivita umožňuje v savčích buňkách zvýšit selektivitu léčiva vůči mikroorganismu. Parazitické buňky jsou pak zničeny díky otevření transportních pórů v buňce pro kationty a anionty. Toto má za následek perforaci buněčných stěn.[50] Hlavním limitujícím faktorem u amfotericinu B je jeho vysoká toxicita a špatná vstřebatelnost v gastrointestinálním traktu. Proto byla vyvinuta lipidická forma amfotericinu B, AmBisome, který má nižší toxicitu a také vykazuje výrazněji větší účinnost.[51]



Obr. 8: Struktura amfotericinu B.

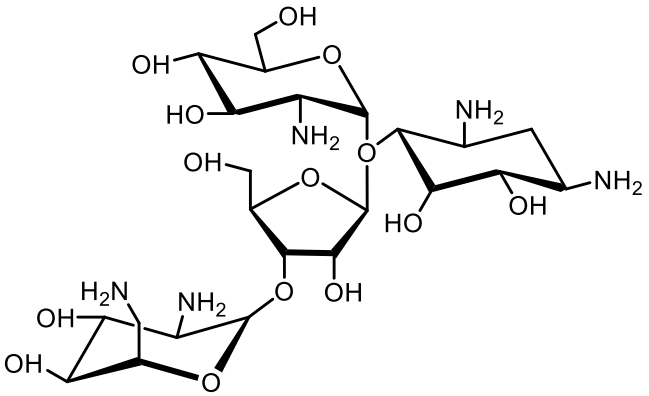
Miltefosin (Obr. 9) je prvním a prozatím jediným léčivem, které je podávané orálně pro léčbu viscerální leishmaniózy. Jeho účinky byly prokázány jak u imunokompetentních pacientů, tak u pacientů imunokompromitovaných.[52]

Miltefosin působí na savčí buňky tak, že způsobuje modulaci receptorů na buněčném povrchu, ovlivňuje metabolismus inositolu, aktivaci fosfolipázy, proteinkinásy C a dalších mitogenních drah. Jeho vliv vede k ,,rozhašení“ systému, které nakonec vyvrcholí apoptózou.[53] Bohužel však jako vedlejší efekty jsou u miltefosinu pozorovány nejenom poruchy v gastrointestinálním traktu a renální toxicita (reverzibilní symptomy), ale navíc i teratogenní vlastnosti. Proto jeho podávání je zakázáno pro ženy v těhotenství a u žen v plodném věku.[54]



Obr. 9: Struktura miltefosinu.

Paronomycin (Obr. 10) je aminoglykosidový aminocyklitol, který je produkován bakterií *Streptomyces riomosus*. Je účinný proti širokému spektru bakterií a prvoků.[49] Jeho antileishmaniální aktivita byla prokázána v šedesátých letech minulého století.[55] Ačkoliv je poměrně špatně absorbován v těle při orálním podání, pakliže je podán intramuskulárně, absorbuje se velmi dobře.[49] Jeho mechanismus účinku není zcela objasněn, ale bylo prokázáno, že u prvoků inhibuje syntézu proteinů vazbou na 30S ribozomální podjednotku. Fixací 30S-50S ribozomální podjednotky na start kodon mRNA způsobuje vznik abnormálního iniciačního komplexu.[56] Mezi běžné vedlejší účinky paronomycinu patří ototoxicita a problémy s funkcí jater.[57] U pacientů, kteří byli léčeni paronomycinem ve formě masti, se může objevit vyrážka, svědění a otoky.[58]



Obr. 10: Struktura paronomycinu.

Jak jste si mohli všimnout, všechna léčiva využívaná na léčbu leishmaniózy mají problémy s toxicitou, dlouhou dobou léčby, vývojem rezistence a zejména pak vysokými náklady na výrobu.[1] Proto se vědci snaží vyvinout účinnou vakcínu.[34]

Lidé v rozvojových zemích, ve kterých není zajištěna dostatečná lékařská péče, anebo k ní nemají pacienti dostatečný přístup, se uchylují k vlastní léčbě leishmaniózy. Tyto způsoby léčení jsou však poměrně drastické a způsobují často velmi vážné zdravotní problémy. Například v Surinamu (Jižní Amerika) se lidé snaží léčit kožní formu leishmaniózy pomocí chemikálií, jako je chlor, kyselina z baterií, olovem, insekticidy či herbicidy. Ačkoliv se tyto chemikálie strukturálně zcela liší od léčiv používaných pro léčbu leishmaniózy, lidé věří, že jim tyto chemické, nebiomedicínské produkty mohou pomoci zlepšit jejich zdravotní stav. Bohužel výsledky této domácí léčby nejsou často více než příznivé (Obr. 11, D).[59]

Obr. 11: Spektrum klinických projevů kožní leishmaniózy. **A**: léze způsobená *L. tropica* (Kábul, Afganistán); **B**: mukózní leishmanióza způsobená *L. braziliensis* (Cochabamba, Bolívie); **C**: leishmanióza způsobená *L. tropica* (Kábul, Afgánistán); **D**: léze léčená kyselinou z baterie (Peru). Převzato z: Reithinger, R.; Dujardin, J. C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S., Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.*, **2007**, 7, 581–596, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.

2.2 VYBRANÉ SEKUNDÁRNÍ METABOLITY A JEJICH ANTIPARAZITICKÁ AKTIVITA

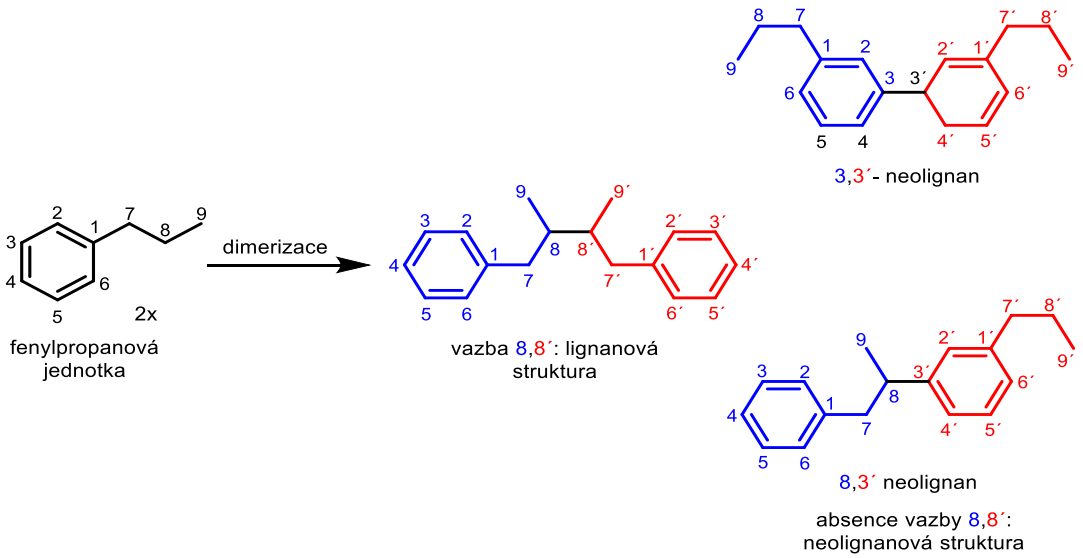
Rostliny vytváří rozmanitou škálu sekundárních metabolitů, díky kterým jsou chráněny před nejrůznějšími nepříznivými vlivy. Obecně sekundární metabolity pomáhají rostlinám např. v komunikaci s jinými organismy, chrání je před abiotickým stresem jako je například UV záření atp.[60] Proto jsou tyto metabolity důležitými složkami umožňující dobrý růst a vývoj rostlin.[61] Vývoj těchto metabolitů a jejich funkce jsou výsledkem odpovědi rostlin na patogeny a jejich okolí, která se vyvinula v průběhu mnoha miliónů let. K dnešnímu dni bylo identifikováno na 100 000 metabolitů, které se zapojují do rostlinného obranného systému a mnohé další jsou neustále objevovány.[62]

Nejvíce se v obranném systému rostlin uplatňují látky fenolického typu, zejména pak fenylpropanoidy a flavonoidy.[63] Většina z nich nese fenolické skupiny. Polyfenoly vytváří vodíkové vazby i silnější iontové i silnější iontové interakce, přičemž mění jeho konformační uspořádání. A tato změna pak vede k inaktivaci těchto proteinů. Tyto metabolity jsou schopny vytvářet kovalentní vazby s volnými hydroxylovými, sulfonovými či amino skupinami na proteinech a narušovat tak jejich prostorové uspořádání.[62]

2.2.1 Lignany a neolignany

Lignany a neolignany jsou rostlinné sekundární metabolity, které vznikají oxidativní radikálovou dimerizací fenylpropanoidů (Obr. 12).[64] Biosynteticky pak pochází z biosyntetické dráhy kyseliny šikimové (Obr. 13).[65] Dráha kyseliny šikimové by se dala popsat jako několika kroková enzymatická syntéza, která je spojena s produkty primárního metabolismu fosfoenolpyruvátem (PEP pocházejícím z glykolýzy) a D-erythro-4-fosfátem (E4P pocházejícím z pentózo-fosfátové dráhy). Probíhá uvnitř buněk v plastidech a její metabolická regulace je přednostně řízena na genetické úrovni.[66] Přesněji řečeno, lignany a neolignany pochází z dimerů dvou fenylpropanoidů vycházejících z metabolismu *L*-fenylalaninu.[67] Deaminací *L*-fenylalaninu vzniká kyselina skořicová a další hydroxylace pomocí enzymů cytochromu P450 vedou ke vzniku kyseliny *p*-kumarové a/nebo jejich analogů. Tyto produkty následně podstupují metylaci zavedených fenolických funkčních skupin, kterou zprostředkovává O-methyltransferása. Tímto způsobem vznikají deriváty kyseliny skořicové, což jsou základní monomerní podjednotky fenylpropanoidů. Tuto skupinu karboxylových kyselin, odvozených od kyseliny skořicové, lze pak dále redukovat za pomoci acetyl koenzymu A na aldehyd, respektive alkohol. Tyto tři skupiny sloučenin, deriváty kyseliny *p*-kumarové

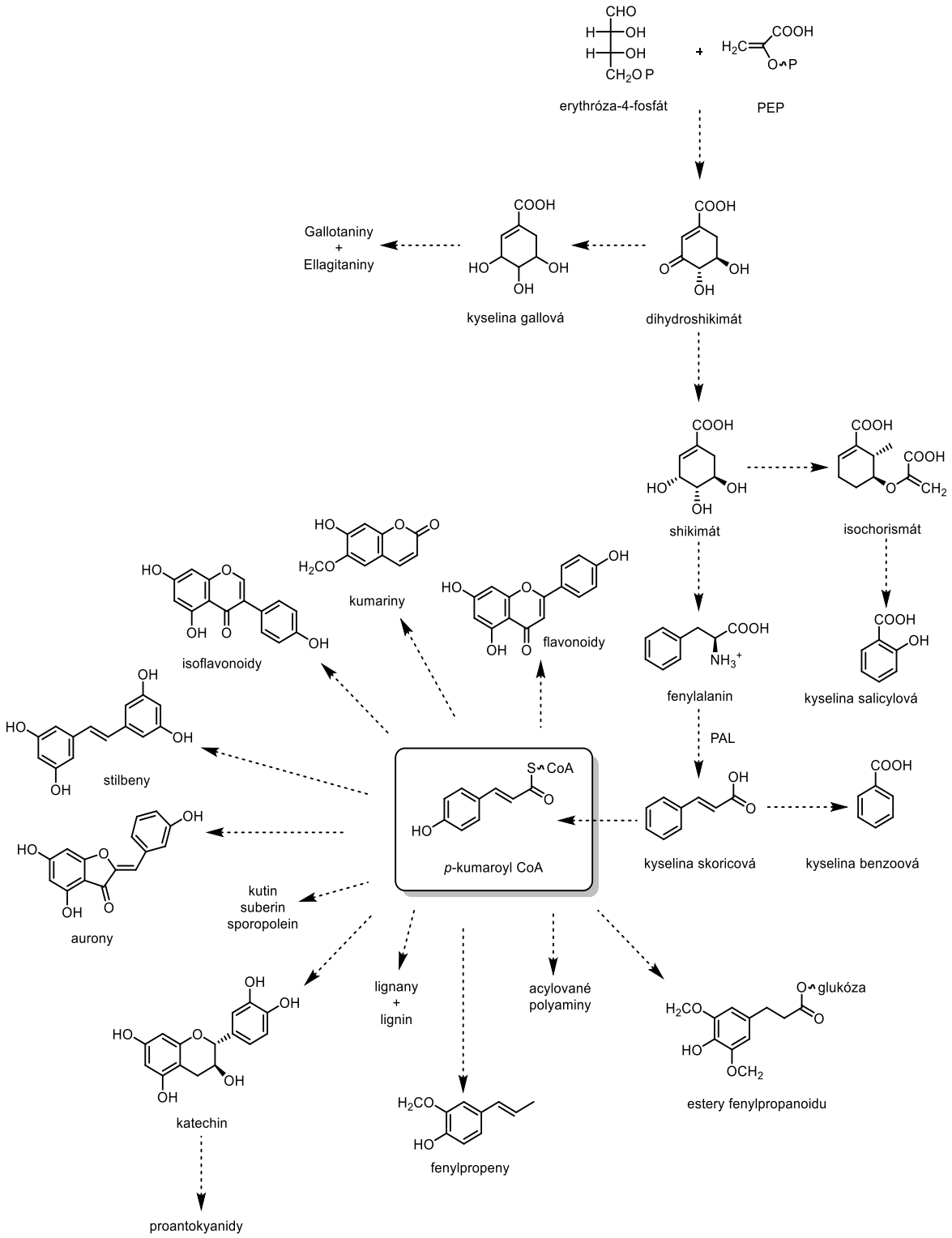
a z nich generované aldehydy a alkoholy, pak působí jako výchozí monomery v biosyntéze lignanů a neolignanů.[68]



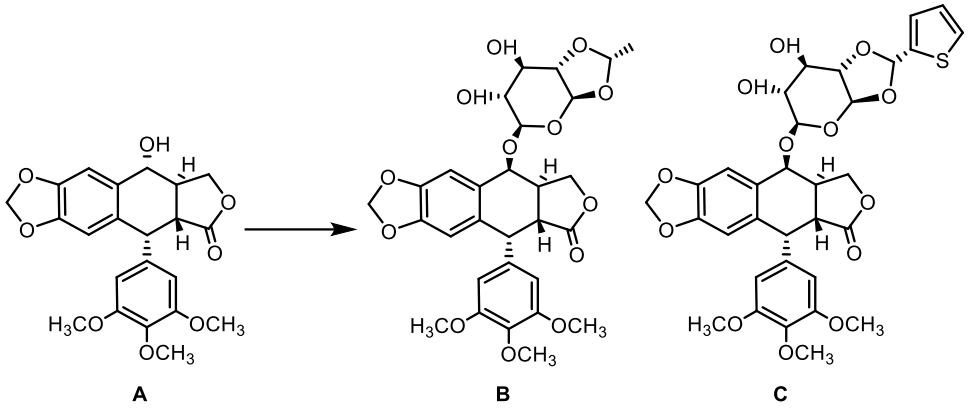
Obr. 12: Schéma vzniku lignanů a neolignanů. Převzato a upraveno z: Zálešák, F.; Bon D. J.-Y.; Pospíšil J., Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances, *Pharmacol. Res.*, **2019**, 146, 104284, doi:

U takto vzniklých látek byla prokázána rozmanitá biologická aktivita, od antioxidačních, antibakteriálních, protivirových, protizánětlivých účinků, až po účinky protinádorové nebo proti neurodegeneraci.[64] Nejznámějším lignanem je bezesporu podofylotoxin (Obr. 16), což je jeden z mála toxických lignanů získaný z výtažků z kořene rostliny mnoholistu štítnatého *(Podophyllum peltatum)*.[69] Extrakty s touto látkou se využívají k léčbě genitálních bradavic. Bohužel vykazuje mnoho vedlejších účinků,[70] jako například svědění, pálení a odlupování kůže v oblasti místa aplikace. Při jeho dlouhodobé aplikaci může dojít k utlumení centrálního nervového systému.[71] Biologické vlastnosti podofylotoxinu byly ale zkoumány detailně a bylo zjištěno, že se váže na tubulin a destabilizuje tím mikrotubuly, čímž zabraňuje dělení buněk.[72] Další modifikace podofylotoxinu cílící na jeho méně toxické modifikace vedly k přípravě dvou derivátů – etoposidu a teniposidu (Obr. 14), které se následně dostaly až do praxe a jsou využívány k léčbě rakoviny kůže.[64] Deriváty se od sebe odlišují zejména stereogením centem na uhlíku C4 a začleněním D-glukózy do postranního řetězce. Obě tyto změny mají za následek změnu v mechanismu účinku obou derivátů. Etoposid a teniposid reagují s topoizomerásou II, čímž zabraňují opětovné ligaci řetězců DNA. U etoposidu se ale vytvoří komplex mezi DNA

a enzymem[73] a u tenoposidu dochází ke stabilizaci meziproduktu topoizomerásy II a DNA během procesu zesíťování DNA a proteinu.[74]

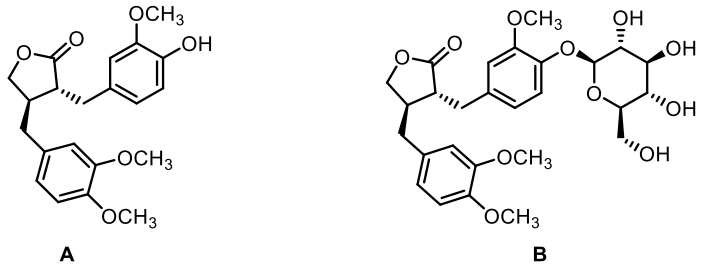


Obr. 13: Biosyntetická dráha kyseliny šikimové. Převzato a upraveno z: Vogt, T., Phenylpropanoid biosynthesis, *Mol. Plant.,* **2010**, 3, 2–20, doi: 10.1093/mp/ssp106.



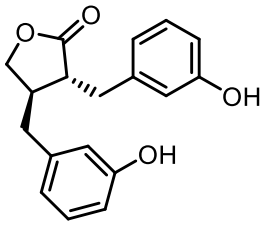
Obr. 14: Podofylotoxin (**A**) a jeho deriváty etoposid (**B**) a teniposid (**C**).

Dalším významným lignanem je (–)-arctigenin (Obr. 15), který můžeme nalézt ve výtažcích z lopouchu většího *(Arctium lappa)*, který se využívá v japonské medicíně pro své antioxidační, antivirové a protizánětlivé účinky.[75] Jeho mechanismus účinku spočívá v blokaci aktivace proteinu kinásy B, která je indukována nedostatkem glukózy u rakovinných buněk slinivky PANC-1.[76] U jeho glukózového konjugátu arctiinu (Obr. 15) byly prokázány antivirové účinky proti chřipkovému viru A a také vykazoval protizánětlivé účinky. Při jeho vstřebávání, pokud jsou přítomny střevní bakterie, může být metabolizován na bioaktivní metabolity jako je právě arctigenin a enterolakton.[77]



Obr. 15: Arctigenin (**A**) a jeho biokonjugát arctiin (**B**).

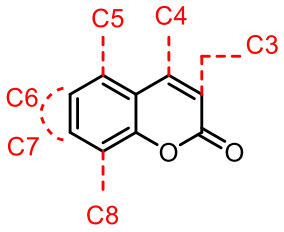
Skupina lignanů tvořící enterolaktony (Obr. 16), konkrétně obsahující difenolové zbytky a jejich biokonjugáty s glukózou, jsou savčími fytoestrogeny. Tyto látky jsou schopné inhibovat nádorové buňky tlustého střeva a proliferaci nádorových buněk prsu.[78] Mechanismus působení je pravděpodobně způsoben schopností lignanů soutěžit s ligandy estrogenových receptorů II typu a tím indukovat globulin vázající pohlavní hormony a inhibovat placentární aromatásu, čímž působí jako antioxidanty.[79]



Obr. 16: Enterolakton.

2.2.2 Kumariny

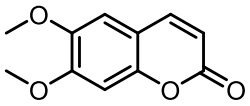
Kumariny se vyskytují jako sekundární metabolity především u rostlinných čeledí jako jsou routovité, miříkovité, hvězdnicovité a bobovité. Vznikají při biosyntéze fenylpropanoidů, kdy se do klasické shikimátové dráhy zapojují i ostatní dráhy a vznikají tak strukturně diverzní kumariny s prenylovanými zbytky, kondenzované furokumariny, pyranokumariny, glykosylované kumariny, methylendioxy kumariny a mnoho dalších (Obr. 17). U všech těchto skupin byla prokázána leishmanicidní aktivita a zároveň i další antiparazitální aktivita.[80] Tato aktivita se neomezuje pouze na substituované kumariny, ale byla prokázána i u nesubstituovaného jádra kumarinu. Jeho výtažky izolované z kmenové kůry *Amburana cearensis,* rostliny z čeledi bobovitých, byly *in vitro* testovány na antileishmanitální, antimalarickou, antifungální i antibakteriální aktivitu. Tento kumarin byl izolován z methylen chloridového extraktu a vykazoval aktivitu proti *L. amazonensis, L. braziliensis* a *L. donovani.* Tyto druhy jsou zodpovědné především za kožní, viscerální a mukokutánní formu leishmaniózy.[81]



Obr. 17: Obecné schéma kumarinu s možností substituce v pozicích C3 – C8.

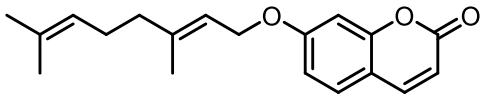
Scoparon (Obr. 18) je dimethoxylovaný kumarin, který byl izolován z *Platymiscium floribundum,* další rostliny z čeledi bobovitých. Tato látka byla testována na promastigotech *L. mexicana, L. major* a *L. donovani*, přičemž nejcitlivěji na ni reagovala *L. mexicana*.[82] Kromě antileishmaniální aktivity se také zkoumala jeho schopnost inhibovat acetylcholinesterásu. Na základě experimentů bylo zjištěno, že inhibice tohoto enzymu vede k nedostatečnému vychytávání cholinu hostitele parazitem. Cholin je nezbytný pro syntézu fosfatidylcholinu, což je fosfolipid,

který je součástí povrchových membrán a cytoplazmy *Leishmania.* Proto se inhibice acetylcholinesterásy scoparonem jeví jako vhodný mechanismus účinku pro narušení buněk parazita u tohoto typu látky.[83]



Obr. 18: Struktura scoparonu.

Aurapten (Obr. 19), prenylovaný kumarin izolovaný z listu rostliny *Esenbeckia febrifuga* (routovité), vykazoval antiproliferační účinek proti promastigotům *L. major*. Růst promastigotů byl jeho aplikací výrazně inhibován, a navíc u nich byly pozorovány i další morfologické změny jako zvětšené vakuoly a snížená hybnost bičíků.[84] Zkoumání podobných struktur, ale s delšími postranními řetězci, prokázalo možnou korelaci mezi délkou postranního hydrofobního řetězce a růstem inhibice promastigotů *L. major.*[85]

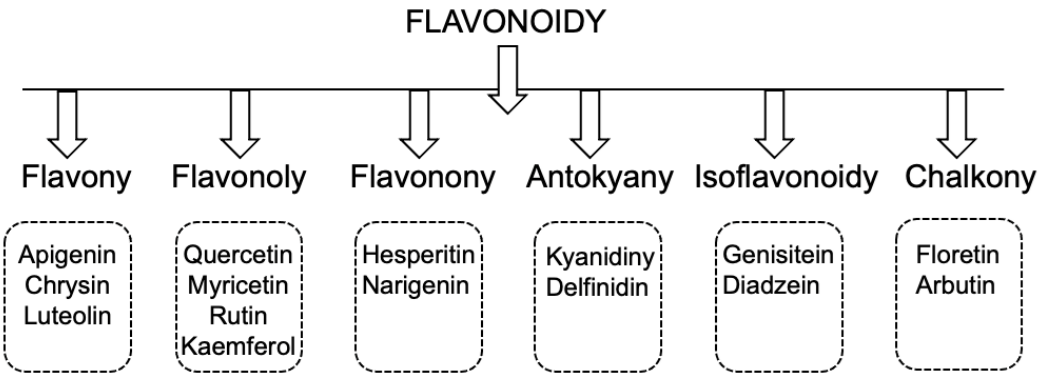


Obr. 19: Struktura auraptenu.

2.2.3 Flavonoidy

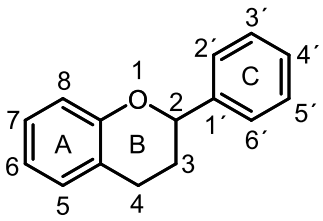
Flavonoidy jsou skupinou sekundárních metabolitů, které mají podobně jako lignany polyfenolovou strukturu. V rostlinách se vyskytují v hojném množství a mají také značnou biologickou aktivitu. Bylo prokázáno, že jsou aktivní na mnoha biologických cílech, ovlivňujících jak kardiovaskulární, tak neurologické aktivity a to jak rakovinného typu, tak i u kožních nemocí. Jedná se tedy o terapeuticky aktivní látky, které mají také antioxidační účinky a jsou tedy schopné vychytávat volné radikály.[86]

Flavonoidy (Obr. 20) se rozdělují do mnoha tříd, kde mezi ty hlavní patří flavony, flavonoly, flavonony, antokyany, isoflavonoidy a chalkony. Tyto skupiny se pak dále dělí do mnoha podskupin.[86]



Obr. 20: Klasifikace flavonoidů. Převzato a upraveno z: Chandrasekar, R.; Subasish, D.; Sivagami, B.; Jayasree, P.; Niranjan, B. M., Therapeutic Efficacy of Flavonoids and Terpenoids an Ongoing Herbal Therapy in the Treatment of Leishmaniasis, *Nat. Prod. Ind. J.*, **2018**, 14, 124.

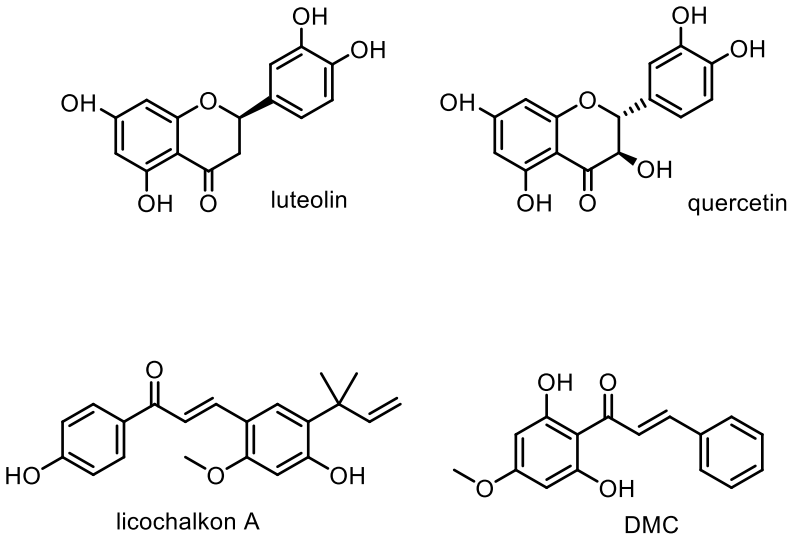
Flavonoidy obsahují C6-C3-C6 strukturní motiv (Obr. 21), kde C6 je benzenový kruh, a navíc jedna či více z fenolových skupin může být přímo spojena s cukernou složkou. Hydroxylové skupiny se obecně nacházejí v polohách 5 a 7 u A kruhu a B kruhu, a obsahují dodatečný počet alkylových skupin. Kruh A je kondenzován na heterocyklický kruh B, který je pak připojený ke kruhu C.[86]



Obr. 21: Obecná struktura flavonoidu.

Mezi flavonoidy, které byly izolovány z rostlin a byla u nich prokázána účinnost proti parazitům, patří luteolin a quercetin (Obr. 22).[87] Dle výsledků není quercetin toxický pro lidské T-buňky a může působit jako inhibitor topoisomerásy I.[88] Flavonoidem působícím proti amastigotům *L. donovani* a promastigotům *L. major* je licochalkon A (Obr. 22), který byl izolován z čínské lékořice. U křečků nakažených *L. major* byl prokázán výrazný účinek licochalkonu A na amastigotech ve slezině a játrech. Mechanismus působení byl popsán jako působení na ultrastrukturu mitochondrií parazita a nebyla u něho prokázána škodlivost pro lidské lymfocyty, leukocyty a monocyty.[89] 2‘,6‘-dihydroxy-4‘-methoxychalkon (DMC) (Obr. 22) byl izolován z výtažků pepřovníku *(Piper aduncum)* a byly u něho prokázány účinky proti *L. amazonensis*.[90] Nitrosylací DMC

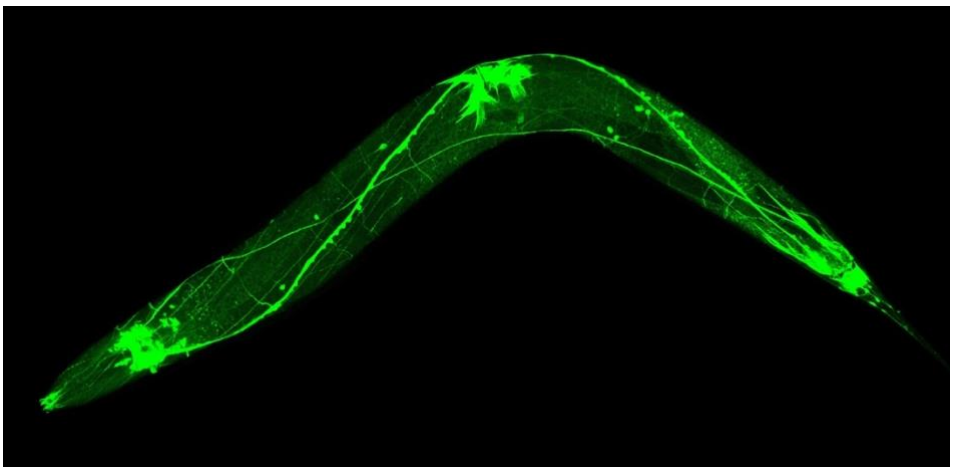
a jeho začleněním v podobě nanočástic byly pozorovány účinky srovnatelné se standartně používanými léčivy – amfotericinem B.[91]



Obr. 22: Struktura luteolinu, quercetinu, licochalkon A, a DMC.

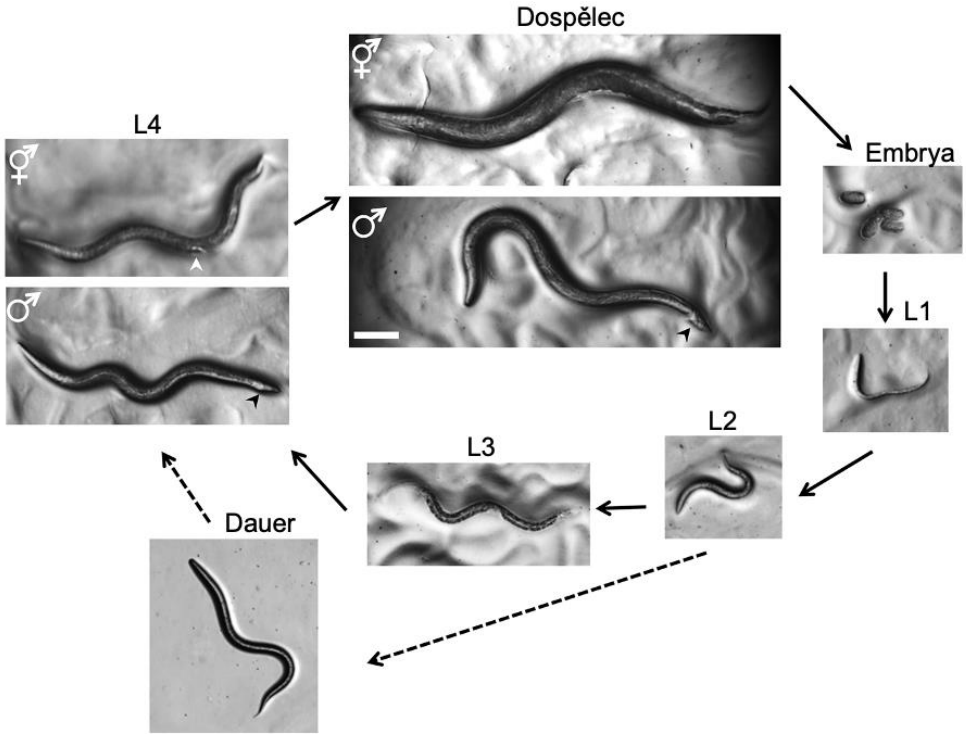
2.2.4 CAENORHABITIS ELEGANS – JAKO MODELOVÝ SYSTÉM PRO TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

Protože část této diplomové práce zahrnuje hodnocení antihelmintické aktivity připravených látek, přičemž u jedné z připravených látek byla tato aktivita naměřena, dovoluji si zde vložit podkapitolu o *Caenorhabitis elegans*, které bylo k tomuto účelu použito. *C. elegans* neboli háďátko obecné je nepatogenní půdní červ o délce 1 mm, který patří do kmene hlístic (Nematoda). Tento celosvětově se vyskytující průhledný červ je již více než 50 let využíván jako genetický model pro výzkum v oblasti vývojové biologie a neurobiologie, a to především kvůli bezpečné, levné a jednoduché manipulaci.[(int6)] Jedná se také o první mnohobuněčný organismus, u kterého byl poprvé osekvenován celý genom.[92] Je izolovatelný z hnijících částí rostlin, které jsou bohaté na bakterie.[93] V laboratoři se pak dá pěstovat na agarových plotnách bohatých na bakterie *Escherichia coli*. Pokud dojde k vyčerpání živin v podobě bakterií, je pozastaven vývoj červů v alternativním L3 larválním stádiu zvaném *dauer*. V takovém stavu mohou vydržet měsíc, při vhodné teplotě (15 °C) až šest měsíců. Díky průhlednosti *C. elegans* je možné mimo jiné sledovat jednotlivé změny na úrovni buněk pod mikroskopem za využití např. fluorescenčních proteinů (Obr. 23).[(int6)]



Obr. 23: Anatomie nervové soustavy *C. elegans* zvýrazněná pomocí GFP (green-fluorescent protein*).* Převzato z internetového zdroje (7).

Za vhodných podmínek (20 °C) se *C. elegans* vyvíjí poměrně rychle (3 dny), celkem prochází od vajíčka čtyřmi larválními stádii (L1-L4) (Obr. 24). Obvykle se vyskytuje jako hermafrodit, který je schopen sám sebe oplodnit, zřídka se pak vyskytují i samci. Hermafroditi jsou samičky, které dočasně produkují spermie, než začnou produkovat oocyty. Obecně hermafroditi produkují o něco méně vlastních potomků, než když jsou spojeni se samci.[94] Po oplození se vytvoří nepropustná skořápka, která embryu umožní vyvíjet se zcela nezávisle na matce. Část vývoje embrya probíhá uvnitř těla hermafrodita, po nakladení vajíček je vývoj dokončen a líhnou se larvy (L1). Mezi jednotlivými stádii je pak spánkové období, tzv. letargus, ve kterém je vytvořena nová kutikula.[95] Letargus končí svlékáním staré kutikuly, poté se vyvinou jedinci (L4) a přibližně po dobu 3 dnů jsou schopni produkovat potomstvo, dokud nevyužijí všechny své vlastní spermie.[(int6)]



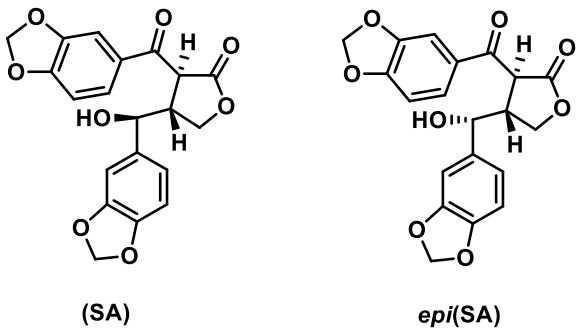
Obr. 24: Vývojová stádia *C. elegans*. Převzato a upraveno z internetového zdroje (8).

Jak bylo již zmíněno výše, *C. elegans* je vhodným modelem eukaryotické biologie nejen pro genetické studie. Hlavní výhody jsou jeho celková malá velikost, a naopak velký počet potomků, snadná kultivace, nízké náklady na údržbu, průhlednost, neměnný počet buněk a vývoj. Díky tomu, že jsou volně žijící, jsou dobře dostupní a práce s nimi nepředstavuje žádné riziko.[(int6)] Pro pochopení patogeneze některých lidských onemocnění se využívají většinou savčí modely, avšak využití nesavčích modelů není úplně nová záležitost. Právě *C. elegans* také přispělo jako nástroj pro hledání genů způsobujících vznik lidských chorob. Studie, které využívají tento jednoduchý organismus, totiž nabízejí dobrou rovnováhu mezi schopností rekapitulovat mnoho aspektů lidských nemocí a stále nabízejí množství výkonných buněčně biologických, genetických a genomických nástrojů pro objevování genů zodpovědných za vznik nemoci.[96]

2.3 PŘEDCHÁZEJÍCÍ VÝSLEDKY VE SKUPINĚ

2.3.1 Syntéza Sanguinolignanu A – výstřel na slepo, co zasáhl cíl

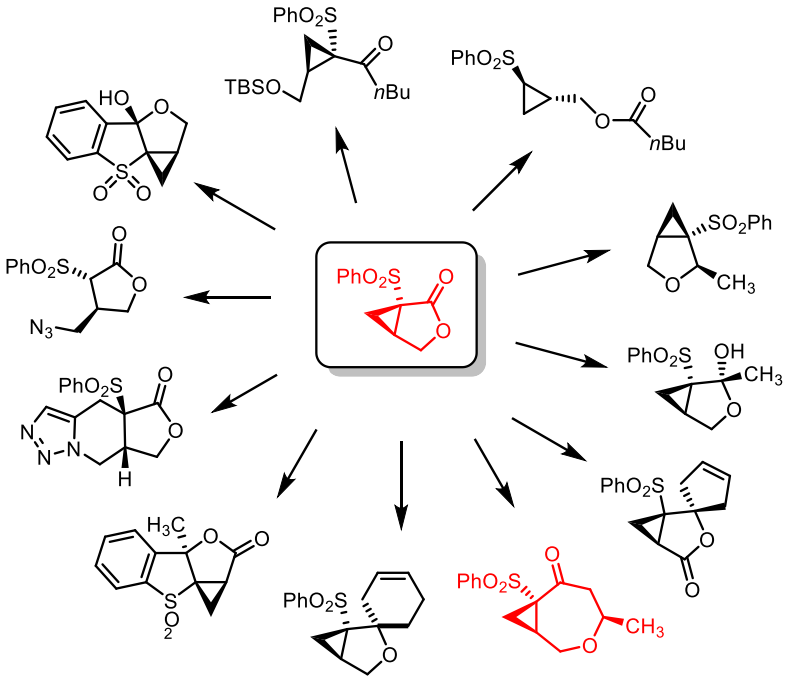
Tato práce volně navazuje na předchozí výzkum naší skupiny, kterým se zabývala Dr. Koutská (Konrádová) ve svých závěrečných pracích (diplomová a doktorská práce). Práce vycházela ze známých údajů o látkách s leishmanicidními vlastnostmi, které jsou součástí tradiční léčby v některých zemích (např. Latinská Amerika) a vychází z extraktů lokálních rostlin. Tyto rostliny obsahují mnoho sekundárních rostlinných metabolitů s různým chemickým složením. A tato rozmanitost je pak výchozím bodem pro potenciální vývoj nových léčiv právě z těchto struktur.[97] Zajímavé a potencionálně využitelné látky poskytují například rostliny z čeledi *Piperaceae* (pepřovníkovité). Analýzy extraktů z rostlin rodu *Piper* odhalily látky s antiprotozoálními i antileishmaniálními účinky. Účinné protizánětlivé látky obsahuje ve svých listech rostlina *Piper sanguinespicum*. Právě z této rostliny byl izolován (–)-sanguinolignan A (SA) (Obr. 25), u něhož byly prokázány antileishmaniální účinky.[98] Prvotním krokem předcházející práce ve skupině byla tedy syntéza SA a potvrzení jeho struktury, která byla do té doby určena pouze na základě NMR strukturní analýzy. SA patří strukturně do skupiny lignanů, a právě i jeho podobnost s jinými sekundárními rostlinnými metabolity lignanového typu se stala zajímavým lákadlem pro naši výzkumnou skupinu. Pro přípravu SA byly použity dva různé přístupy – (a) cíleně orientovaná syntéza (Target-Oriented synthesis – TOS) a (b) diverzitně orientovaná syntéza (Diversity-Oriented synthesis – DOS). Výsledkem využití těchto postupů byla příprava různých derivátů fenylpropanoidů a kumarinů a intermediátů nezbytných k syntéze SA.[99] Kromě antileishmaniální aktivity u SA byla pozorována aktivita i u jeho epimeru *epi*-SA (Obr. 25), avšak tato aktivita nebyla významná proti parazitům *Leishmania.*



Obr. 25: Struktura sanguinolignanu A a *epi*-sanguinolignanu A.

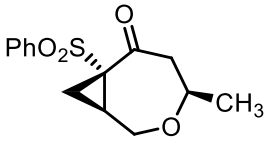
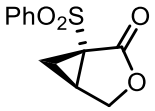
2.3.2 Syntéza a modifikace fenylsulfonyl laktonu

Po těchto zjištěních tedy došlo k návrhu strukturního motivu, jež by mohl být zodpovědný za pozorovanou biologickou aktivitu. Z pohledu strategie teď tedy byla syntéza různých derivátů původního SA založena na Schreiberově B/C/P (Build/Couple/Pair) principu, pomocí něhož byla připravena chemická knihovna látek.[100] Tato strategie je založena na přípravě jednoho strukturního derivátu jež následně slouží jako jakási mateřská molekula pro syntézu celé cílové knihovny. Jako takový byl zvolen plurifunkční fenylsulfonyl lakton (Obr. 26). Tento lakton je transformovatelný ve 3–5 krocích do strukturně rozmanitých látek – vede tedy k získání strukturně diverzních sloučenin potažmo knihovny (Obr. 26).[3] U těchto sloučenin byla vyhodnocena biologická aktivita, především leishmanicidní aktivita proti *L. major.* Ze 101 připravených sloučenin vykazovaly nejslibnější aktivitu 2 látky (viz. Obr. 26). Tyto látky inhibovaly 80–95 % parazitů (*L. major*). U těchto látek byla stanovena polovina minimální inhibiční koncentrace na základě sériového ředění od 50 μM do 0,097 μM (Tabulka 1).[100]

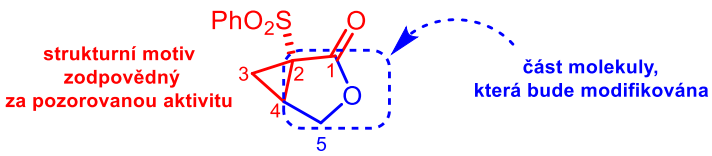


Obr. 26: Vybrané látky, které byly připraveny pomocí B/C/P přístupu. Struktury zvýrazněné červeně vykazovaly aktivitu proti *L. major.* Převzato a upraveno z: Konrádová, D.; Bon D. J.-Y.; Pospíšil J., 1-(Phenylsulfonyl)-3- oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-one as a Building Block in Organic Synthesis, *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 12229–12238, doi: 10.1021/acs.joc.8b01625.

Tabulka 1: Hodnoty získané z výsledků testování antileishmaniální aktivity (*L. major*). IC_{50} uvádí polovinu z maximální inhibiční koncentrace pro inhibici růstu daného buněčného cíle. (Převzato a upraveno z: Konrádová, D., Biologické aplikace sekundárních rostlinných metabolitů fenyl propanoidového původu, Olomouc, **2019**, disertační práce (Ph.D.), Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.)

Struktura	**IC_{50} [M]**	**IC_{50} [µM]**
	2,87E-06	2,868
	2,92E-06	2,917

Ve své práci jsem se tedy zaměřila na další modifikace tohoto typu fenylsulfonyl laktonu (Obr. 27), kde hlavní důraz byl kladen na strukturní motiv spojený s laktonovou částí (modrá barva). Původním cílem bylo ponechat u takto připravených látek netknutou cykopropanovou část, ale jak uvidí čtenář později, bohužel jsem i do tohoto strukturního motivu musela „sáhnout“. Všechny připravené látky byly otestovány na jejich antihelmintickou aktivity, ale jejich aktivita vůči *leishmaniálním* parazitům bude provedena až po ukončení mé diplomové práce.



Obr. 17: Fenyl sulfonyl lakton.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Pro jednotlivé kroky byly použity tyto chemikálie: bromacetonitril, benzensulfonová sodná sůl, methanolát sodný (NaOMe), (*S*)-(+)-epichlorhydrin, methyl 2-(trifenyl-λ^5-fosfanyliden)acetát, 1-(trifenyl-λ^5-fosfanyliden)propan-2-on, chlorid titaničitý ($TiCl_4$), magnésium (Mg), *n*-butyllithium, vinylmagnésium bromid, azid sodný (NaN_3), triethylamin (TEA), kyselina octová ledová (AcOH), jodid měďný (CuI), fenylacetylen, trimethylsilylacetylen (TMS), síran měďnatý ($CuSO_4$), askorbát sodný, terc-butylalkohol, propargyl amin, propargyl alkohol, di-*tert*-butyl-dikarbonát (boc anhydrid), benzylbromid, hydrid sodný (NaH), dimethyl(2-oxopropyl)fosfonát, 4-acetamidobenzensulfonyl, 4-(dimethylamino)benzaldehyd, 4-methoxybenzaldehyd, 4-chlorbenzaldehyd, uhličitan draselný (K_2CO_3), síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), dimethylsulfoxid (DMSO), methanol (MeOH), suchý tetrahydrofuran (THF), dichlormethan (DCM, CH_2Cl_2), dimethylformamid (DMF), ethylacetát (EtOAc), petrolether (PE), chloroform ($CHCl_3$), toluen a *n*-hexan od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner a Fluka. Všechny látky byly použity v takové čistotě, v jaké byly dodány, pakliže není uvedeno jinak. Nasycený vodný roztok NaCl, nasycený vodný roztok NH_4Cl a nasycený vodný roztok $NaHCO_3$ byly připraveny v Laboratoři růstových regulátorů technickým personálem.

3.2 METODY A MATERIÁL

Průběh všech reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 SIL G/UV_{254} s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel). Jednotlivé sloučeniny přítomny v reakční směsi byly vizualizovány pomocí vizualizačního roztoku $KMnO_4$.

Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu 34 od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Eluované frakce byly jímány po 20–30 mL a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce, které měly stejný obsah byly spojeny, zahuštěny na RVO a následně analyzovány pomocí spektrálních metod.

Spektra nukleární magnetické rezonance byla získána na přístroji Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz pracující při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Měření probíhala za laboratorní teploty a pro měření bylo použito deuterované rozpouštědlo – chloroform ($CDCl_3$). Kalibrace chemických posunů byla provedena na interní standard nebo signál reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla. Chemické posuny (δ, ppm) a štěpící konstanty (Hz) ^1H NMR spekter jsou uvedeny standardním způsobem vzhledem ke zbývajícímu $CHCl_3$ přítomnému v $CDCl_3$ (^1H = 7,27 ppm). ^{13}C NMR chemické posuny

(δ, ppm) jsou uváděny vzhledem k $CDCl_3$ (δC = 77,23 ppm, prostřední signál). Protonové interakce jsou reprezentovány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t), triplet tripletu (tt), pentet (p) a multiplet (m).

Hodnoty LC/MS byly získány za použití kapalinového chromatografu Agilent 1290 Infinity II s UV-VIS detektorem a hmotnostním detektorem Agilent InfinityLab LC/MS). Čistota konečných sloučenin byla stanovena dle následujícího postupu: 1 mg sloučeniny byl rozpuštěn v 1 mL 1% methanolu a vstříknut (10 µL) na kolonu s reverzní fází (Agilent 5Prep-C18 10x21,2 mm). Rozpouštědlo (A) bylo tvořeno vodou, rozpouštědlo (B) bylo tvořeno methanolem. Při průtoku 20 mL/min byl použit binární gradient: 0 min. 10% B; 0-10 min. lineární gradient na 90% B; 10–12 min. isokratické eluce 90% B; 12–13 min. lineární gradient na 10% B. Eluovaná fáze byla poté zavedena do UV-VIS detektoru. Kvartérní pumpa měla průtok 0,5 mL/min, mobilní fázi pak tvořil 15 mM mravenčan amonný: MeOH (50% MeOH). Hodnoty HRMS byly získány pomocí kvadrupolové iontové pasti hmotnostního analyzátoru Agilent 6230 Time-of-Flight, iontový zdroj DUAL AJS ESI, teplota desolvačního plynu: 260 °C, rychlost desolvačního plynu: 8 L/min, nebulizátor: 35 psi, teplota odpařujícího plynu: 350 °C, rychlost odpařujícího plynu: 11 L/min, napětí na kapiláře: 3500 V a napětí a kuželové napětí 300V. Sběr dat byl prováděn v režimu úplného skenování (100–1700 m/z) a data byla vyhodnocena v programovém softwaru MassHunter.

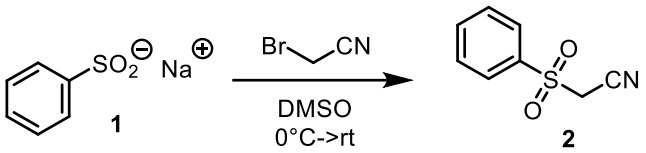
Body tání (b.t.) byly měřeny na přístroji B-540 Büchi® a nejsou korigovány. Měření optické otáčivosti probíhalo na polarimetru Pol A Ar 3001 a to tak, že vždy bylo rozpuštěno alespoň 10 mg dané látky v 1 mL rozpouštědla (CH_2Cl_2, $CHCl_3$). Měření probíhalo při vlnové délce 589 nm. Látky byly navažovány na analytických vahách značky AS 220.R2. Veškeré reakce probíhaly za pomocí laboratorní magnetické míchačky s ohřevem Heidolph MR 3001 K (Heidolph, Německo). Látky byly odpařovány a zahušťovány za použití vakuové rotační odparky Interface I-300 (Büchi, Švýcarsko).

Zásaditý vizualizační roztok $KMnO_4$ byl připraven rozpuštěním 9 g $KMnO_4$ a 20 g K_2CO_3 ve 150 mL 10% NaOH.

3.3 ORGANICKÁ SYNTÉZA

3.3.1 Syntéza fenyl sulfonyl bicyklolaktonu (**2**)

3.3.1.1 Syntéza 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu (**2**)

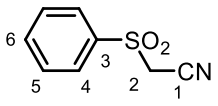


Benzensulfinová sodná sůl (14,1 g, 1,2 eq.) byla rozpuštěna ve 139 mL DMSO (0,5 M). Směs byla ochlazena na 0 °C a pomalým přikapáváním byl přidán bromacetonitril (5 mL, 1,0 eq.). Po 20 minutách byla odstraněna chladící lázeň a reakční směs byla ponechána se ohřát na l.t. Následně bylo k reakční směsi přidáno 150 mL H_2O a vodná fáze byla extrahována pomocí etheru (5x 200 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (100 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový meziprodukt, 2-(fenylsulfonyl)acetonitril (**2**) (4,81 g, 38 %), byl použit v dalším kroku.

B.t. 109,5–109,9°C

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

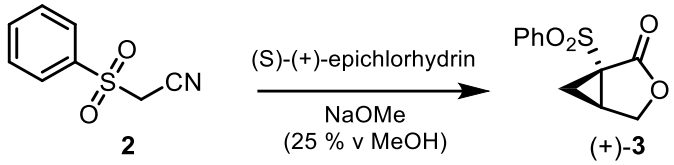
HRMS (ESI$^+$) *calcd.* pro $C_8H_8NO_2S$ $[M+H]^+$: 182.0270, nalezeno 182.0270.



Přiřazení signálů ^{1}H-NMR a ^{13}C-NMR spektra 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu 10

Atom	^{1}H NMR	(500 MHz, $CDCl_3$) [ppm]	Intenzita	^{13}C NMR	125 MHz, $CDCl_3$ [ppm]
1	-	-	-	C-1	110,5
2	H-2	4,06 (s)	2H	C-2	45,9
3	-	-	-	C-3	136,8
4	H-4	8,03 (dd, *J* = 8; 1,5 Hz)	2H	C-4	129,1
5	H-5	7,54–7,60 (m)	2H	C-5	130,0
6	H-6	7,79 (tt, *J* = 7,5; 1,5 Hz)	1H	C-6	135,6

3.3.1.2 Syntéza fenyl sulfonyl bicyklolaktonu (**2**)



Pro tuto reakci byl připraven čerstvý methanolát sodný (NaOMe). Na tříhrdlou baňku byl napojen chladič a přívod dusíku (N_2). Nejprve byla přidána pouze 1/3 z celkového potřebného objemu MeOH (100 mL), poté byl přidán Na (6 g, eq. 5,0). Reakce byla udržována při mírném varu a poté byl přidán zbytek objemu MeOH (156 mL). Po 30 minutách byla reakční směs zchlazena pomocí chladící lázně na 0°C a byl přidán 2-(fenylsufonyl)acetonitril (**1**) (9,27 g, eq. 1,0). Následně byla chladící lázeň odstraněna a směs byla míchána dalších 30 minut. Poté byl přidán po kapkách (S)-(+)-epichlorhydrin (5 mL, eq. 1,25). Reakční směs byla míchána 12 hodin a následně byla odpařena za sníženého tlaku. Poté bylo k reakční směsi přidáno 300 mL H_2O. Pomocí ledové kyseliny octové bylo upraveno pH reakční směsi na 4,0. Při tomto pH byla směs ponechána 12 hodin. Vodná fáze byla extrahována pomocí CH_2Cl_2 (3x 300 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (200 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1) a poskytl produkt (1*S*)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-on (**3**) (4,86 g, 39 %) ve formě světle žluté krystalické látky. Tento produkt byl použit v dalších reakcích.

α_D^{21} = +77,5° (c = 1,02, CH_2Cl_2)

B.t. = 113–114 °C

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

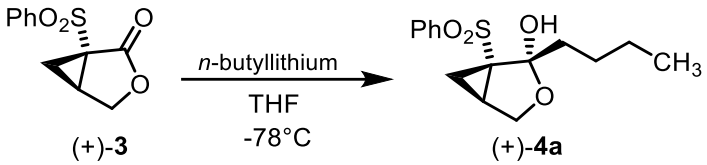
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 19.32, 26.62, 45.93, 66.90, 128.84, 129.06, 134.27, 138.06, 167.65

MS (ESI^+), *m/z* (%): 238 (M^+)

HRMS (ESI^+) *calcd.* pro $C_{11}H_{10}O_4S$ 238.0300, nalezeno 238.0299.

3.3.2 Reakce s fenyl sulfonyl bicyklolaktonem

3.3.2.1 Syntéza (1*S*)-2-butyl-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-olu (**4a**)



(+)-**3** (+)-**4a**

Za l.t. byl smíchán produkt z předchozí reakce, lakton (+)-**3** (250 mg, eq. 1,0) a THF (12,5 mL). Směs byla zchlazena na -78 °C a po 5 minutách bylo přidáno *n*-butyllithium (124 mL, eq. 1,25). Po 2 hodinách a 30 minutách byla odstraněna chladící lázeň a směs byla ponechána za l.t. ještě 30 minut. Následně byl k reakční směsi přidán NH_4Cl a vodná fáze byla extrahována pomocí DCM (3x 20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Byl získán produkt (1*S*)-2-butyl-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-ol ((+)-**4a**) (0,07 g, 22 %).

α_D^{20} = +117,3° (c = 0,11, CH_2Cl_2)

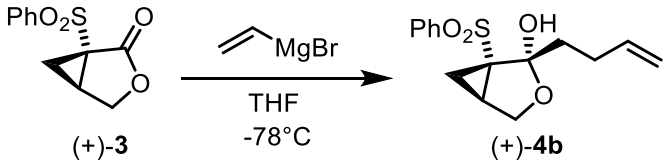
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.16 – 1.29 (m, 4H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.81 (dd, *J* = 10.2, 6.4 Hz, 1H), 1.88– 2.07 (m, 2H), 2.33 (tdd, *J* = 9.8, 7.6, 5.2 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 11.7, 9.5 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 11.7, 5.2 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.1, 5.6, 2.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.73 (m, 2H), 7.77 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) *δ* 13.8, 16.5, 22.8, 25.2, 25.4, 36.4, 52.2, 65.2, 104.1, 128.9, 129.2, 134.1, 139.5

MS (ESI^+), *m/z* (%) 279 $[M\text{-}OH]^+$ (100), 319 (25) $[M+Na]^+$

HRMS (ESI^-) *calcd.* for $C_{15}H_{19}O_4S$ $[M\text{-}H]^-$: 295.1010, found 295.1007.

3.3.2.2 Syntéza (1*S*)-2-(but-2-en-1-yl)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-olu ((+)-**4b**)



(+)-**3** (+)-**4b**

Za l.t. byl smíchán produkt z předchozí reakce, lakton (+)-**3** (500 mg, eq. 1,0) a THF (16,7 mL). Směs byla zchlazena na -78 °C a byl přidán vinylmagnésium bromid (5,29 mL, eq. 2,5). Po 1 hodině a 30 minutách byla odstraněna chladící lázeň a za l.t. byl přidán NH_4Cl (20 mL). Vodná fáze byla extrahována pomocí CH_2Cl_2 (3x 30 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL),

sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Byl získán produkt lakton (1*S*)-2-(but-2-1-yl)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-ol ((+)-**4b**) (3,14 g, 51 %).

α_D^{20} = +25,5° (c = 1,01 M, CH_2Cl_2)

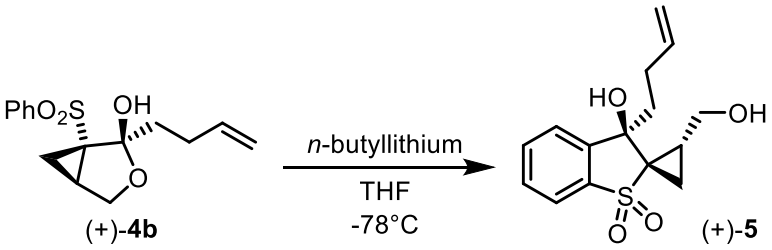
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) *δ* 1.22 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 1.94 (dd, *J* = 8.6, 5.3 Hz, 1H), 2.15 (ddt, *J* = 14.0, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 2.30 (ddt, *J* = 14.0, 7.7, 1.2 Hz, 1H), 2.52 (ddd, *J* = 10.0, 8.5, 7.3 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 4.06 (s, 1H), 4.85 (ddt, *J* = 17.2, 2.0, 1.4 Hz, 1H), 5.05 (ddt, *J* = 10.1, 2.0, 1.0 Hz, 1H), 5.65 – 5.76 (m, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.68 (tt, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 2H)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) *δ* 16.1, 25.4, 41.2, 51.9, 65.3, 103.2, 119.8, 129.1, 129.1, 131.7, 134.0, 139.9

MS (ESI), m/z (%) 264 $[M\text{-}OH]^+$ (100), 303 (15) $[M+Na]^+$

HRMS (ESI) *calcd.* for $C_{14}H_{15}O_3S$ $[M\text{-}OH]^+$: 263.0736, found 263.0737.

3.3.2.3 Syntéza 3-(but-3-en-1-yl)-3-hydroxy-2‘-(hydroxymethyl)-3*H*-spiro[benzo[b]thiofen-2-1‘-cyklopropan] 1,1-dioxidu ((+)-**5**)



Produkt z předchozí reakce alkohol (+)-**5** (300 mg, eq. 1,0) byl smíchán s THF (15 mL). Poté byla reakční směs zchlazena na -70 °C a po 45 minutách bylo po kapkách přidáno n-buthyllithium (1,5 mL, eq. 2,5). Následně byla zvýšena teplota na 0 °C a ponecháno při této teplotě dalších 30 minut, poté byla chladící lázeň ostraněna a bylo přidáno NH_4Cl (20 mL) a chladící lázeň byla odstraněna. Byla provedena extrakce DCM (3x 20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (20 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 4:1 → 2:1) a poskytl produkt 3-(but-3-en-1-yl)-3-hydroxy-2‘-(hydroxymethyl)-3*H*-spiro[benzo[b]thiofen-2-1‘-cyklopropan] 1,1-dioxid (+)-**5** (0,074 g, 24 %).

α_D^{20} = +12,5°(c = 1.23, CH_2Cl_2)

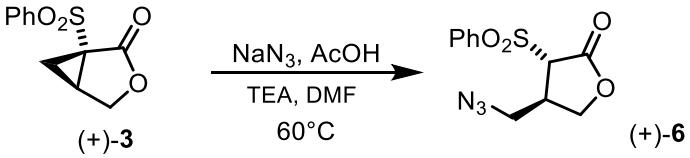
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.16 – 1.29 (m, 4H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.81 (dd, *J* = 10.2, 6.4 Hz, 1H), 1.88 – 2.07 (m, 2H), 2.33 (tdd, *J* = 9.8, 7.6, 5.2 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 11.7, 9.5 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 11.7, 5.2 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.1, 5.6, 2.7 Hz, 1H), 7.64 – 7.73 (m, 2H), 7.77 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 13.7, 13.9, 22.7, 25.7, 28.8, 41.3, 52.6, 60.6, 77.0, 120.8, 125.3, 130.1, 133.9, 136.8, 143.6

MS (ESI$^+$), *m/z* (%) 279 $[M\text{-}OH]^+$ (100), 319 (25) $[M+Na]^+$

HRMS (ESI$^-$) *calcd.* for $C_{15}H_{19}O_4S$ $[M\text{-}H]^-$: 295.1010, found 295.1007.

3.3.2.4 Syntéza (1*S*,5*S*)-5-(azidomethyl)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-onu – azid (+)-**6**



Byl smíchán produkt z předchozí reakce, bislakton (+)-**3** (0,5 g, eq. 1,0), NaN_3 (0,546 g, eq. 4,0), kyselina octová ledová (0,48 mL, eq. 4,0), DMF (7,0 mL, 0,7 M) a TEA (5,7 mL, eq. 20,0) za l.t. Reakční směs byla zahřáta na 70 °C a míchána při této teplotě 6 hodin. Poté byla odstraněna lázeň a výsledný surový produkt byl odpařen na RVO a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 10:1 → 5:1 → čistý EtOAc), přičemž poskytl produkt (1*S*,5*S*)-5-(azidomethyl)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-onu – azid (+)-**6** (0,471 g, 79 %).

α_D^{18} = +13,4 (c = 1,004 M, CH_2Cl_2)

B.t. = 240 °C (rozklad.)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.49 (dddd, *J* = 10.6, 8.0, 5.6, 5.0 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 12.5, 4.8 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 12.5, 5.7 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.15 (dd, *J* = 9.3, 5.1 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 9.3, 8.0 Hz, 1H), 7.58 – 7.69 (m, 2H), 7.70 – 7.81 (m, 1H), 7.94 – 8.03 (m, 2H)

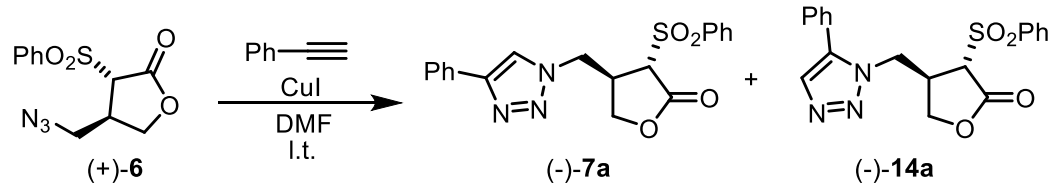
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 36.8, 52.0, 65.9, 69.2, 129.6, 129.7, 135.2, 136.6, 167.3

MS (ESI$^+$), *m/z* (%): 282 $[M+H]^+$ (22), 299 $[M+NH_4]^+$ (100)

HRMS (ESI$^+$) *calcd.* pro $C_{11}H_{12}N_3O_4S$ $[M+H]^+$: 282.0543, nalezeno 282.0544.

3.3.3 Click chemie – reakce azidu (+)-**6** s acetylenovými substráty

3.3.3.1 Reakce azidu (+)-**6** s fenylacetylenem



(+)-**6** (-)-**7a** (-)-**14a**

Za l.t. byl smíchán azid (+)-**6** (100 mg, 1,0 equiv.), CuI (6,77 mg, 0,1 equiv.), fenylacetylen (0,078 mL, 2,0 equiv.) a DMF (2 mL, 0,1 M). Reakční směs byla míchána za l.t. 12 hodin a poté bylo přidáno 15 mL NH_4Cl. Následně byla vodná fáze extrahována pomocí CH_2Cl_2 (3x 20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, DCM:EtOAc = 4:1 → 2:1) a poskytl dva produkty (3*S*,4*R*)-4-((4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3-(fenylsulfonyl)dihydrofuran-2-(3*H*)-on ((-)-**7**) (0,089 g, 65 %) a (3*S*,4*R*)-4-((5-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3-(fenylsulfonyl)dihydrofuran-2-(3*H*)-on (-)-**7** (0,083 g, 34 %).

α_D^{19} = -9,3° (c = 1,03, CH_2Cl_2)

(-)-**7a**

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) *δ* 3.84 (dq, *J* = 13.9, 6.6 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 9.5, 6.3 Hz, 1H), 4.66 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.72 (tt, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) *δ* 38.1, 50.4, 65.3, 68.8, 114.1, 126.0, 126.8, 128.9, 129.2, 129.6, 129.8, 130.2, 132.6, 135.4, 166.5

MS (ESI^+), *m/z* (%): 402 $[M+NH_4]^+$ (100)

HRMS (ESI^+) *calcd.* for $C_{19}H_{18}N_3O_4S$ $[M+H]^+$: 384.1013, found 384.1012.

(-)-**14a**

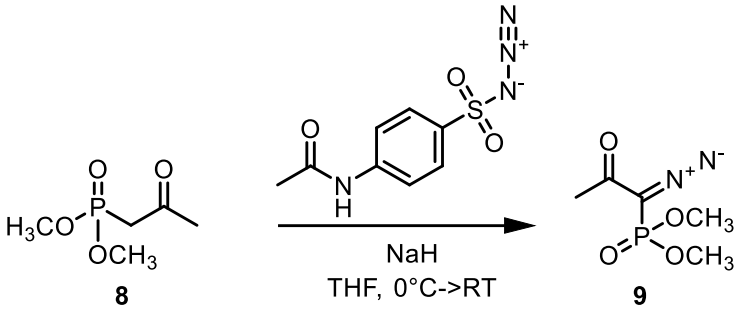
α_D^{19} = -1,3° (c = 1,04; CH_2Cl_2)

1H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 8.19 (s, 1H), 7.94 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz,

2H), 7.38 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 4.64 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 9.5, 6.2 Hz, 1H), 4.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.83 (dd, J = 13.9, 6.5 Hz, 1H).
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 38.1, 50.4, 65.3, 68.8, 114.1, 126.0, 126.8, 128.9, 129.2, 129.6, 129.8, 130.2, 132.6, 135.4, 166.5

3.3.4 Syntéza acetylenových látek

3.3.4.1 Příprava Ohira-Bestmann reagentu (**9)**

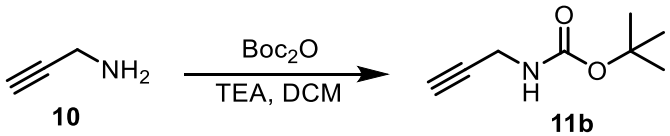


8 **9**

Za l.t. byl smíchán dimethyl(2-oxopropyl)fosfonát (**8**) (0,96 mL, eq. 1,0) a THF (18,9 mL, 0,35 M). Reakční směs byla zchlazena na 0 °C a byl k ní přidán NaH (290 mg, eq. 1,1) a po 1 hodině byl přidán 4-acetamidobenzensulfonyl azid (1,8 g, eq. 1,1). Po 30 minutách byla reakce ukočena a odpařena na RVO. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 1:1 → 1:2 → čistý EtOAc) a poskytl čistý produkt dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)fosfonát (**9**) (0,903 g, 70 %).

^{1}H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm) 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.28 (s, 3H)
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 27.08, 53.51, 53.58 (d, J= 5.58 Hz), 16.33, 129.56, 189.85

3.3.4.2 Syntéza *tert*-butyl prop-2-yn-1-yl-karbamátu (**11b**)



10 **11b**

Při 0 °C byl smíchán propargyl amin (250 mL, eq. 1,0), TEA (1,36 mL, 2,5 qeuiv) a DCM (19,5 mL, 0,2 M). Po 5 minutách byl přidán boc anhydrid (937 mg, 1,1 equiv). Reakční směs byla míchána 48 hodin, poté bylo přidáno 20 mL $NaHCO_3$. Vodná fáze byla extrahována pomocí DCM (3x 20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (15 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové

chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 10:1 → 4:1), přičemž poskytl produkt *tert*-butyl prop-2-yn-1-yl-karbamát (**11b**) (0,299 g, 55 %).

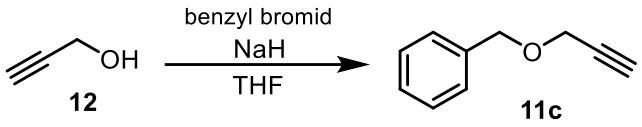
B.t. = 37–38°C

^{1}H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm) = 1.46 (s, 9H), 2.24 (t, J = 3.0 Hz, 1H),3.92 (s, 2H), 4.98 (br s, 1H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl3) δ = 28.3, 30.3, 71.2, 79.9, 80.2, 155.4

HRMS (ESI$^+$): m/z calcd. for C8H13NNaO2$^+$ [M + Na]$^+$: 178.0838, found178.0839.

3.3.4.3 Syntéza ((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)benzen (**11c**)

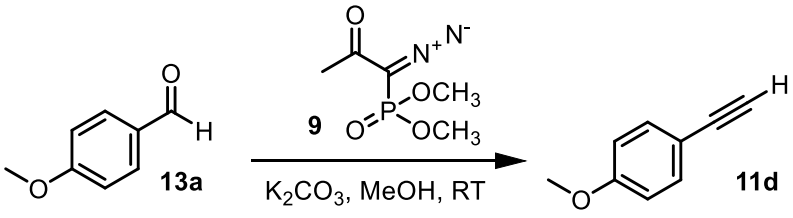


Při 0 °C byl smíchán propargyl alkohol (0,5 mL, 1,0 equiv), NaH (244 mg, 1,2 eqiv) a THF (84,6 mL, 0,1 M). Po 1 hodině byl přidán benzyl bromid (1,52 mL, 1,5 equiv). Reakční směs byla míchána přes víkend, poté bylo přidáno 60 mL $NaHCO_3$. Vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3x 20 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (15 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl dvakrát přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 10:1 → 4:1). Až poté poskytl čistý produkt ((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)benzen (**11c**) (0,272 g, 22 %).

^{1}H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm) = 7.29 – 7.18 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 4.08 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 2.39 (t, J = 2.4 Hz, 1H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 137.2, 128.4, 128.0, 127.8, 79.6, 74.6, 71.4, 57.0

3.3.4.4 Syntéza 1-ethynyl-4-methoxybenzenu (**11d**)

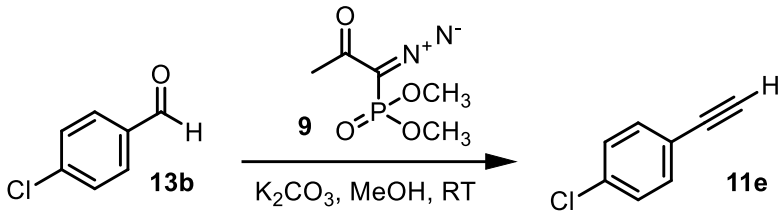


4-methoxybenzaldehyd (105 mL, eq. 1,0), produkt z předchozí reakce **(13)** (250 mg, 1,5equiv) a K_2CO_3 (239 mg, 2,0 equiv) byly rozpuštěny v MeOH (8,63 mL, 0,1 M) za l.t.

Reakční směs byla míchána 18 hodin, poté byl přidán 5% $NaHCO_3$ (5 mL). Vodná fáze byla extrahována pomocí DCM (3x 10 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 10:1 → 4:1) a poskytl čistý produkt 1-ethynyl-4-methoxybenzen (**11d**) (0,066 g, 57 %).

^{1}H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm) = 7.43 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.00 (s, 1H)
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 55.3, 75.8, 83.7, 113.9, 114.1, 133.6, 159.9

3.3.4.5 Syntéza 1-chloro-4-ethynyl-benzenu (**11e**)



4-chlorbenzaldehyd (101 mL, 1,0 equiv), Ohira-Bestmann reagent **9** (250 mg, 1,5 equiv) a K_2CO_3 (239 mg, 2,0 equiv) byly rozpuštěny v MeOH (8,63 mL, 0,1 M) za l.t. Reakční směs byla míchána 18 hodin, poté byl přidán 5% $NaHCO_3$ (5 mL). Vodná fáze byla extrahována pomocí DCM (3x 10 mL). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL), sušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4, odfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Výsledný surový produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO_2, PE:EtOAc = 5:1) a poskytl čistý produkt 1-chloro-4-ethynyl-benzen (**11e**) (0,030 g, 25 %).

^{1}H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ (ppm) = 2.34 (s, 3H), 3.02 (s, 1H), 7.12 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.1 Hz, 2H)
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) d (ppm) = 134.9, 133.4, 128.7, 120.6, 8.5, 78.2

3.4 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

3.4.1 Antihelmintická aktivita

Hodnocení antihelmintické aktivity námi vybraných látek bylo provedeno na čerstvě vylíhnutých larvách *C. elegans* (L1) wild-type linie N2 pomocí tzv. chitinasové eseje. Chitinasová esej spočívá v tom, že dospělý jedinec chitin neobsahuje, chitin obsahují pouze vajíčka, a proto embrya produkují chitinasu. Chitinasa se uvolňuje do média a přídavkem substrátu lze kvantifikovat reprodukční kapacitu červů. Díky tomu můžeme pozorovat toxicitu – zda jsou červi mrtví nebo jen zpomalení, to pozorujeme pod mikroskopem.

Larvy byly pěstovány na NGM médiu (nematode growth medium) a poté byly věkově synchronizovány pomocí bleachingu.[101] Dále byly tyto larvy zředěny na konečnou koncentraci 200–300 červů/mL, krmeny bakteriemi *E. coli* OP50 (3 mg/mL) (zdroj bakterií i C. *elegans* bylo Caenorhabditis Genetic Centre). Následně byly přeneseny na 96-jamkovou destičku. Poté byly ošetřeny námi připravenými látkami, jako negativní kontrola byl použit DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit ivermectin – běžně používané antihelmintikum. Populace byly ponechány růst při 20 °C na třepačce (100 otáček/min) po dobu 4 dnů, kdy za vhodných podmínek by v této době dosáhly dospělosti a začaly se množit. Po 4 dnech bylo do každé jamky přidáno 20 μM fluorogenního chitinasového substrátu (4-methylumbelliferyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid) a destička byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla reakce zastavena přidáním alkalického pufru (1M glycin/1M NaOH, pH 10,6)[102] a byla změřena intenzita fluorescence (přístroj Tecan INFINITE 200 Pro, excitace 360 nm, emise 460 nm). Před samotným testem byla destička zkontrolována vizuálně pod invertovaným mikroskopem (Leica) a byly porovnány změny v jednotlivých jamkách (mrtví, živí červi).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této práce je navázat na předchozí výzkum a vytvořit druhou generaci látek obsahujících modifikovaný laktonový kruh, přesněji, pokusit se přispět k objasnění vlivu substituce na cyklopropanu pro zachování biologické aktivity. Prvním krokem byla příprava fenylsulfonyl laktonu (+)-**3**, jakožto výchozí látky (kapitola 4.1). Tato látka již byla připravena v rámci skupiny[3] a byly u ní prokázány biologické účinky (kapitola 2.4). Proto jsme se rozhodli využít tuto skutečnost a provádět modifikace na této látce. V návaznosti na to byl připraven azid (+)-**6** (kapitola 4.2), který byl využit jako výchozí bod pro tzv. click chemii (kapitola 4.2). Tento typ chemie se bohužel ukázal mnohem méně úspěšný, než jsme doufali.

Všechny připravené látky byly testovány na cytotoxicitu a antihelmintickou aktivitu (kapitola 4.3). U jedné z připravených látek byla antihelmintická aktivita pozorována při vyšší testované koncentraci (kapitola 4.3.2).

4.1 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-**3** – SYNTÉZA

Pro syntézu fenylsulfonyl laktonu byl nejprve připraven 2-(fenylsulfonyl)acetonitril (**2**), který následně v reakci s (S)-(+)-epichlorhydrinem v přítomnosti methanolátu sodného (čerstvě generován rozpuštěním sodíku v methanolu) poskytl náš produkt (1*S*)-1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyklo[3.1.0]hexan-2-on (+)-**3** jako jediný stereoisomer. Tento bicyklický lakton pak následně sloužil jako výchozí látka pro přípravu všech ostatních derivátů vycházejících z této struktury (Schéma 1).

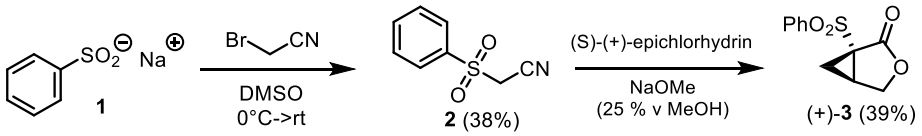


Schéma 1. Příprava výchozího bicyklolaktonu (+)-**3**.

4.2 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-**3** – ZNÁMÉ MODIFIKACE

Když byl bicyklolakton (+)-**3** přirpaven v dostatečném množství, tak jsme se zaměřili na jeho ohodnocení v rámci reaktivity. Nejprve byly provedeny reakce, které již byly publikovány Dr. Koutskou (Konrádovou). Bicyklolakton (+)-**3** byl tedy nejprve převeden reakcí s *n*-BuLi a vinyl-Mg-Br na odpovídající terciální alkoholy (+)-**4a** a (+)-**4b** (Schéma 2) a následně derivát (+)-**4b** byl transformován na odpovídající tricyklickou spiro sloučeninu (+)-**5** I když se nepodařilo připravit tyto látky v dostatečném výtěžku (v porovnání s publikovanou hodnotou Dr. Koutské (Konrádové)),

tak byly připraveny v opticky čisté formě (dříve pouze jako racemické látky). Tyto látky tak jsou velmi důležité pro jejich biologické ohodnocení.

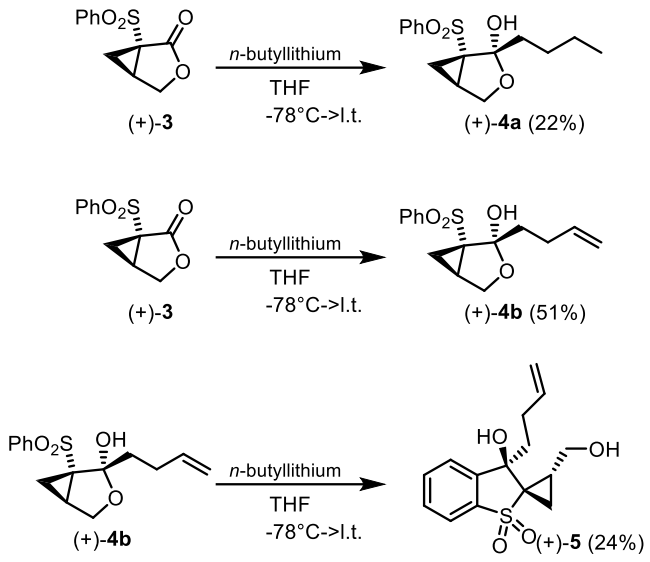


Schéma 2. Testované reakce pro přípravu pokročilých intermediátů vzešlých z (+)-**3**. Syntéza opticky čistých látek.

4.3 FENYLSULFONYL LAKTON (+)-**3** – MODIFIKACE LAKTONOVÉHO KRUHU

Po těchto úspěšných syntézách jsme se přesunuli k přípravě modifikované laktonové funkční skupiny. Hlavním cílem bylo získat laktonový kruh, který by neměl karbonylovou funkční skupinu (Schéma 3). Aby se toho dosáhlo, rozhodli jsme se využít známých reakcí karbonylů v přítomnosti karbénů titanu (Takaiho, Tebbe a Petassisův reagent) a i v přítomnosti Wittigova reagentu. Provedené experimenty jsou obsaženy v Tabulce 2.

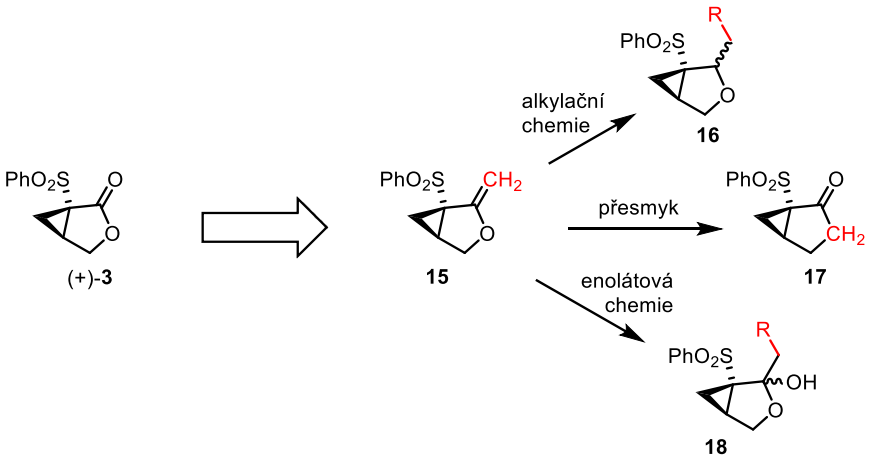
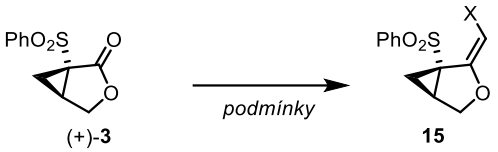


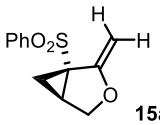
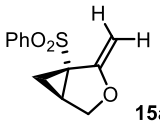
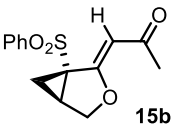
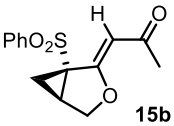
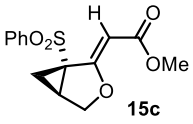
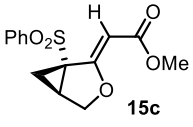
Schéma 3. Předpokládané modifikace karbonylové funkční skupiny v laktonu (+)-**3**.

Bohužel se ukázalo, že cílený laktonový karbonyl je značně nereaktivní a za žádné z testovaných reakčních podmínek nedocházelo ke konverzi výchozí látky (+)-**3** na cílenou finální strukturu. Předpokládáme, že tato situace je způsobena značnou stérickou náročností kolem karbonylové skupiny, která znemožňuje za daných reakčních podmínek vznik kýžených produktů. Cílený typ produktů totiž vůbec nereagoval, ať již v přítomnosti značně reaktivního Tebbeho reagentu, ani v přítomnosti lakton-specifického Takai-Utimoto reagentu a ani v přítomnosti Wittigových reagentů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zavést naši pozornost jiným směrem – k reakcím s azidy již otevřeného cyklopropanového kruhu (viz následující kapitola).

Tabulka 2: Reakce laktonového karbonylu (+)-**3.**



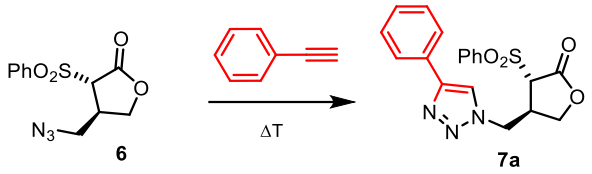
(+)-**3** **15**

Řádek	Očekávaný produkt	Podmínky	X	Konverze[a] (+)-**3** [%]
1	 **15a**	(+)-**3** (1,0 equiv), Tebbe reagent ($Cp_2TiCH_3(Cl).AlMe_3$) (1,5 equiv), CH_2Cl_2, -78°C	-H	<5
2	 **15a**	(+)-**3** (1,0 equiv), $TiCl_4$ (4,0 ekviv), Mg (16,0 ekviv), CH_2Cl_2/THF, 0°C->l.t.	-H	<5
3	 **15b**	(+)-**3** (1,0 equiv), $Ph_3P=C(H)COCH_3$ (5 ekviv), toluen, 50°C, 12h	$-COCH_3$	<5
4	 **15b**	(+)-**3** (1,0 equiv), $Ph_3P=C(H)COCH_3$ (5 ekviv), toluen, 100°C, 12h	$-COCH_3$	<5
5	 **15c**	(+)-**3** (1,0 equiv), $Ph_3P=C(H)COCH_3$ (5 ekviv), toluen, 50°C, 12h	- CO_2CH_3	<5
6	 **15c**	(+)-**3** (1,0 equiv), $Ph_3P=C(H)COCH_3$ (5 ekviv), toluen, 100°C, 12h	- CO_2CH_3	<5

a) Založeno na ^{1}H NMR spektrech surové reakční směsi.

4.4 CLICK CHEMIE

„Click“ chemie se označuje takový typ reakcí, jež probíhají za mírných reakčních podmínek, neprodukují žádné vedlejší produkty, reakce je stereoselektivní a zároveň stereospecifická, a navíc může probíhat i ve vodném prostředí resp. v biologických systémech. Toto označení bylo zavedeno v roce 2001.[103] Typickým příkladem takových reakcí jsou cykloadiční reakce azidů a alkynů (také nazývané Huisgenova reakce). Tato reakce nejenom, že splňuje výše zmíněná kritéria, ale zároveň nám umožňuje jednoduše vyzkoušet jejich typ na našich substrátech a připravit tak 1,2,3-triazoly s funkčními skupinami široké škály.[(int9)] V kontextu našich substrátů, Dr. Koutská (Konrádová) již testovala tento typ reakcí s azidem **6**, který prostým zahřátím (termicky iniciovaná reakce) s fenylacetylenem poskytl očekávaný produkt **7** (Obr. 28).



Obr. 28: Reakce azidu **(6)** s fenylacetylenem se zvýrazněným ,,click“ mechanismem.

V tomto kontextu jsme se tedy rozhodli vyzkoušet reaktivity azidu (+)-**6** (Schéma 4) v přítomnosti různých acetylenů a měďnatých (Cu(I)) solí. V tomto případě by totiž mechanismus reakce měl být jiný a mohli bychom tedy získat nejenom produkt **7,** ale i jeho polohový izomer **14**.

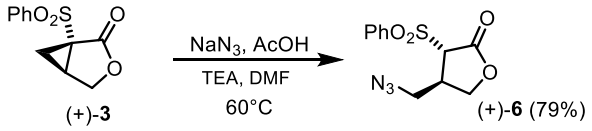
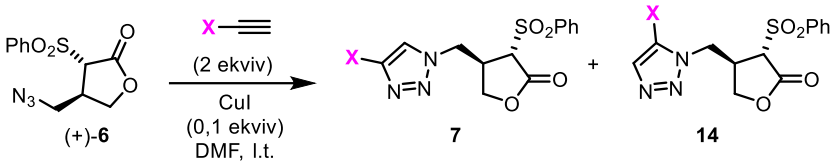
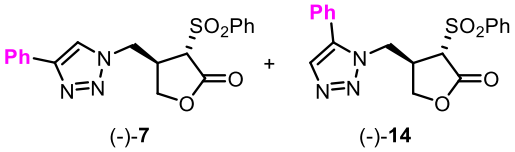
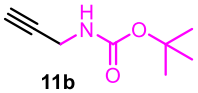
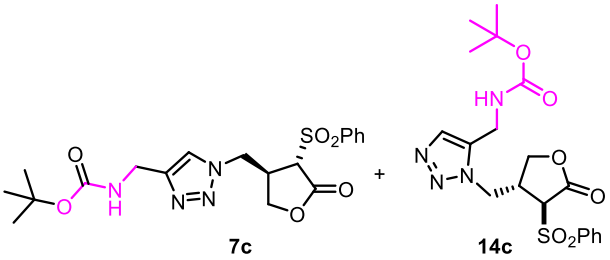
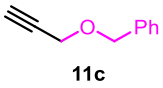
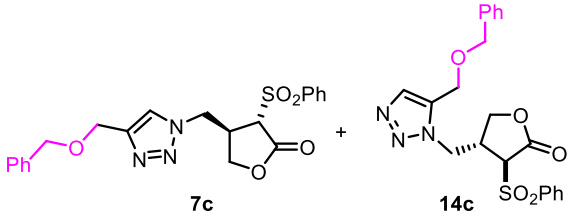
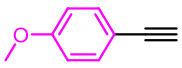
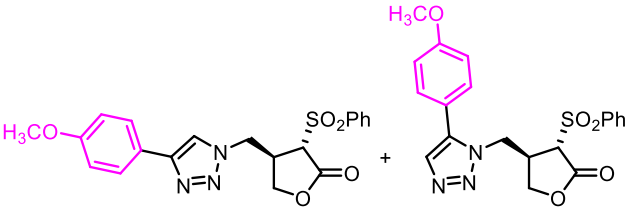
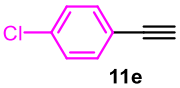
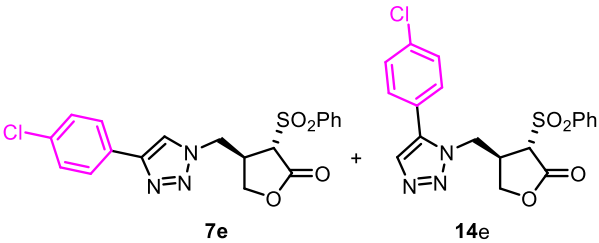
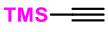
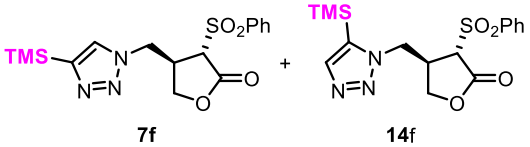


Schéma 4. Příprava azidu (+)-**6.**

Jak je lze vidět v Tabulce 3, náš předpoklad byl bohužel chybný, protože cílové produkty adice se nám povedlo připravit pouze v případě fenylacetylenu (Tabulka 3, řádek 1). V případě ostatních testovaných alkynů bohužel nebyl pozorován vznik produktu(ů). Předpokládáme, že tato situace byla způsobena přítomností koordinačních míst v kontextu molekuly (+)-**3** a na acetylonovém substrátu resp. z důvodu snížené reaktivity substrátů v kontextu Huisgenovy cykloadiční reakce. Použité acetylenové substráty **11** byly komerčně dostupné, anebo snadno připravitelné s využitím Ohira-Bestmanova reagentu (Schéma 5).

Tabulka 3: Produkty získané po reakci s azidem **(6)**.



Řádek	Acetylen	Produkty	Výtěžek[a] [%]
1	**11a**	 (-)-**7** (-)-**14**	(-)-**7** (65%) (-)-**14** (34%)
2	 **11b**	 **7c** **14c**	n.d.[b]
3	 **11c**	 **7c** **14c**	n.d.[b]
4	 **11d**	 **7e** **14e**	n.d.[b]
5	 **11e**	 **7e** **14e**	n.d.[b]
6	 **11f**	 **7f** **14f**	n.d.[b]

a) Odpovídá čisté izolované látce. (b) n.d. = nebylo detekováno. Založeno na ^{1}H NMR spektrech surové reakční směsi.

4.4.1 Syntéza nekomerčně dostupných acetylenů **11b-e** – využité Ohira-Besmann reagentu

Bestmann-Ohira reagent (dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)fosfonát) je jedinečným a univerzálním činidlem, které se v organické chemii využívá především pro přeměnu aldehydů na koncové alkyny. Lze ho snadno připravit z komerčně dostupných surovin[104] a proto se také jeho příprava stala součástí této práce. Reakcí dimethyl(2-oxopropyl)fosfonátu, NaH a THF byl připraven chtěný produkt **9** v 70% výtěžku. Připravené alkyny jsou následně obsaženy ve Schématu 5.

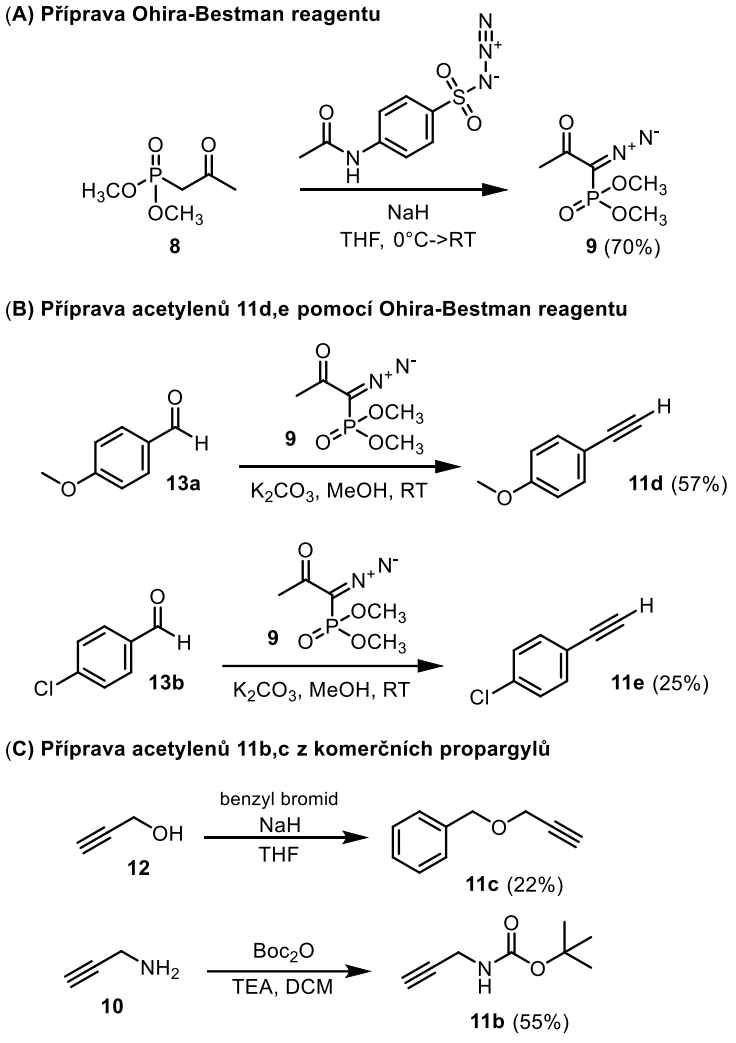


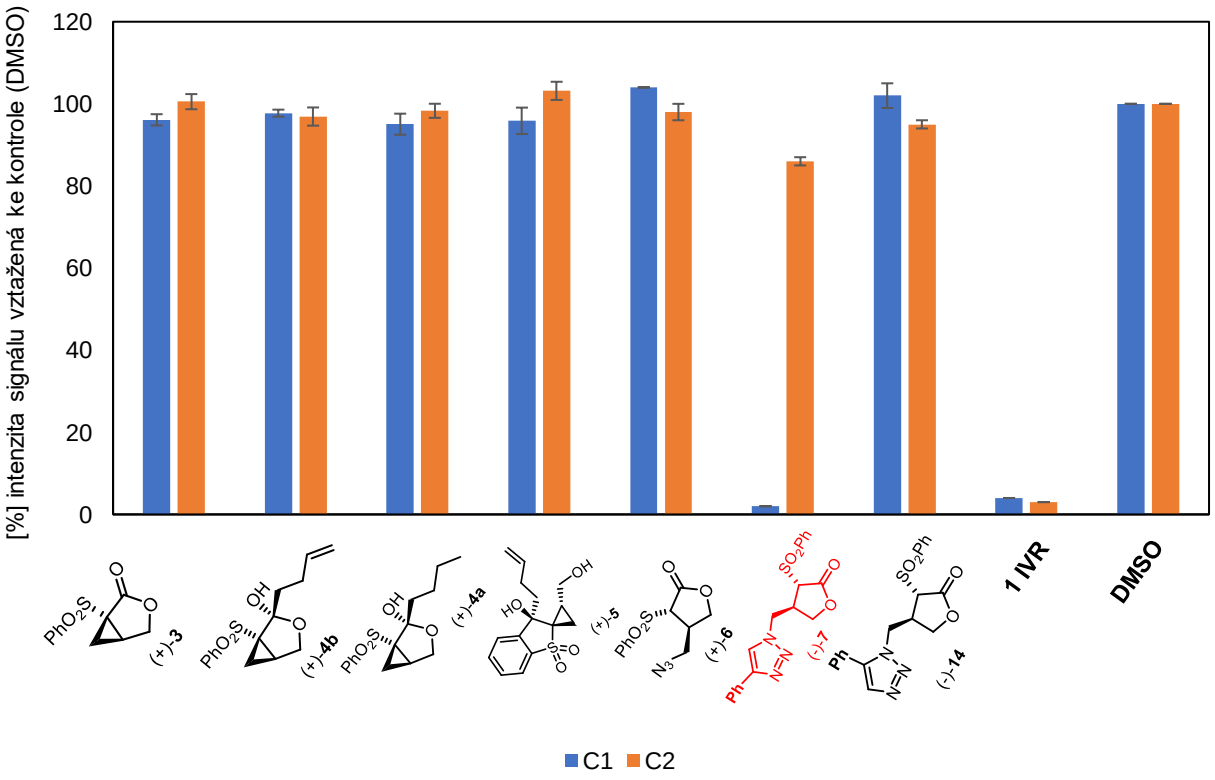
Schéma 5. Syntéza nekomerčních acetylenových derivátů **11b-e**.

4.5 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

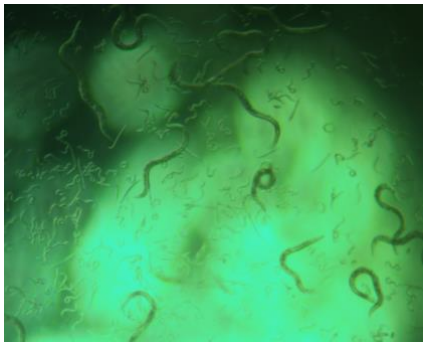
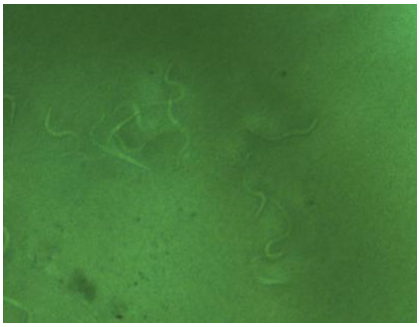
4.5.1 Vyhodnocení antihelmintické aktivity

Aktivita enzymu chitinasy odpovídá o zdravotním stavu experimentální populace. Tato aktivita byla vyjádřena procentuální intenzitou signálu vztaženou k negativní kontrole (100% DMSO). Připravené látky byly aplikovány ve dvou různých koncentracích: c_1 odpovídala 50 μM pro látky (+)-**3**, (+)-**5**, (+)-**6**, (-)-**7a** a (-)-**14a** a pro látku (+)-**4b** 34 μM a pro látku (+)-**4a** 33,7 μM; c_2 odpovídala 5 μM pro látky (+)-**3**, (+)-**5**, (+)-**6**, (-)-**7a** a (-)-**14a**, pro látku (+)-**4b** 3,4 μM a pro látku (+)-**4a** 3,37 μM. Jako pozitivní kontrola byl použit ivermectin v koncentraci c_1 1 μM a koncentrace c_2 odpovídala 0,1 μM. U látky (-)-**7a** byla zjištěna pozitivní reakce při vyšší koncentraci (50 μM). Vizuální hodnocení v mikroskopu taktéž potvrdilo toxický efekt látky – červi byli nehybní, mrtví. U ostatních látek pak tato skutečnost potvrzena nebyla. Výsledky chitinasového testu jsou uvedeny v Grafu 1. V Tabulce 6 je uveden vizuální rozdíl negativní a pozitivní kontroly.

Graf 1: Výsledky chitinasového testu – průměr ze 3 biologických replikátů +/- SEM.



Tabulka 4: Srovnání negativní (DMSO) a pozitivní (ivermectin) kontroly. U negativní kontroly byli červi pohybliví, různě zakroucení; u pozitivní kontroly byli nehybní, spíše narovnaní.

Látka	**Koncentrace**	**Živí (+), Mrtví (-)**
100% DMSO	100 %	 +
Ivermectin	1 µM	 -

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá vývojem nových syntetických modifikací bicyklolaktonových sulfonů, jež byly ve výzkumné skupině doc. Jiřího Pospíšila vyvinuty v minulých letech Dr. Koutskou (Konrádovou). V tomto případě jsme se zaměřili zejména na přípravu nových derivátů, jež měly za úkol zmapovat reaktivitu laktonového karbonylového kruhu v kontextu chemie (příprava) a následně i biologické aktivity. Bohužel jsme zjistili, že tento typ derivátů má vysokou rezistenci vůči testovaným pokusům o jejich přípravu. V průběhu práce tedy musela být změněna strategie a přesunuli jsme se k modifikacím tohoto laktonu v kontextu ,,click“ chemie. Cyklopropanový kruh bicyklolaktonu byl tedy otevřen a vzniklý azid byl následně modifikován reakcí s acetyleny v přítomnosti mědi(I). I v tomto případě se nepovedlo připravit mnoho cílových látek z důvodu nízké reaktivity předložených substrátů.

Všechny připravené látky byly následně otestovány na jejich antihelmintickou aktivitu. Bohužel z důvodu COVID-19 restrikcí jsme nemohli otestovat původně plánovanou antileishmaniální aktivitu, neboť naše spřátelené pracoviště (Hebrejská Univerzita), kde probíhá testování, bylo uzavřeno. Testy na *C. elegans* ukázaly, že jedna látka, triazol (-)-**7a**, má jistou aktivitu při 50 mM koncentraci, a že tento typ skeletu je tak možným odrazovým můstkem pro další vývoj našich látek s antihelmintickou aktivitou.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Internetový zdroj 1: (8. 4. 2020) https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_VL_2018.pdf?ua=1

Internetový zdroj 2: (8. 4. 2020) https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1

Internetový zdroj 3: (17. 4. 2020) https://www.who.int/leishmaniasis/Visceral_Leishmaniasis_2hr.jpg?ua=1

Internetový zdroj 4: (17. 4. 2020) https://www.who.int/leishmaniasis/Visceral_Leishmaniasis_hr.jpg?ua=1

Internetový zdroj 5: (22. 4. 2020) https://www.who.int/leishmaniasis/Cutaneous_Leishmaniasis_hr.jpg?ua=1

Internetový zdroj 6: (30. 3. 2021) http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html

Internetový zdroj 7: (30. 3. 2021) https://www.rewiring-neuroscience.com/wp-content/uploads/2012/02/c-elegans-w-GFP.jpg

Internetový zdroj 8: (30. 3. 2021) http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro_fig2.jpg

Internetový zdroj 9: (4. 4. 2021) https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/click-chemistry.shtm

1. Chakravarty, J.; Sundar, S., Drug resistance in leishmaniasis, *J. Glob. Infect. Dis.*, **2010**, 2, 167–176, doi: 10.4103/0974-777X.62887.
2. Neto, R. L. M.; Sousa, L. M. A.; Dias, C. S.; Filho, J. M. B.; Oliveira, M. R.; Figueiredo, R. C. B. Q., Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*, *Exp. Parasitol.*, **2011**, 1, 215–221, doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.020.
3. Konrádová, D.; Bon D. J.-Y.; Pospíšil J., 1-(Phenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-one as a Building Block in Organic Synthesis, *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 12229–12238, doi: 10.1021/acs.joc.8b01625.
4. Burza, S.; Croft, L. S.; Boelaert M., Leishmaniasis, *Lancet*, **2018**, 392, 951–970, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
5. Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; Kuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunnay, P.; Kasbari, M.; Granouillac, B.; Gradoni, L.; Sereno, D., Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis, *Mol. Asp. Med.*, **2017**, 57, 1–29, doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.

6. Quinnel, R. J.; Courtenay, O., Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis, *Parasitology*, **2009**, 136, 1915–1934, doi: 10.1017/S0031182009991156.
7. Young, D. G.; Duncan, M. A., Guide to the identification and Geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae), *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* **1994**, 1, 125, doi: 10.1016/0035-9203(95)90687-8.
8. Reithinger, R.; Dujardin, J. C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S., Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.*, **2007**, 7, 581–596, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
9. Rogers, M. E.; Chance, M. L.; Bates, P. A., The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stages of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis, *Parasitology*, **2002**, 124, 495–507, doi: 10.1017/s0031182002001439.
10. Oghumu, S.; Natarajan, G.; Satoskar A., Pathogenesis of Leishmaniasis in Humans, *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral & Parasitic Infections*, 1. vydání, USA, **2015**, 337–348. ISBN [online]: 9781118644843.
11. Lodge, R.; Descoteaux, A.; Lodge, R.; Descoteaux, A., Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania, *J. Clin. Immunol.*, **2005**, 114, 256–265, doi: 10.1016/j.clim.2004.07.018.
12. Beverley, S. M.; Turco, S. J., Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania, *Trends Microbiol.*, **1998**, 6, 35–40, doi: 10.1016/S0966-842X(97)01180-3.
13. Mc-Mahon-Pratt, D.; Alexander, J., Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease?, *Immunol. Rev.*, **2004**, 201, 206–224, doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x.
14. Alexander, J.; Satoskar, A. R.; Russell, D. G., Leishmania species: Models of intracellular parasitism, *J. Cell Sci.*, **1999**, 112, 2993–3002.
15. Moradin, N.; Descoteaux, A., Leishmania promastigotes: Building a safe niche within macrophages, *Front Cell Infect Microbiol*, **2012,** 2, 121, doi: 10.3389/fcimb.2012.00121.
16. Kaye, P.; Scott, P., Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2011**, 9, 604–615, doi: 10.1038/nrmicro2608.
17. Bern, C.; Maguire, J. H.; Alvar J., Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis, *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **2008**, 2, 313, doi: 10.1371/journal.pntd.0000313.

18. Fenwick, A.; The global burden of neglected tropical diseases, *Public Health*, **2012**, 126, 233–236, doi: 10.1016/j.puhe.2011.11.015.
19. Gradoni, L., A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology, *The Leishmaniases: Old Neglected Trop. Dis.*, **2018**, 1–13, doi: 10.1007/978-3-319-72386-0_1.
20. Patz, J. A.; Graczyk, T. K.; Geller, N.; Vittor, A. Y., Effects of environmental change on emerging parasitic diseases, *Int J Parasitol*, **2000**, 30, 1395–1405, doi: 10.1016/s0020-7519(00)00141-7.
21. Colmenares, M.; Kar, S.; Goldsmith-Pestana, K.; McMahon-Pratt, D., Mechanisms of pathogenesis: differences amongst Leishmania species, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2002,** 96, 3–7, doi: 10.1016/s0035-9203(02)90044-1.
22. World Health Organisation, Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, *World Health Organ Tech Rep Ser*., Ženeva, **2010**, 949, 186.
23. Harhay, M. O.; Olliaro, P. I.; Vaillant, M.; Chappuis, F.; Lima, M. A.; Ritmeijer, K.; Costa, C. H.; Costa, D. L; Rijal, S.; Sundar, S.; Balasegaram, M., Who Is a Typical Patient with Visceral Leishmaniasis? Characterizing the Demographic and Nutritional Profile of Patients in Brazil, East Africa, and South Asia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2011**, 84, 543–550, doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0321.
24. Pedrosa, C. M. S., Clinical Manifestations of Visceral Leishmaniasis (American Visceral Leishmaniasis), *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*, **2017**, 2, 17–30, doi: 10.5772/67398.
25. Ready, P. D.; Epidemiology of Visceral Leishmaniasis, *Clin. Epidemiol.*, **2014**, 6, 147–154, doi: 10.2147/CLEP.S44267.
26. Zijlstra, E. E., The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), *Parasites Vectors,* **2016**, 9, 464, doi: 10.1186/s13071-016-1721-0.
27. Pal, B.; Murti, K.; Siddiqui, N. A.; Das, P.; Lal, C. S.; Babu, R.; Rastogi, M.; Pandey, K., Assessment of quality of life in patients with post kala azar dermal leishmaniasis*, Health Qual. Life Outcomes,* **2017**, 15, 148, doi: 10.1186/s12955-017-0720-y.
28. Zijlstra, E. E., PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses, *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **2014**, 8, 3258, doi: 10.1371/journal.pntd.0003258.
29. Mock, D. J.; Hollenbaugh, J. A.; Daddacha, W.; Overstreet, M. G.; Lazarski, C. A.; Fowell, D. J.; Kim, B., Leishmania induces survival, proliferation and elevated

cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection, *PLOS Pathog.*, **2012**, 8, 1002635, doi: 10.1371/journal.ppat.1002635.

30. Murray, H. W.; Bernan, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G., Advances in Leishmaniasis, *Lancet*, **2005**, 366, 1561–1577, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5.
31. Peters, W.; Killick-Kendrick, R., The Leishmaniases in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology, *Parasitology,* 1. vydání, Londýn, **1988**, 96, 642–643, ISBN [online] 0125521014, doi: 10.1017/S0031182000080264.
32. Barral, A.; Guerreiro, J.; Bomfim, G.; Correia, D.; Barral-Netto, M.; Carvalho, E. M., Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by Leishmania braziliensis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1995**, 53, 256–259, doi: 10.4269/ajtmh.1995.53.256.
33. Yanick, M.; Gurel, M. S.; Simsek, Z.; Kati, M.; The psychological impact of cutaneous leishmaniasis, *Clin. Exp. Dermatol.*, **2004**, 29, 464–467, doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01605.x.
34. Kumar, R.; Engwerda, C., Vaccines to prevent leishmaniasis, *Clin. Transl. Immunol.*, **2014**, 3, 13, doi: 10.1038/cti.2014.4.
35. Moafi, M.; Rezvan, H.; Sherkat, R.; Taleban, R., Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature*, Int. J. Prev. Med*, **2019**, 10, 95, doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18.
36. Srivastava, S.; Shankar, P.; Mishra, J.; Singh, S., Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis, *Parasites Vectors,* **2016**, 9, 277, doi: 10.1186/s13071-016-1553-y.
37. Teixeira, M. C. A.; Oliveira, G. G. de S.; Santos, P. O. M.; Bahiense, T. C.; Silva, V. M. G. da; Rodrigues, M. S.; Larangeira, D. F.; dos-Santos, W. L. C., Pontes-de-Carvalho, L. C., An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to Leishmania antigens, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* **2011**, 106, 182–189, doi: 10.1590/S0074-02762011000200011.
38. Wylie, C. E.; Carbonell-Antoñanzas, M.; Aiassa, E.; Dhollander, S.; Zagmutt, F. J.; Brodbelt, D. C.; Solano-Gallego, L., A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations, *Prev. Vet. Med.*, **2014**, 117, 7–18, doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.
39. Shargh, V. H.; Jaafari, M. R.; Khamesipour, A.; Jaafari, I.; Jalali, S. A.; Abbasi, A.; Badiee, A., Liposomal SLA co-incorporated with PO CpG ODNs or PS CpG ODNs induce the same protection against the murine model of leishmaniasis, *Vaccine*, **2012**, 30, 3957–3964, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.040.

40. Donnelly, J. J.; Ulmer, J. B.; Shiver, J. W.; Liu, M. A., DNA vaccines, *Annu. Rev. Immunol.*, **1997**, 15, 617–648, doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.617.
41. Gurunathan, S.; Klinman, D. M; Seder, R. A., DNA vaccines: immunology, application, and optimization, *Annu. Rev. Immunol.*, **2000**, 18, 927–974, doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.927.
42. Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K., Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets, *Asian Pac J Trop Dis*, **2012**, 5, 485–497, doi: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.
43. Frezard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R., Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs, *Molecules*, **2009**, 14, 2317–2336, doi: 10.3390/molecules14072317.
44. Agrawal, S.; Rai, M.; Sundar, S., Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective, *Postgrad. Med. J.*, **2005**, 51, 53–57.
45. Franco, M. A.; Barbosa, A. C. Rath, S.; Dorea, J. G., Antimony oxidation states in antileishmanial drugs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* **1995**, 52, 435–437, doi: 10.4269/AJTMH.1995.52.435.
46. Berman, J. D.; Edwards, N.; King, M.; Grogl, M., Biochemistry of pentostam resistant Leishmania, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1989**, 40, 159–64, doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.159.
47. Chakraborty, A. K; Majumder, H. K., Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1988**, 152, 605–611, doi: 10.1016/s0006-291x(88)80081-0.
48. Srivastava, P.; Prajapati, V. K.; Rai, M.; Sundar, S.; Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic, *J. Clin. Microbiol.*, **2011**, 49, 3088–3091, doi: 10.1128/JCM.00173-11.
49. Monzote, L., Current Treatment of Leishmaniasis: A Review, *The Open Antimicrobial Agents Journal*, **2009**, 1, 9–19, doi: 10.2174/1876518100901010009.
50. Ramos, H.; Valdivieso, E.; Gamargo, M.; Dagger, F.; Cohen, B. E., Amphotericin B kills unicellular Leishmania by forming aqueous pores permeable to small cations and anions, *J. Membr. Biol.*, **1996**, 152, 65–75, doi: 10.1007/s002329900086.
51. Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S., Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future, *Curr. Med. Chem.,* **2007**, 14, 1153–1169, doi: 10.2174/092986707780362862.

52. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P. et al., Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis, *N Engl J Med*, **2002**, 347, 1739–1746, doi: 10.1056/NEJMoa021556.
53. Verma, N. K.; Dey, C. S., Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, 48, 3010–3015, doi: 10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004.
54. Sundar, S.; Chatterjee, M., Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities, *Indian J. Med. Res.,* **2006**, 123, 345–352.
55. Neal, R. A., The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis, *Ann Trop Med Parasitol*, **1968**, 62, 54–62, doi: 10.1080/00034983.1968.11686529.
56. Sundar, S.; Chakravarty, J., Paromomycin in the treatment of leishmaniasis, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2008**, 17, 787–794, doi: 10.1517/13543784.17.5.787.
57. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur ,C. P., Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India, *N Engl J Med*, **2007**, 356, 2571–2581, doi: 10.1056/NEJMoa066536.
58. Balaña-Fouce, R.; Requera, R. M; Cubría, J. C.; Ordóñez, D., The pharmacology of leishmaniasis, *Gen. Pharmacol.*, **1998**, 30, 435–443, doi: 10.1016/s0306-3623(97)00268-1.
59. Ramdas, S., Cruel disease, cruel medicine: Self-treatment of cutaneous leishmaniasis with harmful chemical substances in Suriname, *Soc. Sci. Med.,* **2012**, 75, 1097–1105, doi: 10.1016/j.socscimed.2012.04.038.
60. Schäfer, H.; Wink, M., Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis, *Biotechnol. J.*, **2009**, 4, 1684–1703, doi: 10.1002/biot.200900229.
61. Rosenthal, G. A., The biochemical basis for the deleterious effects of L-canavanine, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1055–1058, doi: 10.1016/S0031-9422(00)95170-7.
62. Wink, M., Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution, *Nat Prod Commun,* **2008**, 3, 1205–1216, doi: 10.1177/1934578X0800300801.
63. Morrissey, J.; Guerinot, M. L., Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4553–4567, doi: 10.1021/cr900112r.
64. Zálešák, F.; Bon D. J.-Y.; Pospíšil J., Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances, *Pharmacol. Res.,* **2019**, 146, 104284, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104284.

65. Satake, H.; Ono, E.; Murata, L., Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements, *J. Agric. Food Chem.,* **2013**, 61, 11721–11729, doi: 10.1021/jf4007104.
66. Vogt, T., Phenylpropanoid biosynthesis, *Mol. Plant.,* **2010**, 3, 2–20, doi: 10.1093/mp/ssp106.
67. Dar, A. A.; Arumugam, N., Lignans of sesame: purification methods, biological activities and biosynthesis – a review, *Bioorg. Chem.,* **2013**, 50, 1–10, doi: 10.1016/j.bioorg.2013.06.009.
68. Teponno, R. B.; Kusari, S.; Spiteller, M., Recent advances in research on lignans and neolignans, *Nat. Prod. Rep.,* **2016**, 33, 1044–1092, doi: 10.1039/C6NP00021E.
69. Hui, X.; Min, L.; Xuan, T., A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003-2007, *Curr. Med. Chem.,* **2009**, 16, 327–349, doi: 10.2174/092986709787002682.
70. Longstaff, E.; von Krogh, G., Condyloma eradication: self-therapy with 0.15–0.5% podophyllotoxin versus 20–25% podophyllin preparations—an integrated safety assessment, *Regul. Toxicol. Pharmacol.,* **2001**, 33, 117–137, doi: 10.1006/rtph.2000.1446.
71. Cassidy, D. E.; Drewry, J.; Fanning, J. P., Podophyllum toxicity: a report of a fatal case and a review of the literature, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.,* **1982**, 19, 35–44, doi: 10.3109/15563658208990364.
72. Ardalani, H.; Avan, A.; Ghayour-Mobarhan, M., Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent, *Avicenna J. Phytomedicine,* **2017**, 7, 285–294.
73. Hande, K. R., Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor, *Eur. J. Cancer,* **1998**, 34, 1514–1521, doi: 10.1016/s0959-8049(98)00228-7.
74. Gordaliza, M.; García, P. A.; Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gómez-Zurita, M. A., Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives, *Toxicon,* **2004**, 44, 441–459, doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.008.
75. Swarup, V.; Ghosh, J.; Mishra, M. K.; Basu, A., Novel strategy for treatment of Japanese encephalitis using arctigenin, a plant lignan, *J. Antimicrob. Chemother.,* **2008**, 679–688, doi: 10.1093/jac/dkm503.
76. Awale, S.; Lu, J.; Kalauni, S. K.; Kurashima, Y.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Esumi, H., Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate

the tolerance of cancer cells to nutrient starvation, *Cancer Res,* **2006**, 66, 1751–1757, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3143.

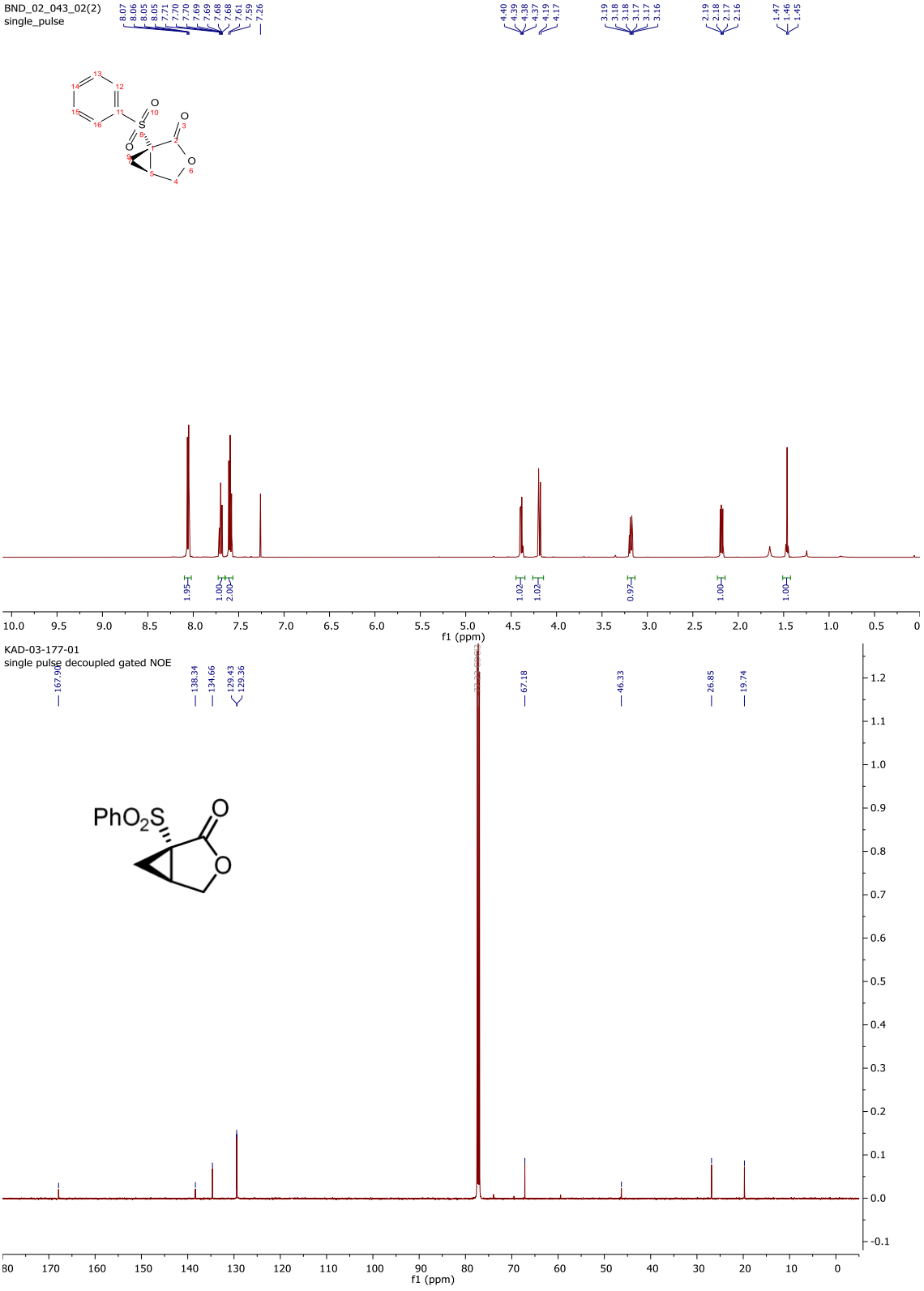
77. Hayashi, K.; Narutaki, K.; Nagaoka, Y.; Hayashi, T.; Uesato, S., Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in Immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza a virus, *Biol. Pharm. Bull.,* **2010**, 33, 1199–1205, doi: 10.1248/bpb.33.1199.
78. Limer, J. L.; Speirs, V., Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention, *Breast Cancer Res.,* **2004**, 6, 119–127, doi: 10.1186/bcr781.
79. Anderson, L. N.; Cotterchio, M.; Boucher, B. A.; Kreiger, N., Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women, *Int. J. Cancer*, **2012**, 132, 1683–1692, doi: 10.1002/ijc.27788.
80. Gonçalves, G. A.; Spillere, A. R.; das Neves, G. M.; Kagami, L. P.; von Poser, G. L.; Canto, R. F. S.; Eifler-Lima, V. L., Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review, *Eur. J. Med. Chem.,* **2020**, 203, 112514, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112514.
81. Bravo, J. A.; Sauvain, M.; Gimenez, T. A.; Munoz, O. V.; Callapa, J.; Men-Olivier, L.; Massiot, G.; Lavaud, C., Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*, *Phytochemistry,* **1999**, 50, 71–74, doi: 10.1016/S0031-9422(98)00497- X.
82. Vila-Nova, N. S.; Morais, S. M.; Falcão, M. J.; Alcantara, T. T.; Ferreira, P. A.; Cavalcanti, E. S.; Vieira, I. G.; Campello, C. C.; Wilson, M., Different susceptibilities of *Leishmania spp.* promastigotes to the Annona muricata acetogenins annonacinone and corossolone, and the Platymiscium floribundum coumarin scoparone, *Exp. Parasitol.*, **2012**, 133, 334–338, doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.025.
83. Vila-Nova, N. S.; Morais, S. M.; Falcão, M. J. C.; M. L. Bevilaqua, C. M. L.; Rondon, F. C. M.; Wilson, M. E.; Vieira, I. G. P.; Andrade, H. F., Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome, *Pesq. Vet. Bras.*, **2012**, 32, 1164–1168, doi: 10.1590/S0100-736X2012001100015.
84. Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rodrigues, B. D.; Almeida, A. L.; Vieira, P. C.; Oliva, G.; Thiemann, O. H., Aurapten, a coumarin with growth inhibition against Leishmania major promastigotes, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2004**, 37, 1847–1852, doi: 10.1590/S0100-879X2004001200010.

85. Iranshahi, M.; Arfa, P.; Ramezani, M.; Jaafari, M. R.; Sadeghian, H.; Bassarello, C.; Piacente, S.; Pizza, C., Sesquiterpene coumarins from Ferula szowitsiana and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes, *Phytochemistry*, **2007**, 68, 554–561, doi: 10.1016/j.phytochem.2006.11.002.
86. Chandrasekar, R.; Subasish, D.; Sivagami, B.; Jayasree, P.; Niranjan, B. M., Therapeutic Efficacy of Flavonoids and Terpenoids an Ongoing Herbal Therapy in the Treatment of Leishmaniasis, *Nat. Prod. Ind. J.,* **2018**, 14, 124.
87. Mittra, B.; A. Saha, A.; Chowdhury, A. R.; Pal, C.; Mandal, S.; Mukhopadhyay S.; Bandyopadhyay S.; Majumder H. K., Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II- mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis, *J. Mol. Med.*, **2000**, 6, 527–541, doi: 10.1007/BF03401792.
88. Das, B. B.; Sen, N.; Roy, A.; Dasgupta, S. B.; Ganguly, A.; Mohanta, B. C.; Dinda, B.; Majumder, H. K., Differential induction of Leishmania donovani bi-subunit topoisomerase I-DNA cleavage complex by selected flavonoids and camptothecin: activity of flavonoids against camptothecin-resistant topoisomerase I, *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 1121–1132, doi: 10.1093/nar/gkj502.
89. Zhai, L.; Chen, M.; Blom, J.; Theander, T. G.; Christensen, S. B.; Kharazmi, A., The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1999**, 43, 793–803, doi: 10.1093/jac/43.6.793.
90. Torres-Santos, E. C.; Rodrigues, J. M.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A. C.; Rossi-Bergmann, B., Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy-4'methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **1999**, 43, 1776–1778, doi: 10.1128/AAC.43.7.1776.
91. Bekhit, A. A.; El-Agroudy, E.; Helmy, A.; Ibrahim, T. M.; Shavandi, A.; Bekhit, A., Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs, *Eur. J. Med. Chem.,* **2018**, 160, 229–244, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.022.
92. Waterston, R.; Sulston, J., The genome of Caenorhabditis elegans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92, 10836–10840, doi: 10.1073/pnas.92.24.10836.
93. Barrière, A.; Félix M. A., Isolation of C. elegans and related nematodes, *WormBook,* **2014**, 1–19, doi: 10.1895/wormbook.1.115.2.
94. Zarkower, D., Somatic sex determination *WormBook*, **2006**, 1–12, doi: 10.1895/wormbook.1.84.1.

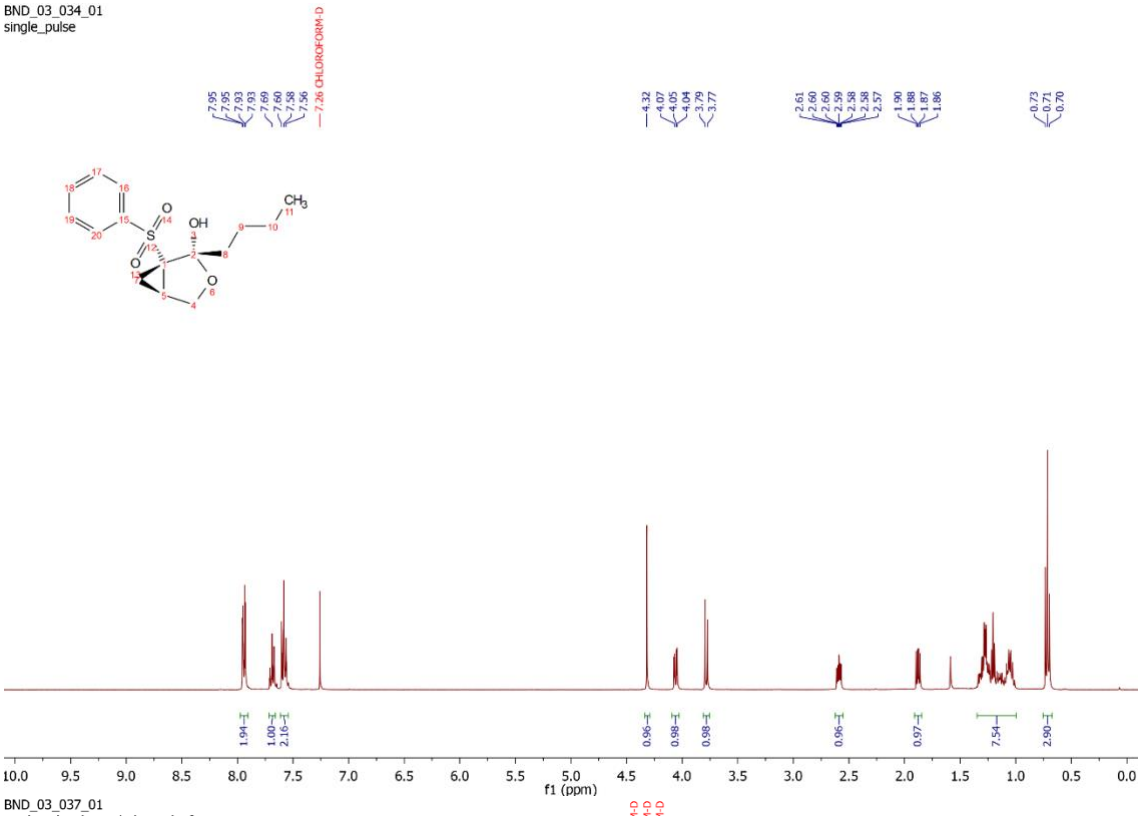
95. Raizen, D.; Zimmerman, J.; Maycock, M.; Uyen, D. Ta; Young-jai, Y.; Meera, V. S.; Allan, I. P., Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state, *Nature,* **2008**, 451, 569–572, doi: 10.1038/nature06535.
96. Apfeld J., Scott J., (2018) What Can We Learn About Human Disease from the Nematode C. elegans?, *Methods Mol. Biol.,* 1706, 53–75, doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_4.
97. Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. D.; Nakamura C. V., Recent advances in Leishmaniasis treatment, *Int. J. Infect. Dis.*, **2011**, 15, 525–523, doi: 10.1016/j.ijid.2011.03.021.
98. Cabanillas, B. J.; Le Lamer, A. C.; Castillo, D.; Arevalo, J.; Rojas, R.; Odonne, G.; Bourdy, G.; Moukarzel, B.; Sauvain, M.; Fabre, N., Caffeic acid esters and lignans from Piper sanguineispicum, *J. Nat. Prod.*, **2010**, 73, 1884–1890, doi: 10.1021/np1005357.
99. Konrádová, D., Výzkum a vývoj nových biologicky aktivních látek s antileishmaniální aktivitou: Syntéza (-)-Sanguinolignanu A, Olomouc, **2015**, diplomová práce (Mgr.), Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
100. Konrádová, D., Biologické aplikace sekundárních rostlinných metabolitů fenyl propanoidového původu, Olomouc, **2019**, disertační práce (Ph.D.), Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
101. Milišiūnaitė, V.; Kadlecová A.; Žukauskaitė, A.; Doležal, K.; Strnad, M.; Voller, J.; Arbačiauskienė, E.; Holzer, W.; Šačkus, A., Synthesis and anthelmintic activity of benzopyrano[2,3-*c*]pyrazol-4(2*H*)-one derivatives, *Mol. Divers.,* **2019**, 24, 1025–1042, doi: 10.1007/s11030-019-10010-3.
102. Brenner, S., The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, **1974**, 77, 71–94.
103. Kolb H. C.; Finn M. G.; Sharpless K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie*, **2001**, 40, 2004–2021, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
104. Dhameja, M.; Pandey, J., Bestmann-Ohira Reagent: A Convenient and Promising Reagent in the Chemical World, *Asian J. Org. Chem.*, **2018**, 7, 1502–1523, doi:10.1002/ajoc.201800051.

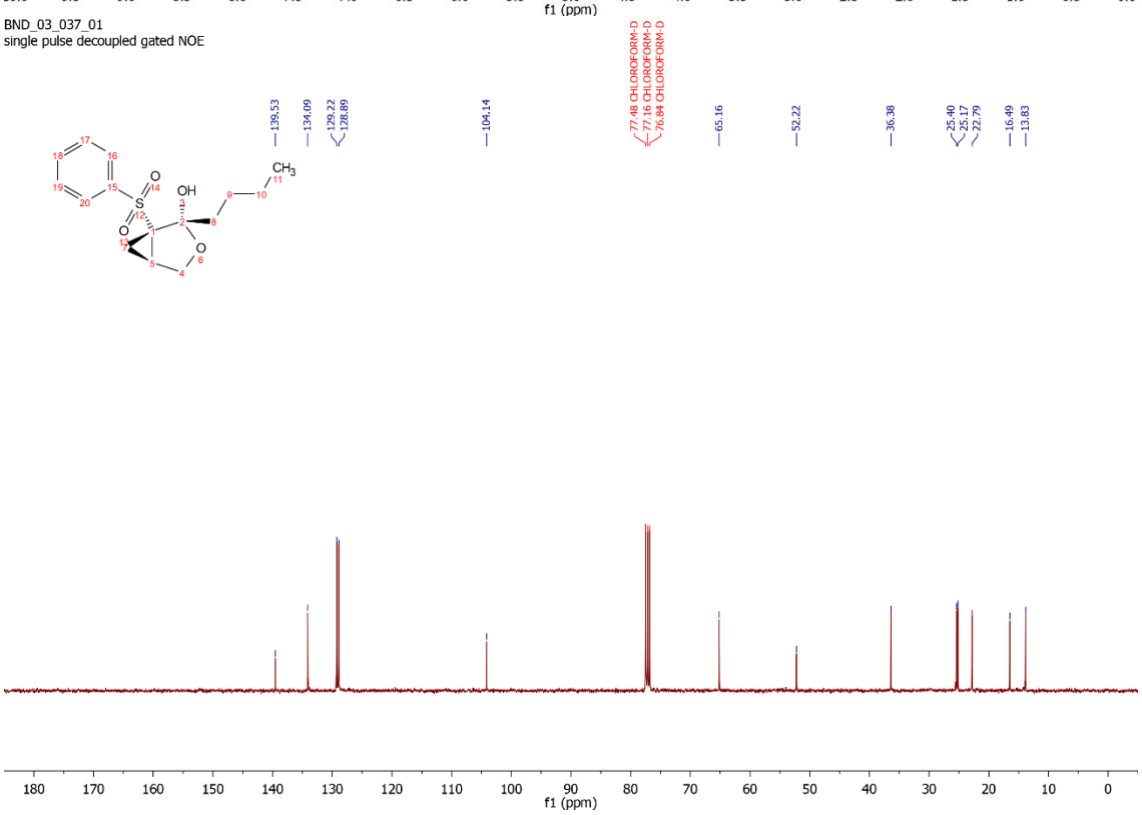
7 PŘÍLOHY

7.1 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-3

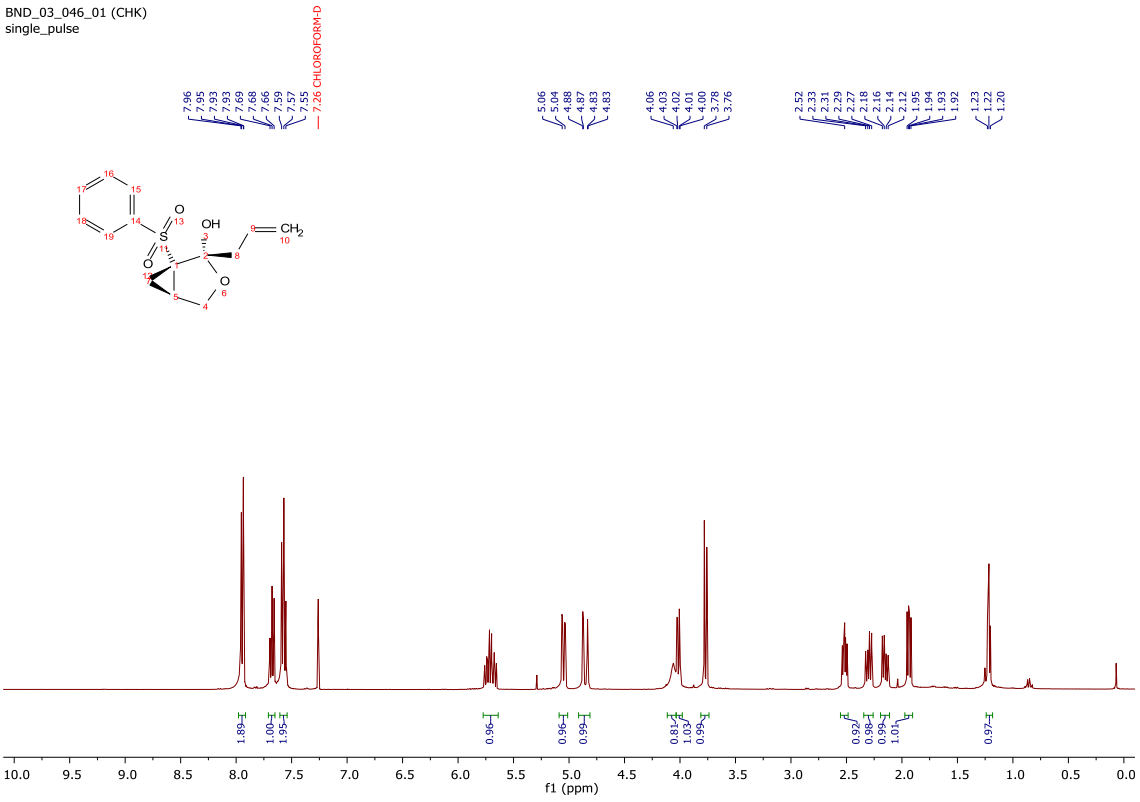


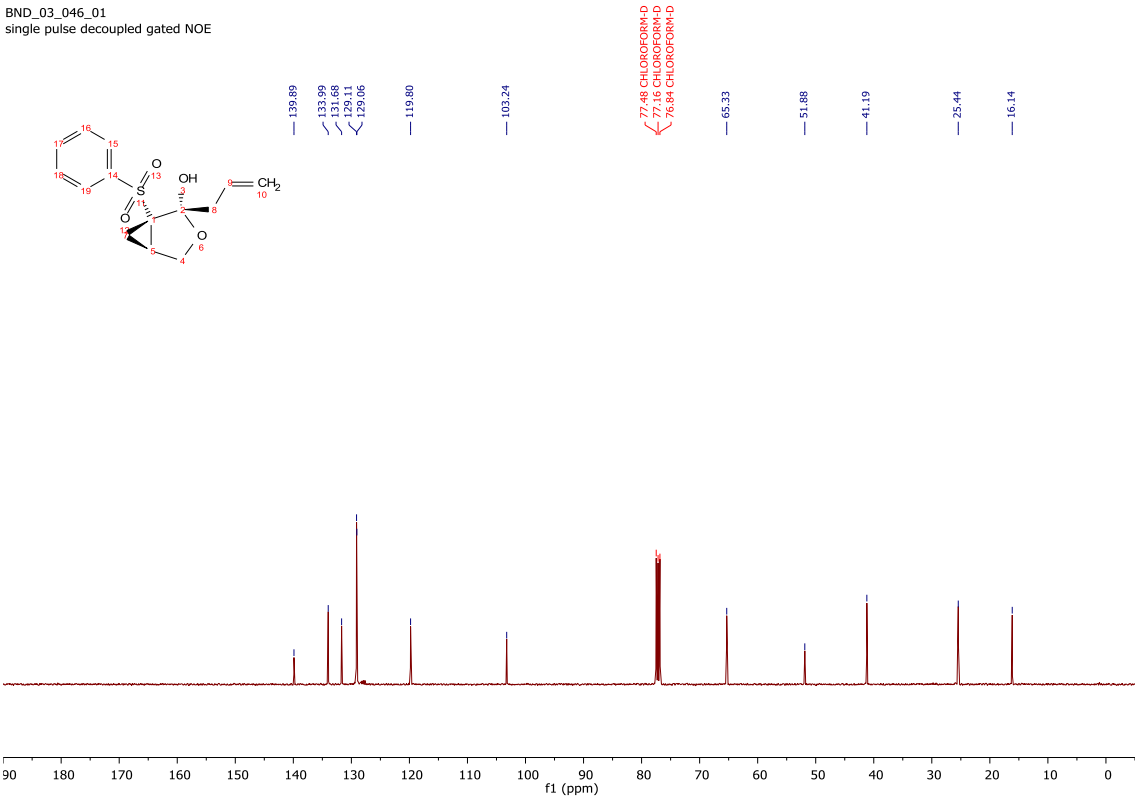
7.2 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-4a



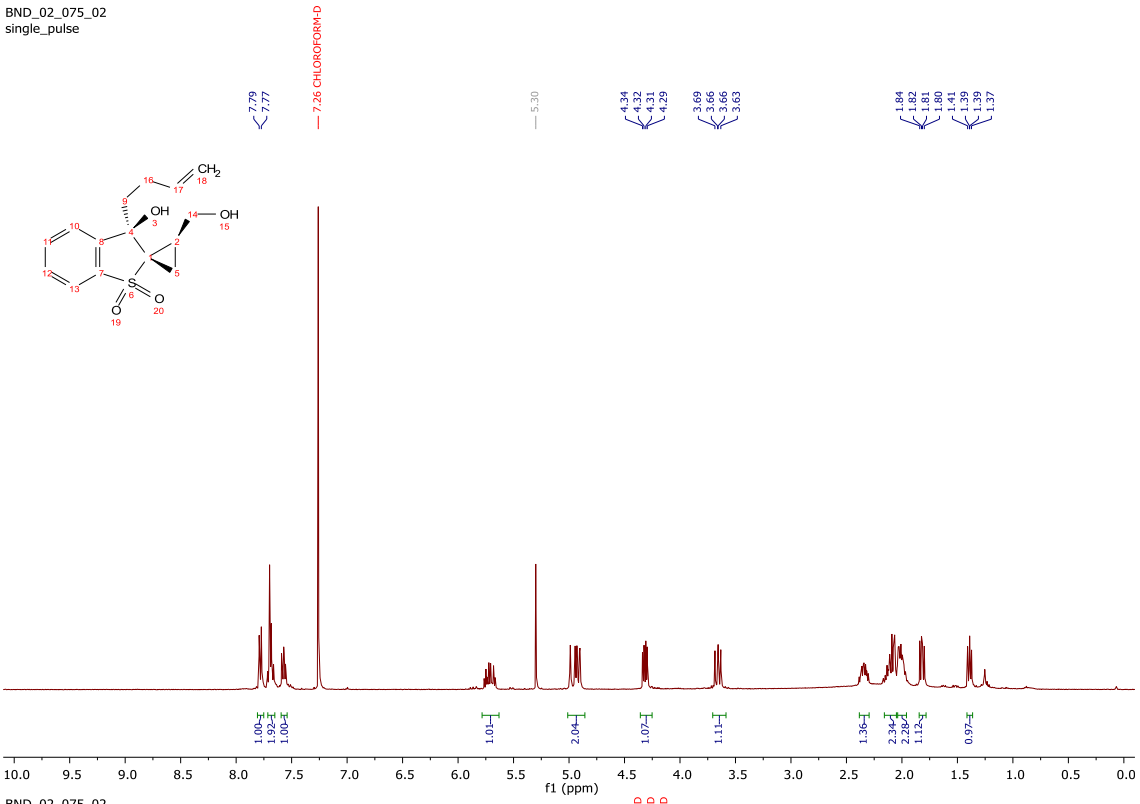


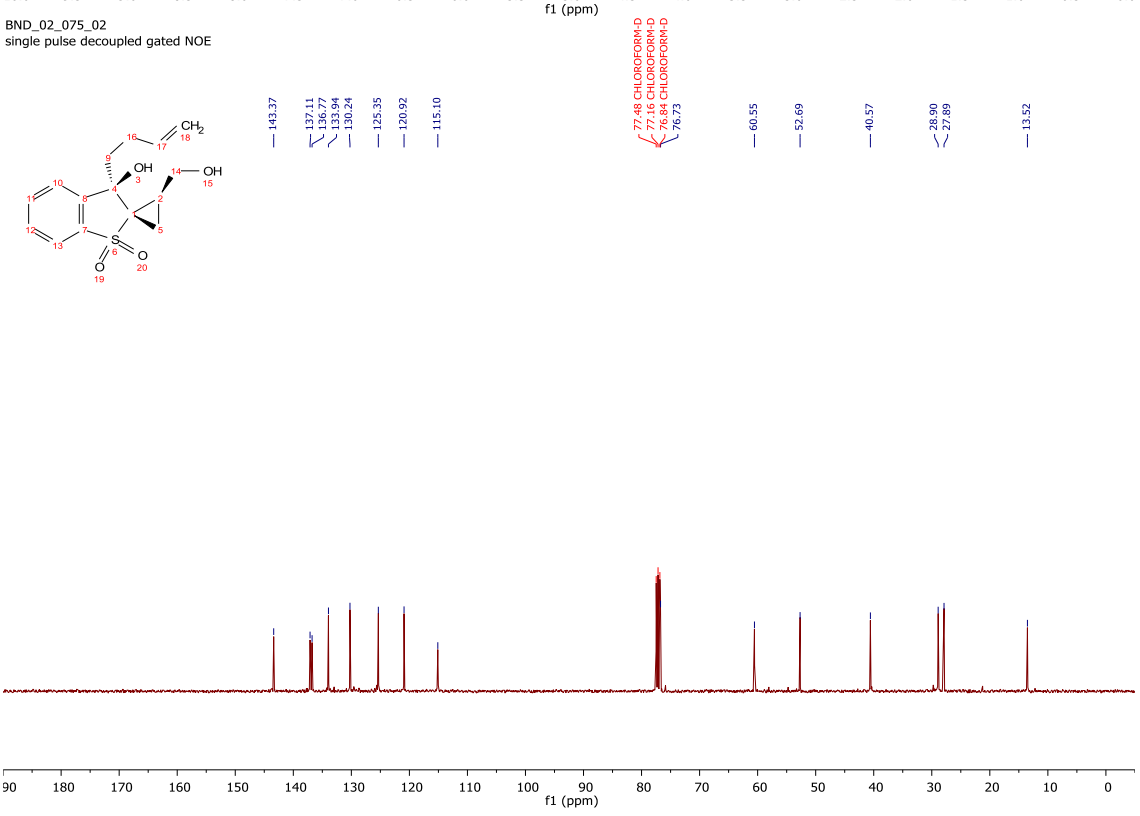
7.3 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-4b



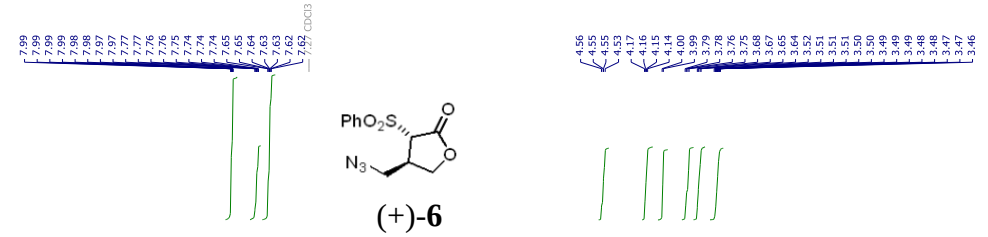


7.4 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-5

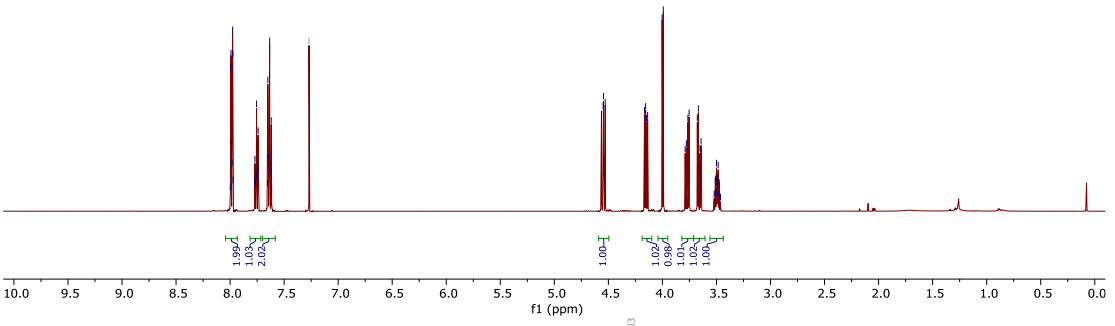


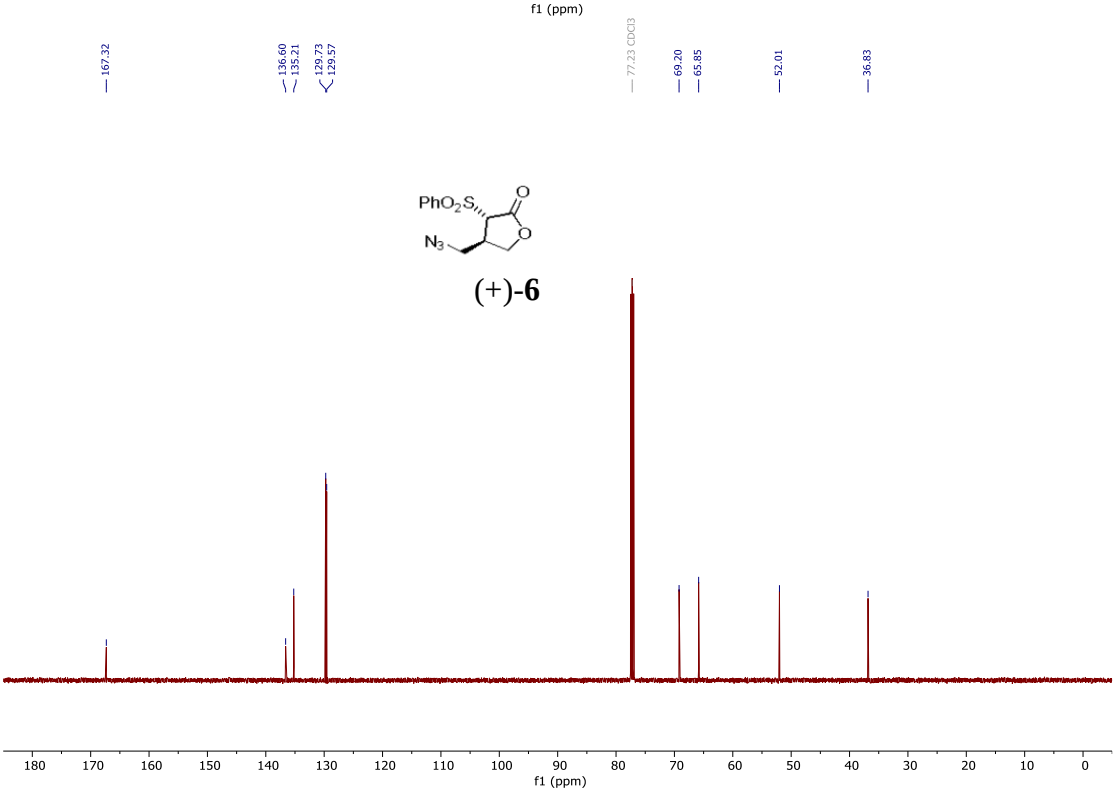


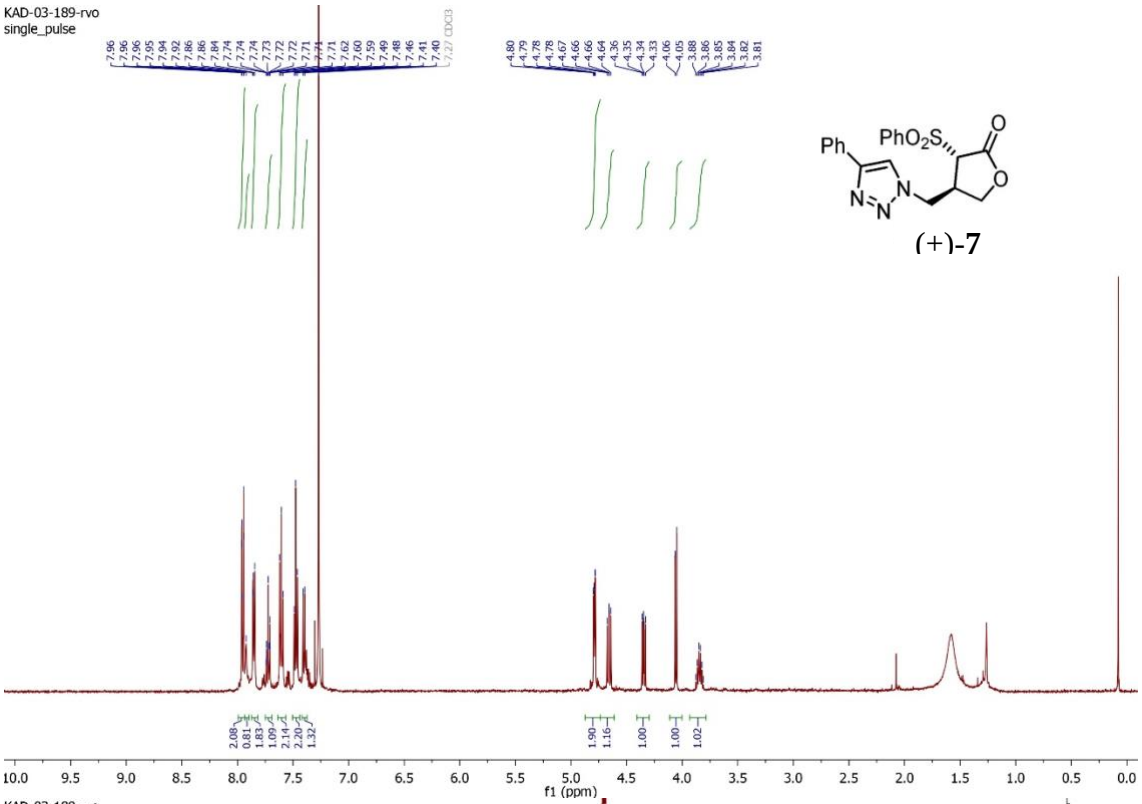
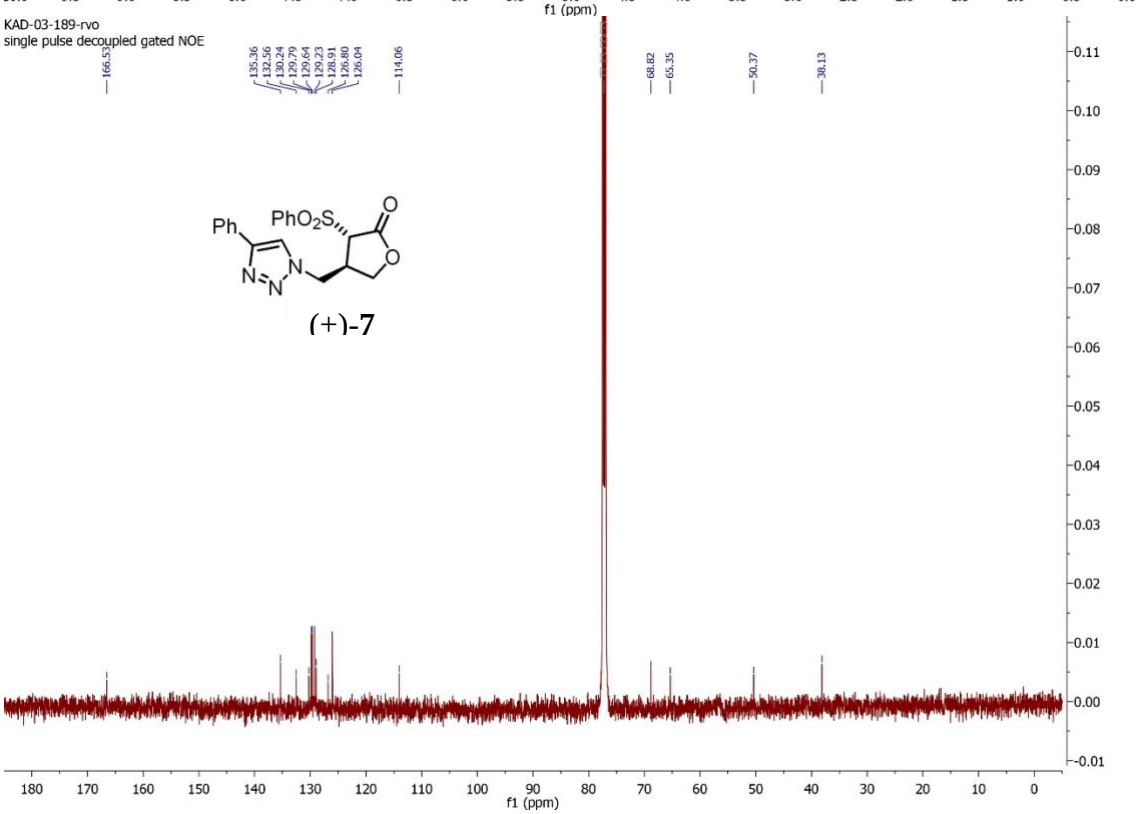
7.5 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-6



(+)-**6**





(+)-**6**

7.6 ^{1}H a ^{13}C NMR spektra látky (+)-7