

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Romana Nesnadná

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Príprava brassinosteroidných analógov
s aminokyselinami a ich testovanie na cytotoxickú
aktivitu**

Bakalárska práca

Romana Nesnadná

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením
RNDr. Miroslava Kvasnici, Ph.D. a za použitia citovanej literatúry

V Olomouci dňa

.....

Romana Nesnadná

Súhrn

Brassinosteroidy sú fytohormóny esenciálne pre správny rast a vývoj rastlín. Okrem toho bol zistený ich antivirálny, antioxidačný a neuroprotektívny účinok v živočíšnych bunkách. Taktiež bol pozorovaný ich antiproliferačný a antiangiogénny účinok v nádorových bunkových líniách bez vplyvu v normálnych bunkách. Ich mechanizmus pôsobenia v živočíšnych bunkách nie je známy. Na základe výsledkov predchádzajúcej štúdie, ktorá poukazuje na zaujímavú biologickú aktivitu aminokyselinového derivátu BR4848, bolo v rámci bakalárskej práce pripravených a popísaných 20 derivátov s aminokyselinami, ktoré zahŕňali alanín, valín, fenylalanín, leucín a metionín v konfigurácii D a L, a hydroxylové skupiny na steroidnom skelete v konfigurácii α alebo β na C-2 a C-3. Potenciálny antiproliferačný účinok bol testovaný v koncentráciách 50; 16; 5,6; 1,9; 0,6 a 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v bunkových líniách HeLa, K-562 a ľudských fibroblastoch BJ. Testovanie prebiehalo v triplicáte, z ktorého bola stanovená priemerná hodnota IC_{50} . Za účelom detailnejšieho štúdia väzby brassinosteroidov na receptor bol vybraný a následne modifikovaný najaktívnejší testovaný derivát prostredníctvom fluorescenčnej značky BODIPY TR. Pomocou fluorescenčného mikroskopu bol v bunkových líniách HeLa a BJ pozorovaný transport derivátu s BODIPY TR a derivátu s NBD cez plazmatickú membránu, do cytosolu a jadra buniek, a bola stanovená ich hodnota IC_{50} . Derivát s BODIPY TR vykazoval optimálne vlastnosti pre detailnejšiu štúdiu biologickej aktivity brassinosteroidov v živočíšnych bunkách.

Summary

Brassinosteroids are group of plant hormones, which are essential for proper growth and development of a plant. In addition, their antiviral, antioxidant and neuroprotective effect in animal cells was found. Their antiproliferative and antiangiogenic effects on tumor cell lines have also been observed without affecting normal cells. Their mode of action in animal cells is unknown. Based on the results of a previous study, which points out interesting biological activity of amino acid derivate BR4848, 20 derivatives with amino acids, including alanine, valine, phenylalanine, leucine and methionine in the D and L configurations, and hydroxyl groups on steroid skeleton in the α or β configuration on C-2 and C-3 were prepared and described in this bachelor thesis. The potential antiproliferative effect was tested at concentrations of 50; 16; 5,6; 1,9; 0,6 and 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ in HeLa, K-562, and BJ human fibroblasts. Testing was performed in triplicates, from which the average IC_{50} value was determined. In order to study more closely the binding of brassinosteroids to the receptor, the most active test derivative was selected and subsequently modified by the fluorescent label BODIPY TR. Using a fluorescence microscope, the transport of derivate with BODIPY TR and derivate with NBD across the plasma membrane into the cytosol and the cell nucleus was observed in HeLa and BJ cell lines, and their IC_{50} value was determined. The BODIPY TR derivate exhibited optimal features for a more detailed study of the brassinosteroid biological activity in animal cells.

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala svojmu vedúcemu RNDr. Miroslavovi Kvasnicovi, Ph.D. za jeho čas, trpezlivosť, milý prístup, pomoc pri vyhodnocovaní NMR spektier a odborné vedenie pri spracovávaní tejto bakalárskej práce. Taktiež by som rada poďakovala Mgr. Lucii Rárovej, Ph.D. a pani Olge Hustákovej za cenné rady, milý prístup a pomoc pri testovaní nasyntetizovaných látok.

Obsah

1 Úvod	1
2 Ciele práce	2
3 Literárny prehľad.....	3
3.1 Brassinosteroidy.....	3
3.1.1 História.....	3
3.2 Chemická štruktúra brassinosteroidov	4
3.2.1 Vzťah medzi štruktúrou a aktivitou v rastlinných bunkách	5
3.2.2 Vzťah medzi štruktúrou a aktivitou v živočíšnych bunkách.....	5
3.3 Biologická aktivita brassinosteroidov na ľudské bunky	6
3.3.1 Antivirálna aktivita brassinosteroidov	6
3.3.2 Neuroprotektívna aktivita brassinosteroidov	7
3.3.3 Antiangiogénna aktivita brassinosteroidov	7
3.3.4 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov a ich derivátov	8
3.3.5 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prsníka a prostaty	9
3.3.5.1 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prsníka.....	10
3.3.5.2 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prostaty.....	11
3.3.6 Syntetický derivát BR4848	13
3.4 Fluorescenčná mikroskopia	14
4 Materiál a metódy.....	16
4.1 Chemická časť	16
4.1.1 Použité chemikálie a roztoky	16
4.1.2 Zoznam použitých prístrojov a zariadení	17
4.1.3 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	17
4.1.3.1 Všeobecný postup prípravy esteru.....	17
4.1.3.2 Všeobecný postup prípravy zmesi izomérov 2 α ,3 α - a 2 β ,3 β -diolového esteru	18
4.1.3.3 Postup prípravy karboxymetyloxímu	18
4.1.3.4 Príprava derivátu 23.....	19
4.1.3.5 Všeobecný postup spracovania príslušných chemických reakcií.....	19
4.1.3.6 Identifikácia látok	20
4.2 Biologická časť	20
4.2.1 Biologický materiál	20

4.2.2 Použité chemikálie a roztoky	20
4.2.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení	22
4.2.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	22
4.2.4.1 Pasážovanie a vysievanie bunkových línií	22
4.2.4.2 Príprava experimentu.....	23
4.2.4.3 Príprava a aplikácia látok na testovanie	24
4.2.4.4 Stanovenie viability buniek pomocou resazurinu.....	26
5 Výsledky.....	28
5.1 Chemická časť	28
5.1.1 Príprava esterov	28
5.1.2 Príprava diolov	32
5.1.3 Príprava karboxymetyloxímu 22 z derivátu 14B	41
5.1.4 Príprava derivátu 23 naviazaním fluorescenčnej značky BODIPY TR	42
5.2 Biologická časť	42
5.2.1 Hodnotenie cytotoxicity pripravených derivátov	42
5.2.2 Pozorovanie transportu 23 a MK-435 do cytosolu a jadra buniek	44
6 Diskusia	48
7 Záver.....	51
8 Zdroje	52

Zoznam symbolov a skratiek

24-epiBL	24-epibrassinolid
24-epiCS	24-epicastasteron
28-homoBL	28-homobrassinolid
28-homoCS	28-homocastasteron
A 548	Bunky ľudského adenokarcinomu odvodeného od alveolárnych buniek typu II
AK	Aminokyselina
Akt, PKB	Proteín kináza B
Apaf-1	Apoptický proteázomový aktivačný faktor-1
AR	Androgénny receptor
AZI	Antizymový inhibítor
Bax	Z angl. Bcl-2-like protein 4
Bcl- X _L	Z angl. B-cell lymphoma-extra large
Bcl-2	Z angl. B-cell lymphoma 2
BJ	Normálne ľudské fibroblasty
Boc	<i>Tert</i> -butoxykarbonyl
BR	Brassinosteroid
BR4848	2 α , 3 α -dihydroxy-6-oxo-5 α -androstan-17 β -yl <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxykarbonyl)-D,L-valín
CDCl ₃	Deuterovaný chloroform
CDK	Cyklín-dependentná kináza
CDKI	Cyklín-dependentný kinázový inhibítor
CEM	Bunky T-lymfoblastickej leukémie
CMO	Karboxymetylhydroxylamín hemihydrochlorid
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylénamín
DMAP	4-(dimetylamino)pyridín

DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DMF	Dimetylformamid
DMSO	Dimetylsulfoxid
DU-145	Bunky rakoviny prostaty (hormón-nesenzitívne)
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylaminoethyl)karbodiimid
EGTA	Kyselina etylénglykol-bis(2-aminoetyléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová
ERK	Kináza regulovaná extracelulárnym signálom
EtOAc	Etylster kyseliny octovej
FAK	Fokálna adhezívna kináza
F-BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3 α ,4 α -diazas-indacen
FS	Fetálne tel'acie sérum
HeLa	Bunky rakoviny kŕčka maternice
HMEC-1	Ľudské kapilárne endotelové bunky
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HOS	Bunky osteosarkomu
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HUVEC	Ľudské endotelové bunky z pupočnej cievy
IL-6	Interleukín 6
K-562	Bunky chronickej myeloidnej leukémie
LNCaP	Bunky rakoviny prostaty (hormón-senzitívne)
MCF7	Bunky rakoviny prsníka (estrogén-senzitívne)
Mcl-1	Z angl. myeloid leukemia cell 1
MDA-MB-468	Bunky rakoviny prsníka (estrogén-nesenzitívne)
MDM2	Z angl. mouse double minute 2 homolog
MPP ⁺	1-metyl-4-fenylpyridín
NBD	Nitrobenzofurazán
NMO	<i>N</i> -metylmorfolín- <i>N</i> -oxid

OAZ	ODC antizým
ODC	Ornitín dekarboxyláza
p53	Tumor supresorový proteín p53
PA	Polyamíny
PAO	PA oxidáza
PARP	Poly(ADP-ribóza) polymeráza
PNT1a	Normálne epiteliálne bunky prostaty
pRb	Fosforylovaný retinoblastomový proteín
ROS	Reaktívne formy kyslíka
RPMI 8226	Bunky mnohopočetného myelómu
RVO	Rotačná vákuová odparka
SD	Smerodajná odchýlka
SMO	Spermín oxidáza
SSAT	Spermidín/spermín-N ¹ -acetyltransferáza
THF	Tetrahydrofurán
TLC	Chromatografia na tenkej vrstve
TMS	Tetrametylsilan
VEGF	Vaskulárny endotelový rastový faktor

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Chemická štruktúra prírodných zástupcov BR..	4
Obrázok 2: Základné charakteristiky chemickej štruktúry BR demonštrované na brassinolide	5
Obrázok 3: Chemická štruktúra derivátu BR s Boc-D,L-valínom, BR4848	13
Obrázok 4: Chemická štruktúra BODIPY.	15
Obrázok 5: Všeobecná schéma prípravy esteru s Boc-AK z východzieho ketónu.	18
Obrázok 6: Všeobecná schéma prípravy zmesi izomérov 2 α ,3 α - a 2 β ,3 β -diolového esteru z predchádzajúcej syntézy.	18
Obrázok 7: Schéma prípravy karboxymetyloxímu 22 z východzieho derivátu 14B .	18
Obrázok 8: Schéma naviazania fluorescenčnej značky na karboxymetyloxím 22 z predchádzajúcej syntézy.	19
Obrázok 9: Schéma pipetovania buniek na 96-jamkovú doštičku pre stanovenie cytotoxickej aktivity testovaných látok.	24
Obrázok 10: Schéma 96-jamkovej doštičky s pripravenou koncentračnou radou pre testovanie.	25
Obrázok 11: Schéma 96-jamkovej doštičky s bunkami pripravená na testovanie cytotoxicity pomocou resazurínu.	25
Obrázok 12: Premena redoxnej (modrej) formy farbiva resazurínu metabolicky aktívnou bunkou na jeho oxidačnú (červenú) formu resofurin.	26
Obrázok 13: Chemická štruktúra látok MK-432 , MK-435 a BODIPY TR kadaverínu.	27
Obrázok 14: Stručný prehľad látok pripravených pomocou všeobecného postupu prípravy esterov.	28
Obrázok 15: Stručný prehľad pripravených derivátov s hydroxylovými skupina na C-2 a C-3 v konfigurácii β .	32
Obrázok 16: Stručný prehľad pripravených derivátov s hydroxylovými skupina na C-2 a C-3 v konfigurácii α .	33
Obrázok 17: Chemická štruktúra karboxymetyloxímu 22 .	41
Obrázok 18: Chemická štruktúra fluorescenčnou derivátu 23 .	42
Obrázok 19: Transport derivátu 23 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do cytosolu a jadra buniek pozorovaný pomocou fluorescenčného mikroskopu počas 72 hodín v bunkách HeLa a BJ pri zväčšení 400 \times .	46
Obrázok 20: Transport derivátu MK-435 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do cytosolu a jadra bunky pozorovaný pomocou fluorescenčného mikroskopu počas 72 hodín v bunkách HeLa a BJ pri zväčšení 400 \times .	47

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Výsledné priemerné hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) z troch nezávislých meraní v dvoch nádorových bunkových líniách (HeLa, K-562) a normálnych ľudských fibroblastoch BJ po 72 hodinách inkubácie s pripravenými diolmi.	43
Tabuľka 2: Výsledné hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) z troch nezávislých meraní v nádorových bunkových líniách HeLa a normálnych ľudských fibroblastoch BJ po 72 hodinách inkubácie s fluorescenčnými derivátmi.	44

1 Úvod

Brassinosteroidy sú šiestou skupinou rastlinných hormónov nevyhnutných pre normálny rast a vývoj rastlín. Boli objavené a identifikované vo viacerých rastlinných druhoch. Vzhľadom na štruktúrnu podobnosť so živočíšnymi steroidmi bol testovaný a popísaný ich antivirálny, antioxidantný a neuroprotektívny účinok. Taktiež bol zistený antiproliferačný a antiangiogénny účinok prírodných a syntetických analógov v nádorových bunkách bez efektu na normálne bunky.

Bolo zistené, že určité funkčné skupiny korespondujú s vyšším inhibičným účinkom syntetických derivátov. Veľmi zaujímavú aktivitu vykazoval derivát BR4848, ktorá je spojená s prítomnosťou vicinálnych hydroxylov na steroidnom skelete v konfigurácii α na C-2, C-3 a oxo skupinou na C-6. Svoju úlohu taktiež zohráva zmes D,L-valínu na bočnom reťazci. Antiproliferačný účinok brassinosteroidov je predmetom skúmania viacerých vedeckých tímov a výsledky poukazujú na zmenu hladiny proteínov zapojených v rôznych apoptických kaskádach, ktoré sa zhodujú s pôsobením chemoterapeutík ako je napríklad cisplatina či raloxifén. Vzhľadom na tieto skutočnosti sú potenciálnymi kandidátmi v protinádorovej terapii. Mechanizmus ich pôsobenia v živočíšnych bunkách, na rozdiel od rastlinných, nie je stále známy. Predpokladá sa určitá spojitosť so steroidnými receptormi alebo ich príslušnými koaktivátormi. Táto práca si kladie za cieľ pripraviť aminokyselinové analógy brassinosteroidov v maximálnej čistote a najaktívnejší z nich modifikovať pomocou fluorescenčnej značky BODIPY TR za účelom detailnejšieho štúdia väzby na steroidný receptor.

2 Ciele práce

1. Vypracovanie literárnej rešerše
2. Syntéza brassinosteroidných analógov s aminokyselinami
3. Analýza pripravených derivátov
4. Testovanie cytotoxickej aktivity
5. Výber najaktívnejšieho derivátu a jeho modifikácia pre detailnejšie štúdium biologickej aktivity

3 Literárny prehľad

3.1 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) sú rastlinné hormóny objavené a identifikované vo viacerých rastlinných druhoch. Vo vyšších rastlinách sa BR vyskytujú vo väčšine orgánov ako je koreň, stonka, list, kvet a zároveň sa vyskytujú aj v peli, prašníkoch, semenách či zrnách. Vo všeobecnosti sú v rastlinách prítomné vo veľmi nízkych koncentráciách, zvýšené hladiny BR boli namerané predovšetkým v mladých rastúcich pletivách. V peli a semenách sa koncentrácie BR pohybujú v rozsahu 1–100 ng·g⁻¹ čerstvej hmotnosti, zatiaľ čo vo vegetatívnych orgánoch sa ich zastúpenie pohybuje v rozmedzí od 0,01 do 0,1 ng·g⁻¹ čerstvej hmotnosti (Bajguz *et* Tretyn, 2003).

BR sú esenciálne pre normálny rast, reprodukciu a vývoj rastlín. Poruchy v ich biosyntéze alebo vo vnímaní sú spojené s oneskoreným vývojom, zníženou plodnosťou až sterilitou a typickými zakrpatenými tmavozelenými listami. Zastávajú dôležitú úlohu pri klíčení semien, raste koreňa, delení, diferenciácii buniek a stavbe bunkovej steny. Taktiež regulujú otváranie prieduchov, kvitnutie, senescenciu, reprodukčné procesy a fotomorfogézu (Haubrick *et* Assmann, 2006). Bolo dokázané, že BR zvyšujú výnos plodín, zlepšujú ich kvalitu v stresových podmienkach a zmierňujú toxické účinky ťažkých kovov, ako je hliník, nikel, olovo a meď (Bajguz *et* Hayat, 2009).

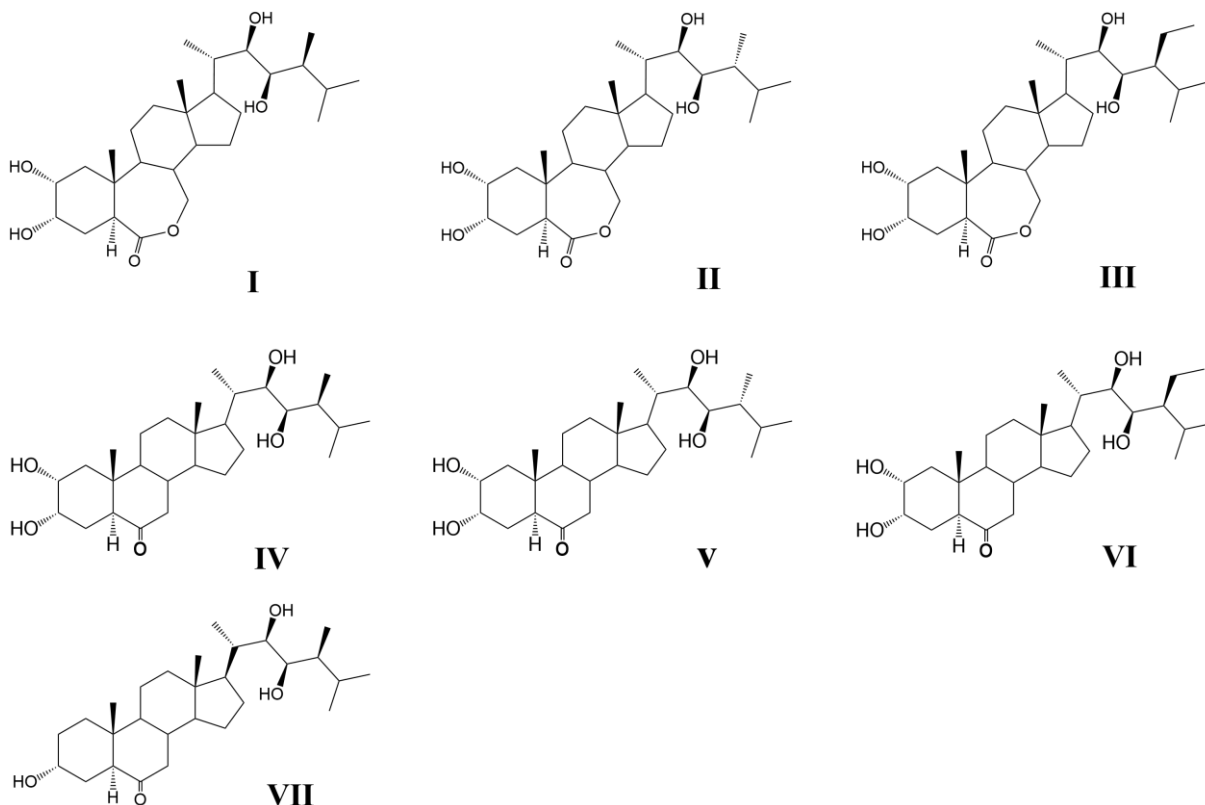
3.1.1 História

Moderný výskum BR začal v Japonsku a v USA. Prvá zmienka pochádza z roku 1968 z Japonska, kde boli z listov *Distylium racemosum* pomocou éterového extraktu izolované tri aktívne frakcie, neskôr pomenované ako *Distylium factor* A₁, A₂, B. Aktivita, ktorú vykazovali, bola podobná cytokinínom a auxínom. Zistilo sa, že ich štruktúra neobsahuje dusíkatý heterocyklus, a preto by mohlo ísť o ďalší druh rastlinných hormónov (Marumo *et al.*, 1968).

V roku 1941 v USA Mitchell a Whitehead zistili, že extrakt z peľových zrn kukurice siatej vyvoláva aktívny rast špecifických vegetatívnych častí rôznych druhov rastlín (Mitchell *et* Whitehead, 1941). Mitchell sústredil svoju pozornosť na bioaktivitu rôznych extraktov z nezrelých fazuľových semien, ktorú vykazovali v predlžovaní druhého internódu fazule (Mitchell *et al.*, 1951). Vysoká bioaktivita bola pozorovaná v extrakte z peľu *Brassica napus* L., nazvaný ako brassin (Mitchell *et al.*, 1970).

Prvý BR, nazvaný ako brassinolid, bol izolovaný v roku 1979 z peľu *B. napus* L. Jeho štruktúra bola určená pomocou rentgénovej kryštalografie. Brassinolid bol

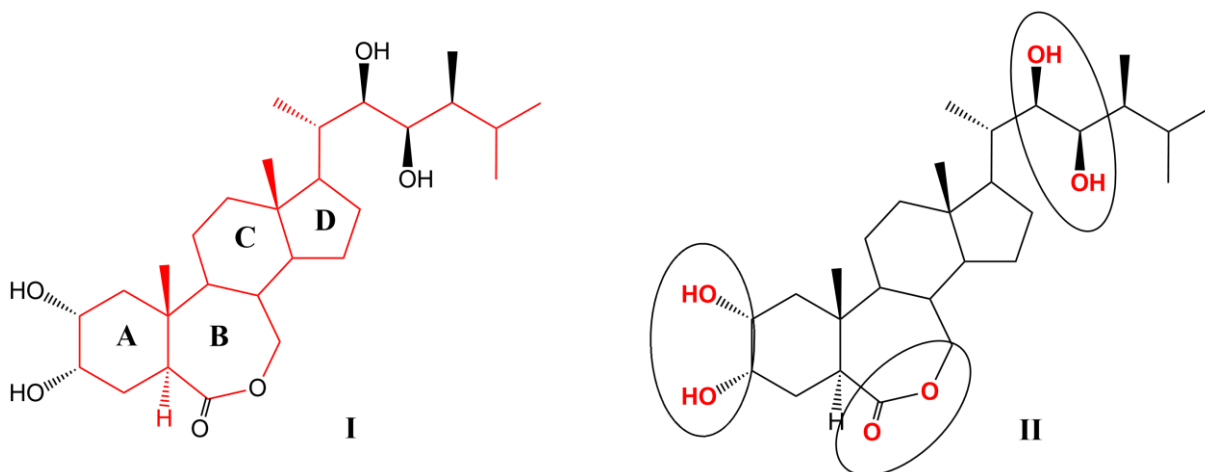
charakterizovaný ako polyhydroxylová steroidná látka štruktúrou podobná steroidným hormónom (Grove *et al.*, 1979). V Tokiu bol charakterizovaný druhý BR, castasteron (Yokota *et al.*, 1982). Odvtedy bolo identifikovaných viac ako 70 ďalších BR, pričom najväčšie zastúpenie v raslinnej ríši majú brassinolid, castasteron a typhasterol (Obrázok 1) (Fujioka *et Sakurai*, 1997).



Obrázok 1: Chemická štruktúra prírodných zástupcov BR. (I) brassinolid, (II) 24-epibrassinolid, (III) 28-homobrassinolid, (IV) castasteron, (V) 24-epicastasteron, (VI) 28-homocastasteron (VII) typhasterol.

3.2 Chemická štruktúra brassinosteroidov

BR sú nízkomolekulárne látky steroidnej povahy. Základom ich štruktúry je 5α -cholestanová kostra, ktorá sa skladá z centrálného jadra tvoreného 4 nasýtenými kruhmi (A,B,C,D) a bočným reťazcom. Jednotliví zástupcovia sa odlišujú umiestnením hydroxylových skupín na kruhu A, prítomnosťou laktónu alebo ketónu na kruhu B, či rôznymi modifikáciami bočného reťazca (Obrázok 2) (Bajguz *et Tretyn*, 2003).



Obrázok 2: Základné charakteristiky chemickej štruktúry BR demonštrované na brassinolide. (I) zvýraznená 5 α -cholestanová kostra, ktorá sa skladá z kruhu A,B,C,D a bočného reťazca, (II) zvýraznené funkčné skupiny esenciálne pre biologickú aktivitu BR.

3.2.1 Vzťah medzi štruktúrou a aktivitou v rastlinných bunkách

Na základe viacerých testovaní bolo zistené, že niektoré skupiny sú spojené so zvýšením alebo znížením biologickej aktivity BR v rastlinných a v živočíšnych bunkách.

Aktivita BR v rastlinných bunkách je spojená s prítomnosťou hydroxylových skupín na C-2 a C-3 v konfigurácii α na kruhu A. Zmena v orientácii hydroxylových skupín vedie k poklesu biologickej aktivity v poradí $2\alpha,3\alpha > 2\alpha,3\beta > 2\beta,3\alpha > 2\beta, 3\beta$. Z toho vyplýva, že α -orientácia hydroxylovej skupiny na C-2 je nevyhnutná pre biologickú aktivitu BR v rastlinných bunkách (Bajguz *et* Tretyn, 2003).

Štruktúrne modifikácie na kruhu B majú taktiež výrazný vplyv na ich aktivitu. Najaktívnejší je 7-oxalakton a biologická aktivita zlúčenín klesá v poradí: 7-oxalakton, 6-oxo, 6-deoxo a 6-hydroxy (Bajguz, 2011).

Na biologickú aktivitu vplyvajú aj skupiny umiestnené na bočnom reťazci. Prírodná konfigurácia hydroxylových skupín na bočnom reťazci, 22R,23R, je aktívna, zatiaľ čo syntetická konfigurácia, 22S,23S, vykazuje minimálny biologický účinok (Takatsuto *et al.*, 1983). Typ funkčnej skupiny na C-24 má taktiež vplyv na biologickú aktivitu, pričom aktivita klesá v poradí: metyl > etyl > metylén > vodík (Mandava, 1988).

3.2.2 Vzťah medzi štruktúrou a aktivitou v živočíšnych bunkách

Z testovania BR v nádorových bunkách taktiež vyplýva, že prítomnosť určitých skupín je zodpovedá za ich cytotoxický účinok.

V rastlinných biotestoch sú najviac aktívne prírodné BR, konkrétne sa jedná

o brassinolid, 24-epibrassinolid (24-epiBL) a 28-homobrassinolid (28-homoBL). Tieto BR sú v nádorových bunkách buď neaktívne alebo vykazujú len zanedbateľnú cytotoxickú aktivitu. Testovaním širokej škály derivátov BR s rôznym usporiadaním funkčných skupín na kruhu A a B sa dospelo k všeobecným záverom v súvislosti vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou.

Prítomnosť hydroxyly či ketónu na C-3, či susediacich hydroxylov na C-2, C-3 alebo C-3, C-4 v konfigurácii α je nevyhnutná pre cytotoxickú aktivitu. Najvyššia cytotoxická aktivita bola pozorovaná s 2α , 3α -diolovými derivátmi. Absencia hydroxylovej alebo ketónovej skupiny na kruhu A, či zmena ich konfigurácie vedie k úplnej strate ich cytotoxickej aktivity.

Čo sa týka kruhu B, tak vyššia aktivita bola zaznamenaná u šesťčlenného kruhu. Deriváty 24-epicastasteronu (24-epiCS) a syntetické deriváty cholestánu obsahujúce vo svojej štruktúre 6-oxo skupinu sú aktívnejšie ako deriváty brassinolidu, či deriváty obsahujúce 6-oxo-7-oxa skupinu. Úplná strata kyslíka na kruhu B je spojená s nižšou aktivitou.

Deriváty obsahujúce na bočnom reťazci susediace hydroxyly na C-22, C-23 v R konfigurácii vykazujú vyššiu cytotoxicitu ako deriváty, ktoré obsahujú tieto hydroxyly v S konfigurácii. Prítomnosť hydroxylov na C-7, C-22 a C-25 znižuje takmer úplne ich antiproliferačný účinok (Malíková *et al.*, 2008; Rárová *et al.*, 2016).

3.3 Biologická aktivita brassinosteroidov na ľudské bunky

Rola BR v rastlinných bunkách bola už intenzívne skúmaná a popísaná. O ich pôsobení na ľudské bunky však stále nie je dostatok informácií. Rôzne štúdie potvrdzujú bezpečnosť BR a umožňujú tak ich testovanie. Hodnota akútnej toxicity (LD_{50}) po orálnom požití 24-epiBL u myši je vyššia ako $5\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Kovalenko *et al.*, 2010). V Amesovom teste taktiež nevykazoval 24-epiBL žiadne mutagénne vlastnosti (Voitovich *et al.*, 2004).

3.3.1 Antivirálna aktivita brassinosteroidov

Viacere štúdie potvrdzujú antivirálnú aktivitu prírodných BR vrátane 28-homocasteronu (28-homoCS) a 28-homoBL voči RNA aj DNA vírusom, ktoré zahŕňajú *Herpes Simplex Virus*, *Morbillivirus*, *Arenavirus*, *Vesiculovirus* a *Poliovirus*. Ich antivirálna aktivita spočíva v znemožnení syntézy proteínov a dozrievania vírusových častí (Castilla *et al.*, 2010).

Na základe týchto výsledkov bolo testovaných viacero sérií synteticky

pripravených derivátov BR na ich antiherpetickú či inú antivirálnu aktivitu. Tieto deriváty boli testované na konfluentnej a neprerastenej kultúre Vero buniek a následne roztriedené na základe rozdielneho cytotoxického účinku. Ich účinok bol teda odlišný voči rôznym vírusom. Bolo zistené, že deriváty obsahujúce susediace hydroxyly v S konfigurácii na C-22, C-23 sú účinnejšie ako deriváty s R konfiguráciou týchto hydroxylov. Taktiež bolo zistené, že prítomnosť fluóru alebo hydroxyly na C-5 je spojená s vyššou aktivitou (Michellini *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2000; Wachsman *et al.*, 2002; Wachsman *et al.*, 2004,).

3.3.2 Neuroprotektívna aktivita brassinosteroidov

Oxidatívny stres a apoptóza sú častou príčinou poškodenia buniek nervového systému s následným vývojom rôznych neurodegeneratívnych porúch, ako je napríklad Parkinsonova choroba. Antioxidačné vlastnosti prírodných BR boli demonštrované ich exogénnou aplikáciou na rôzne typy zeleniny. 24-epiBL, ktorý sa prirodzene vyskytuje v bôbe, zvyšoval antioxidačnú aktivitu prostredníctvom modulácie antioxidačnej enzymatickej kaskády. Po jeho aplikácii bola pozorovaná zvýšená hladina peroxidu vodíka v apoplaste mezofylových buniek spojená so zvýšenou toleranciou voči oxidačnému stresu (Mazorra *et al.*, 2002).

Carange *et al.* (2011) skúmali vplyv BR v bunkách nervového systému s použitím 1-metyl-4-fenylpyridínu (MPP⁺), ktorý je potenciálny induktor oxidatívneho stresu v dopaminergných neurónoch. Bola skúmaná a popísaná schopnosť 24-epiBL zvyšovať ochranu PC12 nervových buniek voči MPP⁺, ktoré sa používajú ako *in vitro* bunkový model Parkinsonovej choroby. Aplikáciou 24-epiBL bola redukovaná hladina intracelulárnych reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a znížená aktivita enzýmov: superoxid dismutázy, katalázy a glutathion peroxidázy. Pozorované antioxidačné vlastnosti 24-epiBL viedli k inhibícii MPP⁺ indukovanej apoptózy prostredníctvom redukcie fragmentácie DNA, zníženiu pomeru „Bcl-2-like protein 4“/„B-cell lymphoma-2“ (Bax/Bcl-2) a taktiež aktivity kaspázy-3 (Carange *et al.*, 2011).

3.3.3 Antiangiogénna aktivita brassinosteroidov

Angiogenéza je komplexný proces tvorby a rastu krvných kapilár dôležitý najmä v ranných fázach vývoja jedinca. V dospelosti sa uplatňuje len zriedka a to predovšetkým pri hojení, zápaloch alebo pri ovulácii. Krvné kapiláry zabezpečujú zásobovanie tkanív kyslíkom a živinami, a zároveň odvádzanie oxidu uhličitého a odpadných produktov metabolizmu (Carmeliet, 2000; Folkman, 1971, 1984).

Prostredníctvom kapilárnej siete je taktiež počas nekontrolovateľného nádorového bujnenia zabezpečené dostatočné zásobovanie kyslíkom a živinami pre rast ďalších nádorových buniek. Jedná sa o patologickú angiogenézu, v ktorej hrajú dôležitú úlohu endotelové bunky. Tieto bunky sú netransformované a taktiež u nich nie je pravdepodobný vznik rezistencie voči liečivu, pretože sú geneticky stabilné a homogénne s nízkou mierou mutácií. Preto sa stali jedným z cieľov pre antiangiogénnu terapiu (Bhat *et al.*, 2008).

Taktiež bol popísaný antiangiogénny účinok prírodných BR a ich syntetických derivátov v ľudských endotelových bunkách z pupočnej cievy (HUVEC) a v ľudských kapilárnych endotelových bunkách (HMEC-1). Obidve sú prekursori novo vznikajúcich kapilár. V týchto bunkách bola po aplikácii mikromolárnej dávky pozorovaná inhibícia proliferácie, migrácie a adhézie. Konkrétne išlo o 24-epiBL, 28-homoCS (prírodné BR), BR4848 a cholestanón (syntetické deriváty BR). Táto práca dokazuje, že spomínané syntetické deriváty BR majú oveľa silnejší inhibičný účinok ako prírodné BR, konkrétne boli účinné v trikrát nižších koncentráciách. Schopnosť väzby BR k steroidným receptorom je však obmedzená a predpokladá sa, že ich antiangiogénny účinok je spojený s iným mechanizmom (Rárová *et al.*, 2012).

3.3.4 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov a ich derivátov

O vplyve BR a ich syntetických derivátov v ľudských bunkách je stále málo informácií. Testovaniu efektu prírodných BR na nádorové bunky predchádzalo viacero pozorovaní.

Bolo dokázané, že majú podobný efekt na delenie rastlinných buniek ako cytokiníny. BR aj cytokiníny indukujú *CycD3* génovú expresiu počas skorých fáz bunkového delenia v rastlinných kultúrach. To dokazuje, že BR predstavujú limitujúce faktory v zahájení bunkového cyklu (Hu *et al.*, 2000).

Bolo zistené, že deriváty fytohormónov cytokinínov, predovšetkým olomoucín, dokážu regulovať bunkový cyklus. Z veľkého počtu testovaných kináz boli výrazne inhibované len kinázy, ktoré sú spojené s bunkovým cyklom. Olomoucín má vplyv na cyklíny a cyklín-dependetné kinázy (CDK), ktorých regulácia je počas nádorového bujnenia abnormálna a taktiež spôsoboval blokáciu bunkového cyklu v G₁/S a G₂/M fáze. V konečnom dôsledku tak môže zmenou regulácie určitých kináz znižovať proliferáciu určitých nádorových línií buniek (Veselý *et al.*, 1994).

Podstatným krokom bolo testovanie aktivity 24-epiBL na myších hybridómoch. V tejto štúdii bolo zistené, že jeho aplikácia zvyšuje potenciál mitochondriálnej membrány

a množstvo buniek v G_0/G_1 fázi bunkového cyklu. Prítomnosť 24-epiBL naopak znižovala množstvo buniek v S-fázi bunkového cyklu a hladinu intracelulárnych protilátok (Franěk *et al.*, 2003).

Na základe týchto štúdií vznikla hypotéza, že BR by mohli mať inhibičný efekt na bunkový cyklus a proliferáciu nádorových buniek. Tá bola prvý krát potvrdená testovaním perspektívnych prírodných BR a ich syntetických derivátov v normálnych a nádorových bunkách. 24-epiBL a 28-homoCS vykazovali inhibičný efekt na rast a viabilitu nádorových buniek s rôznym histopatologickým pôvodom. Najvýraznejší inhibičný efekt bol pozorovaný v bunkách T-lymfoblastickej leukémie (CEM) a bunkách mnohopočetného myelómu (RPMI 8226). 28-homoCS bol najviac aktívny v CEM (IC_{50} $13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V rastlinných biotestoch sú najúčinnnejšie BR s laktónovým kruhom B, ale voči nádorovým bunkám vykazujú nulovú alebo zanedbateľnú cytotoxickú aktivitu. Žiadny z testovaných derivátov nevykazoval cytotoxickú aktivitu v bunkách chronickej myeloidnej leukémie (K-562), rakoviny kľčka maternice (HeLa), ľudského adenokarcinomu odvodeného od alveolárnych buniek typu II (A 549) a v bunkách osteosarkomu (HOS). V tejto štúdii bolo taktiež zistené, že BR neznižujú viabilitu normálnych ľudských fibroblastov (BJ) (Malíková *et al.*, 2008). V súčasnosti je známych len niekoľko prírodných zlúčenín, ktoré vykazujú antiproliferačnú aktivitu voči nádorovým bunkám bez vplyvu na rast normálnych buniek (Newman *et Cragg*, 2007).

3.3.5 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prsníka a prostaty

Na základe objavených antiproliferačných vlastností BR bol skúmaný efekt 24-epiBL a 28-homoCS v estrogén-senzitívnych bunkách rakoviny prsníka (MCF7), ktoré exprimujú obidva typy estrogénových receptorov ($ER-\alpha$ a $ER-\beta$) a v estrogén-nesenzitívnych bunkách (MDA-MB-468), pri ktorých je expresia $ER-\alpha$ epigeneticky umlčaná. Taktiež bolo skúmané ich pôsobenie v hormón-senzitívnych (LNCaP) a hormón-nesenzitívnych (DU-145) bunkách rakoviny prostaty. Liečba rakoviny prsníka a prostaty je komplikovaná. Bunky rakoviny prostaty dokážu prechádzať z hormón-senzitívnych na nesenzitívne formy. Vo väčšine klinických prípadov sa vyskytuje zmes týchto dvoch foriem (Gleave *et al.*, 1998). Apoptóza prebieha pomerne rýchlo v hormón-senzitívnych bunkách a rozvoj rakoviny prostaty je spôsobený proliferáciou hormón-nesenzitívnych buniek. Podobne je tomu aj u buniek rakoviny prsníka. Efektivita liečby spočíva v eliminácii obidvoch týchto foriem nádorových buniek (Weisburger, 1998).

3.3.5.1 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prsníka

Bolo zistené, že 24-epiBL a 28-homoCS spôsobujú apoptózu v oboch nádorových líniiach rakoviny prsníka, teda u MCF7 a MDA-MB-468. Ďalej sa zistilo, že estrogén-senzitívne bunky sú citlivejšie na ich pôsobenie a to pravdepodobne vďaka modulácii steroidných receptorov (Malíková *et al.*, 2008).

Nasledujúca štúdia sa venuje detailnejšej analýze mechanizmu pôsobenia BR v bunkách rakoviny prsníka. Pomocou prietokovej cytometrie bol sledovaný priebeh bunkového cyklu. Taktiež bola skúmaná zmena expresie proteínov spojených s apoptózou. V oboch nádorových líniiach bol zaznamenaný blok v G_0/G_1 fáze bunkového cyklu a zníženie počtu buniek v S fáze. V bunkách MDA-MB-468 došlo k zvýšeniu frakcií v sub G_1 , ktoré predstavujú apoptické telieska. Blokácia bunkového cyklu v G_0/G_1 fáze bola sprevádzaná zvýšenou expresiou cyklín-dependentného kinázového inhibítora (CDKI) p21^{Waf1/Cip1}. Taktiež bola zaznamenná znížená expresia CDK 2 a 4, a cyklínov D1 a E. CDKI p21^{Waf1/Cip1} inhibuje naviazaním na komplexy CDK/cyklín ich aktivitu, čo vedie k zníženiu hladiny fosforylovaného retinoblastomového proteínu (pRb) a teda aj k znemožneniu prechodu do S fáze bunkového cyklu. Zníženie hladiny pRb po aplikácii BR bolo zaznamenané v bunkách MCF7, bunky MDA-MB-468 naopak neexprimujú pRb (Steigerová *et al.*, 2010).

Dôležitým regulátorom bunkového cyklu je tumor supresorový proteín p53 (p53), ktorý je za fyziologických podmienok viazaný na prenášač „mouse double minute 2 homolog“ (MDM-2) a tým pádom je inaktívny. V prípade poškodenia bunky je MDM-2 fosforylovaný a p53 uvoľnený. Tým pádom je zvýšená jeho expresia, ktorá signalizuje poškodenie DNA a zastavuje bunkový cyklus v G_0/G_1 fáze alebo navodzuje apoptózu (Sherr *et Roberts*, 1995). Aplikáciou BR nebola pozorovaná výrazná zmena expresie p53 a MDM-2 (Steigerová *et al.*, 2010).

Celý proces apoptózy je taktiež regulovaný celou radou antiapoptických a proapoptických proteínov, ktoré zahŕňajú najmä proteíny z Bcl-2 rodiny. Pomer proapoptického Bax a antiapoptického Bcl-2 ovplyvňuje indukciu apoptózy vnútornou (mitochondriálnou) cestou. Apoptóza je aktivovaná prostredníctvom proapoptických proteínov, ktoré zvyšujú permeabilitu vonkajšej aj vnútornej mitochondriálnej membrány. Tým pádom dochádza k uvoľneniu cytochrómu c do cytoplazmy, kde sa naviaže na apoptický proteázomový aktivačný faktor-1 (Apaf-1), čím sa vytvorí apoptozóm. Ten aktivuje kaspázu-9 a následne je aktivovaná kaspáza-3 a 7, pričom postupne dochádza k deštrukcii cytoskeletu. Taktiež dochádza k aktivácii enzýmu poly(ADP-ribóza)

polymeráza (PARP), ktorý spôsobuje degradáciu DNA (Jin *et al.*, 2005). Zvýšená expresia Bcl-2 zapríčiňuje vznik rezistencie na chemoterapeutiká a radiačnú liečbu. Naopak znížená expresia Bcl-2 môže podporovať apoptózu stimulovanú chemoterapeutikami (Konopleva *et al.*, 2002). V bunkách MCF7 bola aplikáciou BR znížená expresia antiapoptických proteínov Bcl-2 a „B-cell lymphoma-extra large“ (Bcl-X_L), zatiaľ čo neboli pozorované výraznejšie zmeny v expresii proapoptického proteínu Bax. V bunkách MDA-MB-468 bola úroveň expresie Bcl-2 ovplyvnená málo a nedošlo ani k zmene expresie Bcl-X_L. Naopak bola pozorovaná zvýšená expresia proapoptického Bax. Po 24 h došlo na týchto bunkách k aktivácii kaspázy-3, ktorá je súčasťou apoptickej kaskády bunky (Steigerová *et al.*, 2010).

3.3.5.2 Antiproliferačná aktivita brassinosteroidov na bunky rakoviny prostaty

Steigerová *et al.* (2012) sa taktiež venovali objasneniu mechanizmu apoptózy spôsobenej 24-epiBL a 28-homoCS v bunkách rakoviny prostaty LNCaP a DU-145.

Androgénny receptor (AR) zohráva dôležitú úlohu v rozvoji rakoviny prostaty. Hormón-senzitívne bunky rakoviny prostaty (LNCaP) exprimujú androgénny receptor vo vysokej miere, v menšej miere ER- β a neexprimujú vôbec ER- α . Hormón-nesenzitívne bunky DU-145 neexprimujú AR ani ER- α , zatiaľ čo ER- β exprimujú vo vysokej miere (Kim *et al.*, 2002; Klocker *et al.*, 1994; Lau *et al.*, 2000). Modulácia expresie ER- α a ER- β je dôležitá v liečbe rakoviny prostaty. Bolo dokázané, že za proliferáciu buniek, zápal a rozvoj rakoviny prostaty zodpovedá stimulácia ER- α . Naopak stimulácia ER- β je spojená s antiproliferačným, protizápalovým a možným protirakovinovým účinkom. Toto zistenie vedie k vývoju nových liečiv, ktoré selektívne modulujú ER (Dutertre *et al.*, 2000). Do tejto skupiny liečiv patrí napríklad raloxifén, ktorý spôsobuje apoptózu v hormón-senzitívnych aj v hormón-nesenzitívnych bunkách rakoviny prostaty prostredníctvom antagonistického efektu na ER- α a stimulácie ER- β (Rossi *et al.*, 2011).

Aplikáciou BR neboli pozorované výraznejšie zmeny v expresii AR, ER- α a ER- β . Pomocou prietokovej cytometrie bol zaznamenaný v bunkách LNCaP blok bunkového cyklu v G₀/G₁ fáze s následnou tvorbou apoptických teliesok v subG₁ fáze. Tento blok je spôsobený zníženou expresiou cyklínov D₁ a E, CDK 4 a 6, ktorých aktivita bola v tomto prípade inhibovaná prostredníctvom CDKI p27^{Kip}. Taktiež bola zaznamenaná znížená hladina pRb. V DU-145 došlo k zníženiu expresie cyklínov A a B₁ a k zastaveniu bunkového cyklu v G₂/M. Ďalšie analýzy poukazujú na formovanie DNA rebríku v LNCaP a v menšej miere aj u DU-145 (Steigerová *et al.*, 2012). Formovanie DNA rebríka

je výsledkom štiepenia DNA na mnohopočetné fragmenty a je považované za biochemický marker apoptózy (Enari *et al.*, 1998)

28-homoCS a 24-epiBL regulujú priebeh apoptózy aj prostredníctvom regulácie expresie či aktivity antiapoptických a proapoptických proteínov. V obidvoch líniiach došlo k zníženiu antiapoptického Bcl-2 a v bunkách LNCaP aj proteínu Bcl-X_L. 28-homoCS zvýšil v LNCaP expresiu proapoptického Bax a taktiež kaspázy-3, 9 a PARP-1. Z toho vyplýva, že obidva testované BR môžu sprostredkovať apoptózu prostredníctvom regulácie proteínov Bcl-2 rodiny a kaspázy-3 v bunkách LNCaP (Steigerová *et al.*, 2012).

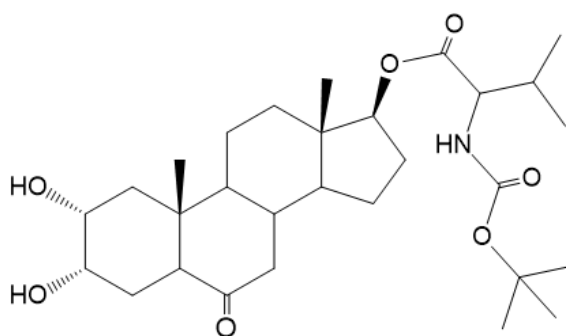
Bolo zistené, že prostatická žľaza vykazuje najvyššiu hladinu polyamínov (PA) v tele (Schipper *et al.*, 2003). Prírodné PA, putrescín, spermidín a spermín, hrajú dôležitú úlohu v bunkovom delení, regulácii bunkového cyklu a syntéze proteínov. Biologické správanie buniek rakoviny prostaty súvisí so zmenou hladiny PA a/alebo aktivitou ich metabolických enzýmov (Seiler *et al.*, 1996). Aktivita biosyntetického enzýmu, ornitín dekarboxylázy (ODC), je riadená pomocou antizýmového inhibítora (AZI) a ODC antizýmu (OAZ) (Su *et al.*, 2009). Katabolizmus PA je dvojstupňový proces, pričom v prvom stupni dochádza k acetylácii PA pomocou spermidín/spermín-N¹-acetyltransferázy (SSAT) a v druhom stupni sú acetylované PA oxidované prostredníctvom PA oxidázy (PAO). Spermín je oxidovaný priamo pomocou enzýmu spermín oxidázy (SMO). Výsledkom tohto procesu je zníženie intracelulárnych hladín PA spojené s tvorbou toxických vedľajších produktov ako je peroxid vodíka a aldehydy, ktoré spôsobujú apoptózu. Zvýšené hladiny PA sú charakteristické pre nádorové bunky a preto predstavujú jeden z terapeutických cieľov pre rôzne druhy rakoviny (Agostinelli *et al.*, 2004; Hector *et al.*, 2008).

Obakan *et al.* (2014) sa vo svojej práci zamerali na pôsobenie 24-epiBL na katabolizmus PA v bunkách rakoviny prostaty LNCaP a DU-145, a normálnych epiteliálnych bunkách prostaty (PNT1a). 24-epiBL spôsobil apoptózu v nádorových bunkách rakoviny prostaty bez efektu na normálne epiteliálne bunky prostaty. Po jeho aplikácii bolo pozorované výrazne zníženie hladiny ODC a tým pádom aj zníženie hladiny intracelulárnych PA v obidvoch líniiach. V bunkách LNCaP reguloval aktivitu enzýmov AZI a OAZ. Hladiny katabolických enzýmov, SSAT a PAO, boli zvýšené v obidvoch líniiach. Pomocou siRNA bola umlčaná aktivita SSAT a PAO a tým pádom nedošlo k akumulácii ROS a v dôsledku toho bola zvýšená viabilita buniek LNCaP po aplikácii 24-epiBL. To nasvedčuje tomu, že apoptóza buniek LNCaP by mohla byť spôsobená akumuláciou ROS. Táto hypotéza bola potvrdená pomocou špecifického inhibítora

enzýmov PAO a SMO, MDL-72527 (Seiler *et al.*, 2002). Po jeho aplikácii bola inhibovaná aktivita PAO a tým pádom taktiež nedošlo k apoptóze v bunkách LNCaP. Z toho vyplýva, že akumulácia ROS v dôsledku pôsobenia katabolických enzýmov po aplikácii 24-epiL by mohla spúšťať apoptózu v bunkách LNCaP (Agostinelli *et Seiler*, 2007; Obakan *et al.*, 2014).

3.3.6 Syntetický derivát BR4848

Na základe získaných poznatkov o vzťahu medzi optimálnou biologickou aktivitou a štruktúrou syntetických derivátov BR bola pripravená zlúčenina BR4848 (VIII). Tento derivát má na steroidnom skelete naviazanú zmes D,L-valínu na C-17 s *tert*-butoxykarbonylom (Boc) na aminoskupine. Taktiež obsahuje skupiny, ktoré korespondujú s vyššou inhibičnou aktivitou BR. Konkrétne sa jedná o vicinálne dioly na C-2, C-3 v konfigurácii α a šesťčlenný B kruh s oxo skupinou na C-6 (Obrázok 3).



VIII

Obrázok 3: Chemická štruktúra derivátu BR s Boc-D,L-valínom, BR4848 (2 α , 3 α -dihydroxy-6-oxo-5 α -androstan-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D,L-valín).

Tento derivát bol testovaný v nádorových bunkách s rôznym histopatologickým pôvodom, v bunkách HUVEC a ľudských fibroblastoch BJ. Najvyššia cytotoxická aktivita bola pozorovaná v bunkách HeLa (IC_{50} 3,3 \pm 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a v bunkách CEM (IC_{50} 4,3 \pm 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bez efektu na BJ (IC_{50} > 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Na základe týchto výsledkov sa Rárová *et al.* (2018) venovali detailnejšej štúdiu antiproliferačných vlastností derivátu BR4848 na molekulárnej a bunkovej úrovni. Bolo zistené, že apoptóza v HeLa bunkách je spôsobená znížením expície antiapoptického Bcl-2 a „myeloid leukemia cell 1“ (Mcl-1), aktiváciou kaspázy-3 a 7, a taktiež štiepením DNA enzýmom PARP-1. Znížením fosforylácie kináz spojených s proliferáciou a migráciou bunky dochádza k inhibícii ich aktivity a následnej apoptóze. Po aplikácii

BR4848 bola pozorovaná v HeLa bunkách znížená fosforylácia kináz. Konkrétne boli inhibované proteín kináza B (Akt, značovaná aj ako PKB), kináza regulovaná extracelulárnym signálom 1 a 2 (ERK), a fokálna adhezívna kináza (FAK). Taktiež bol zaznamenaný blok bunkového cyklu v nádorových a endotelových bunkách v G₂/M fáze spojený s inhibíciou tvorby tubúl a migrácie endotelových buniek.

Antiangiogénne účinky pravdepodobne zvyšujú antiproliferatívny účinok tohto derivátu. Po aplikácii BR4848 bola v bunkách HUVEC pozorovaná znížená fosforylácia kináz spojených s migráciou, adhéziou a proliferáciou buniek, konkrétne FAK, ERK 1,2, CDK5. BR4848 reguluje angiogénu aj prostredníctvom vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGF), ktorý sa viaže na receptor VEGFR2 a spúšťa signálnu dráhu. Antiangiogénna a antiproliferatívna aktivita BR4848 je regulovaná taktiež prostredníctvom interleukínu 6 (IL-6), ktorého produkcia bola po jeho aplikácii znížená. IL-6 stimuluje v organizme mitózu a migráciu endotelií.

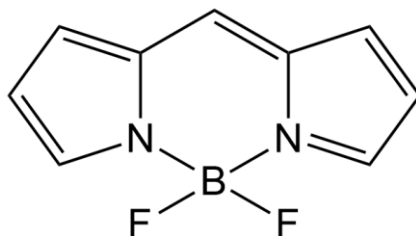
Pozorované biologické účinky nie sú sprostredkované prostredníctvom väzby na steroidné receptory aj keď sú tieto rastlinné hormóny štruktúrou podobné živočíšnym hormónom. Po aplikácii BR4848 nebola pozorovaná zmena subcelulárnej lokalizácie steroidných receptorov ani ich celkovej celulárnej hladiny (Rárová *et al.*, 2018).

3.4 Fluorescenčná mikroskopia

Fluorescenčná mikroskopia sa v priebehu niekoľkých desaťročí stala dôležitým nástrojom pre vizualizáciu, lokalizáciu, vysvetlenie funkcií či pozorovanie dynamiky iónov a biomolekúl v bunkách (Weijer, 2003). K vizualizácii pomocou fluorescenčnej mikroskopie sa používajú rôzne fluorescenčné farbivá (fluorofory), ktoré sa viažu na predmet záujmu. Vznikajú tak komplexy, ktoré po osvetlení svetlom konkrétnej vlnovej dĺžky (excitácii) vyžarujú (emitujú) žiarenie s vyššou vlnovou dĺžkou. Najpoužívanejšie fluorofory sú kumarín, fluoresceín, BODIPY, rodamín a cyaníny. Stále sa pracuje na vývoji nových fluoroforov, aby boli eliminované ich negatívne vlastnosti (Valeur *et Berberan-Santos*, 2011).

Treibs a Kreuzer popísali štruktúru fluoroforu 4,4-difluoro-4-bora-3 α ,4 α -diazas-indacenu (F-BODIPY) v roku 1968 (Obrázok 4) (Treibs *et Kreuzer*, 1968). Toto fluorescenčné farbivo sa drží v pozornosti vďaka jeho optimálnym fyzikálnym a fotochemickým vlastnostiam, medzi ktoré patria vysoký molárny absorpčný koeficient, úzky absorpčný a emisný pík, vysoký kvantový výťažok fluorescencie a relatívna nezávislosť k polarite rozpúšťadla či hodnote pH roztoku. Jedná sa o neutrálne farbivo,

ktoré voľne prechádza cez plazmatickú membránu, ale vďaka jeho hydrofóbnym vlastnostiam sa môže akumulovať v jednotlivých organelách. Jeho ďalšou nevýhodou je malý Stokesov posun, kvôli ktorému je ťažké odlišiť emitované svetlo od excitačného (Johnson *et al.*, 1991; Karolin *et al.*, 1994)



IX

Obrázok 4: Chemická štruktúra BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3 α ,4 α -diazas-indacen).

Vďaka jeho spomínaným výhodám bolo pripravené veľké množstvo fluorescenčných farbív na báze BODIPY s absorpčnou a emisnou vlnovou dĺžkou v rozmedzí 510–675 nm. Farbivá s týmto emisným spektrom majú veľa výhod, medzi ktoré patrí minimálna foto-toxicita k biologickým komponentom, minimálne pozadie autofluorescencie prítomných biomolekúl a penetrácia do veľkých hĺbok (Ni *et Wu*, 2014). Rôznymi zmenami v štruktúre BODIPY boli pripravené tzv. photoswitches, ktoré sú schopné reverzibilne prepínať fluorescenciu viac krát za sebou bez výraznej straty jej intenzity (Golovkova *et al.*, 2005).

4 Materiál a metódy

4.1 Chemická časť

4.1.1 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie:

- 17 β -Hydroxy-5 α -androst-2-én-6-ón (získané z chemickej knižnice RNDr. Miroslava Kvasnici, Ph.D.)
- 1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid (EDC) (ThermoFisher Scientific, kat. č. 22980)
- 4-(dimetylamino)pyridín (DMAP) (Sigma-Aldrich, kat.č. 39405)
- Acetón (PENTA, kat. č. 10050-20005)
- Benzén (Sigma-Aldrich, kat. č. 319953)
- Boc-D-alanín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15048)
- Boc-D-fenylalanín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15484)
- Boc-D-leucín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15129)
- Boc-D-metionín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15132)
- Boc-D-valín (BDL, kat. č. B2991)
- Boc-L-alanín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15380)
- Boc-L-fenylalanín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15480)
- Boc-L-leucín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15450)
- Boc-L-metionín (Sigma-Aldrich, kat. č. 408425)
- Boc-L-valín (Sigma-Aldrich, kat. č. 15528)
- BODIPY™ TR (ThermoFisher Scientific, kat. č. D6251)
- Cyklohexán (PENTA, kat. č. 11560-11000)
- Deuterovaný chloroform (CDCl₃) s 0,1 % tetrametylsilanom (TMS) (Sigma-Aldrich, kat. č. 434876)
- Dietyléter (PENTA, kat. č. 12180-11000)
- Dichlórmétán (PENTA, kat. č. 12360-11000)
- Etanol 96 % (PENTA, kat. č. 70390-11000)
- Etyléster kyseliny octovej (EtOAc) (Sigma-Aldrich, kat. č. 270989)
- Hydroxybenzotriazol (HOBt) (Sigma-Aldrich, kat. č. 54802)
- Chloroform (PENTA, kat. č. 17110-11000)
- Isopropranol (PENTA, kat. č. 17500-11000)
- Karboxymethylhydroxylamín hemihydrochlorid (CMO) (Sigma-Aldrich, kat.

č. C13408)

- Kyselina sírová 96 % (PENTA, kat. č. 20370-11000)
- *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (Sigma-Aldrich, kat. č. D80002)
- *N,N*-diisopropyletylénamín (DIPEA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 387649)
- *N,N*-dimetylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, kat. č. 227056)
- *N*-metylmorfolin-*N*-oxid (NMO) (Sigma-Aldrich, kat. č. 224286)
- Oxid osmičelý v *tert*-butanole (Sigma-Aldrich, kat. č. 208868)
- Pyridín (Sigma-Aldrich, kat. č. 270970)
- Síran horečnatý, bezvodý (PENTA, kat.č. 43180-31000)
- Siročitan sodný, bezvodý (PENTA, kat. č. 26030-31000)
- *Tert*-butanol (PENTA, kat. č. 26820-11000)
- Tetrahydrofurán (THF) (PENTA, kat. č. 27030-11000)

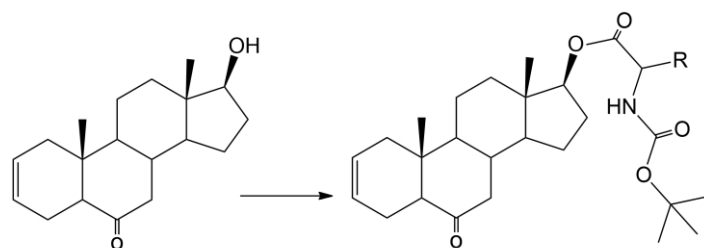
4.1.2 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Analytické váhy CPA225D (Sartorius)
- Hliníkové TLC doštičky potiahnuté silikagélom 60 W F₂₅₄ (Merck)
- Hmotnostný spektrometer Synapt G2-Si (Waters)
- Magnetická miešačka s ohrevom RCT Basic IKAMAG (IKA)
- NMR spektrometer JNM-ECA 500 (JEOL)
- Rotačná vákuová odparka (RVO) Hei-VAP Value (Heidolph)
- Silikagél Kieselgel 60 (Merck)
- Teplovzdušná pištoľ HL 1626S (Steinel)
- UV lampa (Spectroline® E-Series)
- Vysokoučinný kvapalinový chromatograf (HPLC) s ELSD detektorom (Waters)

4.1.3 Použitie experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.1.3.1 Všeobecný postup prípravy esteru

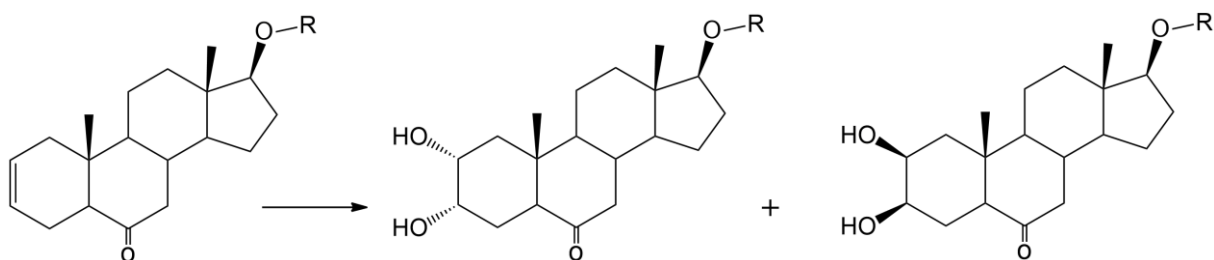
K východnému ketónu (17 β -Hydroxy-5 α -androst-2-én-6-ón) (150 mg; 0,52 mmol) bola pridaná aminokyselina (AK) s Boc skupinou (1,1 ekvivalentov) a DMAP (0,1 ekvivalentov). Táto zmes bola spoločne rozpustená v benzéne (10 ml) a za stáleho miešania bol k roztoku pridaný DCC (1,3 ekvivalentov). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 48 hodín (Obrázok 5).



Obrázok 5: Všeobecná schéma prípravy esteru s Boc-AK z východzieho ketónu. (R) naviazaná L alebo D-AK

4.1.3.2 Všeobecný postup prípravy zmesi izomérov 2 α ,3 α - a 2 β ,3 β -diolového esteru

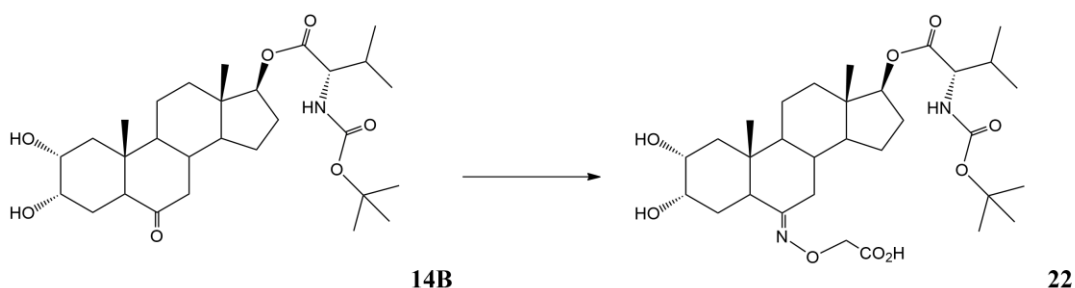
Ester (150 mg), ktorý bol pripravený podľa všeobecného postupu prípravy esteru, bol rozpustený v THF (6 ml), acetóne (9 ml) a destilovanej vode (1 ml). Následne bol k reakčnej zmesi za stáleho miešania pridaný NMO (5 ekvivalentov) a roztok oxidu osmičelého v *tert*-butanole (0,15 ml; 7,5 mmol). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 24 hodín (Obrázok 6).



Obrázok 6: Všeobecná schéma prípravy zmesi izomérov 2 α ,3 α - a 2 β ,3 β -diolového esteru z predchádzajúcej syntézy.

4.1.3.3 Postup prípravy karboxymetyloxímu

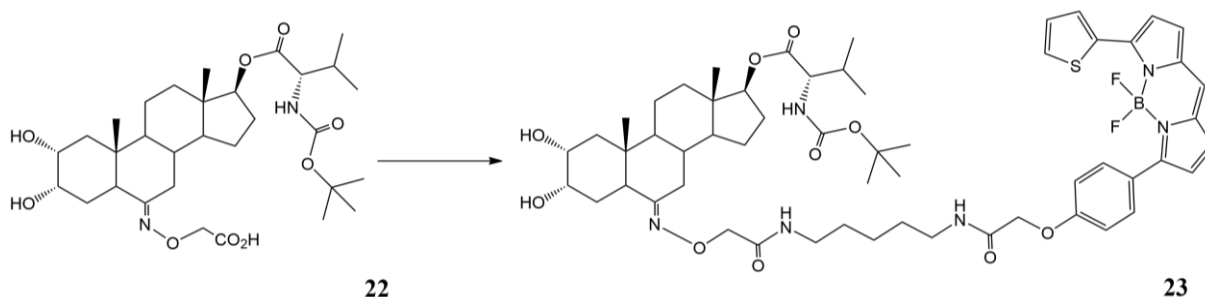
Derivát **14B** (10 mg; 19,2 μ mol) bol rozpustený v pyridíne (1 ml). K roztoku bol následne pridaný CMO (10 mg) a dve kvapky destilovanej vody. Reakčná zmes bola miešaná 24 hodín pri 60 °C (Obrázok 7).



Obrázok 7: Schéma prípravy karboxymetyloxímu **22** z východzieho derivátu **14B**.

4.1.3.4 Príprava derivátu 23

Karboxymetyloxím **22** (11 mg; 18,5 μ mol) bol rozpustený v DMF (0,5 ml). K roztoku bol pridaný HOBt (2 mg), EDC (2,5 mg), BODIPY TR (5 mg) a DIPEA (5 μ l). Reakcia bola miešaná cez noc (približne 16 hodín) pri izbovej teplote (Obrázok 8).



Obrázok 8: Schéma naviazania fluorescenčnej značky na karboxymetyloxím **22** z predchádzajúcej syntézy.

4.1.3.5 Všeobecný postup spracovania príslušných chemických reakcií

Pomocou chromatografie na tenkej vrstve (TLC) bol monitorovaný priebeh chemických reakcií a čistota produktov. Pomocou TLC boli taktiež zistené mobilné fázy pre stĺpcovú chromatografiu a HPLC, ktoré sú vždy uvedené vo výsledkoch. TLC doštičky boli analyzované pomocou 10 % roztoku kyseliny sírovej v etanole a zahrievaním na 400 $^{\circ}$ C.

Postup A: spracovanie chemickej reakcie prípravy esterov

Po ukončení chemickej reakcie bola reakčná zmes extrahovaná medzi dietyléter a vodu. Spojená organická fáza bola premytá vodou a následne vysušená $MgSO_4$. Rozpúšťadlá boli odparené na RVO. Produkt chemickej reakcie bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle a použitý do ďalšej reakcie.

Postup B: spracovanie chemickej reakcie prípravy diolov

Reakčná zmes bola zastavená pridaním nasýteného vodného roztoku siričitanu sodného (2 ml). Následne bola extrahovaná medzi EtOAc a vodu. Spojená organická fáza bola premytá vodou a následne vysušená $MgSO_4$. Rozpúšťadlá boli odparené na RVO. Produkt chemickej reakcie bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle a izoméne dioly (50 mg) rozdelené pomocou HPLC. V prípade, že po rozdelení nemala látka kryštalickú podobu, tak bola lyofilizovaná z *tert*-butanolu.

4.1.3.6 Identifikácia látok

Pripravené látky boli identifikované pomocou hmotnostného spektrometra Synapt G2-Si. Ionizácia bola uskutočnená v pozitívnom móde (ASAP+) a detekcia vo full scan móde v rozmedzí m/z 50–1000 Da. Prúd na kapiláre bol nastavený na 5 μA a energia kolízie na hodnote 4. Teplota iónového zdroja bola 120 °C. Látky, určené na identifikáciu, boli rozpustené v chloroforme na výslednú koncentráciu 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. NMR spektrá boli zmerané pomocou NMR spektrometra JNM-ECA 500, JEOL, v roztoku CDCl_3 s 0,1 % TMS. Kalibrácia chemických posunov ^1H NMR a ^{13}C NMR spektier bola uskutočnená pomocou CDCl_3 alebo TMS. Hodnoty chemických posunov (δ) boli zaokrúhlené na dve desatinné miesta (uvedené v ppm jednotkách) a hodnoty interakčných konštánt (J) na jedno desatinné miesto (uvedené v Hz).

4.2 Biologická časť

4.2.1 Biologický materiál

- Bunkové línie pochádzajúce zo zdroja The European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC (Veľká Británia) – zátvorke je uvedené katalógové číslo ECACC
 - HeLa – bunky rakoviny krčka maternice (93021013)
 - K-562 – bunky chronickej myeloidnej leukémie (89121407)
- Ľudské fibroblasty BJ pochádzajú zo zdroja The American Type Culture Collection – ATCC (USA) – katalógové číslo CRL-2522

Všetky bunkové línie boli kultivované na sterilných plastových Petriho miskách v kultivačnom Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) s prídavkom 10% fetálneho teľacieho séra, L-glutamínu (2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1% zmesi antibiotík penicilín-streptomycín. Bunky boli kultivované v inkubátore pri teplote 37 °C v atmosfére 5 % CO_2 .

4.2.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Dihydrogénfosforečnan draselný, bezvodý (Lach-Ner, kat. č. 30016-CP0)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) vhodný pre bunkové kultúry (PanReac AppliChem, kat. č. 131954)
- DMEM s nízkym obsahom glukózy (Sigma-Aldrich, kat. č. D5546)

- Etanol 96 % (Penta, kat. č. 70390-11000)
- Fetálne teľacie sérum (FS), tepelne inaktivované (Biowest, kat. č. S1810)
- Hydrogénfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, kat. č. 12340-31000)
- Hydroxid sodný (PENTA, kat. č. 15610-11000)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, kat. č. 30076-AP0)
- Chlorid sodný (PENTA, kat.č. 16610-31000)
- Kyselina etylénglykol-bis(2-aminoetyléter)-*N,N,N',N'*-tetraoctová (EGTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E3889)
- Kyselina chlór vodíková 35 % (Lach-Ner, kat. č. 10033-A25)
- L-glutamín, pre bunkové kultúry (Sigma-Aldrich, kat. č. 59202C)
- MK-432 (získané z chemickej knižnice RNDr. Miroslava Kvasnici, Ph.D.)
- MK-435 (získané z chemickej knižnice RNDr. Miroslava Kvasnici, Ph.D.)
- Penicilín-streptomycín v 0,9 % NaCl, vhodný pre bunkové kultúry – 10 000 U·ml⁻¹ penicilínu a 10 mg·ml⁻¹ streptomycínu (Sigma-Aldrich, kat. č. P4333)
- Sodná soľ resazurínu (Sigma-Aldrich, kat. č. R7017)
- Trypsín, 25 g·l⁻¹ v 0,9% roztoku, vhodný pre bunkové kultúry (Sigma-Aldrich, kat. č. T2600000)

Použité roztoky a ich príprava

- Príprava 10% FS DMEM: 10g práškoveho média v 1 l sterilnej dH₂O (DMEM s nízkym obsahom glukózy – glukóza 1 000 mg·l⁻¹, glutamín 1 000 mg·l⁻¹ a fenolová červená); doplnené 10 % (v/v) FS; NaHCO₃ 3,7 g·l⁻¹; penicilín 100 U·ml⁻¹; streptomycín 100 µg·ml⁻¹; 2 mmol·l⁻¹ L-glutamín
- Roztok 0,1% trypsínu: 0,1% (w/v) trypsín; 74,6 mmol·l⁻¹ NaCl; 1,35 mmol·l⁻¹ KCl; 0,75 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 3,2 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄; 6,6 mmol·l⁻¹ EGTA ve sterilnej dH₂O
- Roztok EGTA v PBS: 13 mmol·l⁻¹ EGTA; 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,7 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 6,4 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄ v sterilnej dH₂O; pH upravené pomocou 0,1 mol·l⁻¹ NaOH na výslednú hodnotu 7,2
- Zásobný roztok sodnej soli resazurínu v PBS: 0,25 mmol·l⁻¹ sodná soľ resazurínu; 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,7 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 6,4 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄; v sterilnej dH₂O

4.2.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Analytické váhy KERN ABT 120-5DM (KERN)
- Autokláv MLS-3781L (Sanyo)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo)
- Hlbokomraziaci box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific)
- Chladnička Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr)
- Inverzný fluorescenčný mikroskop IX-51 (Olympus)
- Inverzný mikroskop Olympus CK2 (Olympus)
- Laboratórne váhy KERN PCB 200-2 (KERN)
- Laminárny box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril)
- Magnetické miešadlo s ohrevom AREX CerA1Top (VELP Scientifica)
- Minicentrifúga MyFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Mraziak Innova (Fagor)
- Multikanálová pipeta (Brand)
- Odsávačka VACUSAFE (INTEGRA Biosciences)
- pH meter pH 50 (XS Instruments) a sklenená pH elektróda (Sentek)
- Pipetovací nástavec accu-jet-pro (BrandTech Scientific)
- Reader mikrotitračných doštičiek Fluoroskan Ascent (Labsystems)
- Stolná centrifúga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher Scientific)
- Ultrazvuková vaňa VWR Ultrasonic Cleaner (VWR)
- Vodná kúpeľ GFL 1032 (GFL Gesellschaft für Labortechnik)

4.2.4 Použitie experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.2.4.1 Pasážovanie a vysievanie bunkových línii

Adherentné bunkové línie

Kultivačná nádoba s bunkami HeLa (alebo BJ) bola najskôr skontrolovaná pod mikroskopom kvôli prípadným kontamináciám. Následne bola prenesená do laminárneho boxu. Za sterilných podmienok bolo pomocou odsávačky odstránené staré kultivačné médium. Vrstva buniek bola opatrne premytá sterilným roztokom EGTA (3 ml), ktorý bol následne odsatý. Do kultivačnej nádoby bol napipetovaný roztok trypsín-EGTA (1 ml) a uzatvorená kultivačná nádoba s bunkami bola prenesená do inkubátora. EGTA zohráva úlohu chelatačného činidla a viaže vápenaté ióny, ktoré by inhibovali pôsobenie trypsínu. Po uplynutí 3–4 minút došlo k uvoľneniu buniek z povrchu kultivačnej nádoby

(v prípade BJ bola doba kultivácie 5–6 minút). Kultivačná nádoba s bunkami bola prenesená naspäť do laminárneho boxu. Pôsobenie trypsínu bolo zastavené pridaním 10 % DMEM (6 ml) prostredníctvom vápenatých iónov, ktoré boli uvoľnené z väzby s EGTA. Pomocou pipetovacieho nástavca boli bunky rozsuspendované a prenesené do centrifugačnej skúmavky, ktorá bola prenesená do centrifúgy a centrifugovaná pri 1000 rpm po dobu 5 minút. Po centrifugácii bola prenesená do laminárneho boxu, supernatant bol odsatý a pelet na dne skúmavky pomocou pipetovacieho nástavca rozsuspendovaný 10 % DMEM. Suspenzia buniek bola rozdelená do kultivačných nádob a doplnená 10 % DMEM na objem 10 ml, tak aby celkový pomer buniek k médiu v nádobe bol 1 : 3. Kultivačná nádoba bola prenesená do inkubátora. Pasážovanie buniek bolo opakované každé 3 dni.

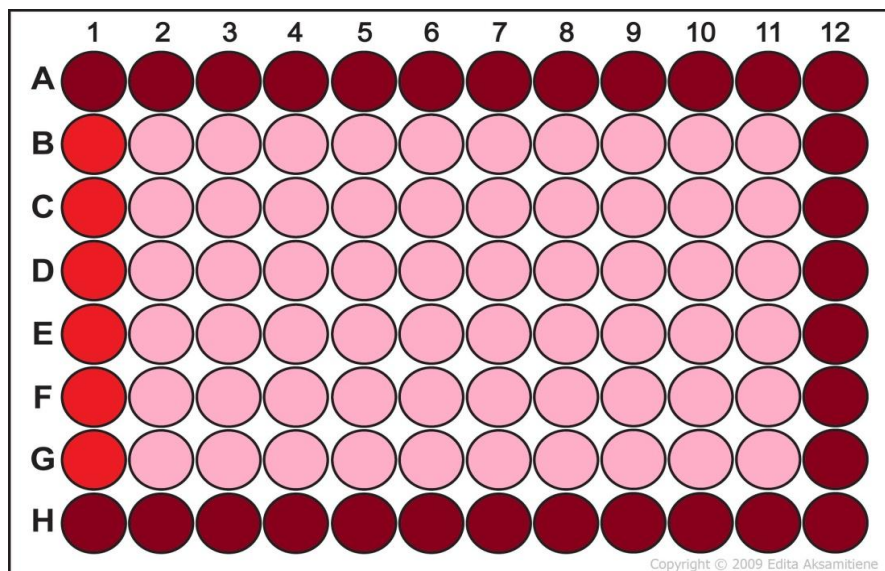
Suspenzné bunkové línie

Pasážovanie buniek K-562 bolo vykonané podľa rovnakého postupu, ale trypsinizácia bola v tomto prípade vynechaná kvôli tomu, že bunky neadherujú na povrch kultivačnej nádoby. Suspenzia buniek bola v sterilnom laminárnom boxe prenesená z kultivačnej nádoby do centrifugačnej skúmavky. Tieto bunky majú tendenciu sa prichytiť na dno kultivačnej nádoby a preto je potrebné opätovným nasávaním a spätným vypúšťaním pipety poriadne opláchnuť dno kultivačnej nádoby tak, aby do centrifugačnej skúmavky bol prenesený celý objem buniek. Pasážovanie buniek bolo taktiež opakované každé 3 dni.

4.2.4.2 Príprava experimentu

Začiatkový postup pri príprave experimentu sa skladal z rovnakých krokov ako pri pasážovaní buniek. Po centrifugácii bola centrifugačná skúmavka premiestnená do sterilného laminárneho boxu, supernatant bol odsatý a pelet na dne skúmavky pomocou pipetovacieho nástavca rozsuspendovaný 10% DMEM (5 ml). Z dobre premiešanej suspenzie buniek bolo pomocou automatickej pipety prenesených 20 µl na Bürkerovu komôrku. Následne bolo pod svetelným mikroskopom spočítané množstvo buniek v 4×4 malých štvorcových poliach na komôrke. Počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie bol získaný po vynásobení 10000. Celkový počet buniek v centrifugačnej skúmavke bol získaný po vynásobení 5. Potom boli bunky nariadené pomocou 10% DMEM pre 96-jamkovú doštičku tak, aby v jednej jamke bolo 5000 buniek v 80 µl média. Nariadená bunková suspenzia v Petriho miske bola pomocou multikanálovej pipety prenesená

na 96-jamkovú doštičku (Obrázok 9). Pod mikroskopom bola skontrolovaná koncentrácia a rozmiestnenie buniek v jamkách. Takto pripravená doštička bola prenesená do inkubátoru, v ktorom bunky cez noc adherovali na jej dno.



Obrázok 9: Schéma pipetovania buniek na 96-jamkovú doštičku pre stanovenie cytotoxickej aktivity testovaných látok. Do riadku A a H, a stĺpca 12 bolo pomocou multikanálovej pipety prenesených 130 μl 10% DMEM bez buniek, aby bolo zabránené prípadnému vysychaniu jamiek s bunkami (bordová farba). Do riadkov B–G v rámci stĺpca 1 bolo prenesených 100 μl 10% DMEM bez buniek, ktoré slúžili ako slepá vzorka (červená farba). Do riadkov B–G v rámci stĺpcov 2–11 bolo prenesených 80 μl 10% DMEM s bunkami, ktoré boli nariedené tak, aby jedna jamka obsahovala 5000 buniek (ružová farba).

4.2.4.3 Príprava a aplikácia látok na testovanie

Látky, ktoré boli pripravené v rámci bakalárskej práce, boli rozpustené v DMSO tak, aby výsledná koncentrácia v 1,5ml mikroskúmavke bola $7,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobné roztoky boli uchovávané v mraziacom boxe pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Zo zásobných roztokov látok bola v sterilnom laminárnom boxe pripravená koncentračná rada (Obrázok 10). Následne bola 96-jamková doštička s pripravenými bunkami z predchádzajúceho dňa premiestená do laminárneho boxu. Do stĺpca 2 bolo pridaných pomocou multikanálovej pipety 20 μl destilovanej vody. Do stĺpcov 3 až 11 bolo v triplikátoch multikanálovou pipetou prenesených po 20 μl jednotlivých látok z vopred pripravenej koncentračnej rady. Konečná koncentrácia DMSO v jednotlivých jamkách bola 0,5 %. Pripravené deriváty boli testované v triplikáte, v šiestich koncentráciách, ktoré boli trikrát riedené, pričom najvyššia testovaná koncentrácia bola $50 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto pripravené doštičky boli prenesené do inkubátoru a kultivované 72 hodín (Obrázok 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			8 µl testovanej látky + 232 µl sterilnej dH ₂ O									
C			80 µl z predchádzajúceho riadku + 160 µl sterilnej dH ₂ O									
D			80 µl z predchádzajúceho riadku + 160 µl sterilnej dH ₂ O									
E			80 µl z predchádzajúceho riadku + 160 µl sterilnej dH ₂ O									
F			80 µl z predchádzajúceho riadku + 160 µl sterilnej dH ₂ O									
G			80 µl z predchádzajúceho riadku + 160 µl sterilnej dH ₂ O									
H												

Obrázok 10: Schéma 96-jamkovej doštičky s pripravenou koncentračnou radou pre testovanie. V riadku B bolo do každej jamky prenesených pomocou automatickej pipety 8 µl testovaných látok. Tie boli následne rozpustené v 232 µl sterilnej vody. Do riadkov C–G bolo pomocou multikanálovej pipety prenesených 160 µl sterilnej vody. Po dôkladnom premiešaní bolo prenesených 80 µl testovaných látok z riadku B do riadku C. Testované látky boli riedené rovnakým spôsobom až po riadok G.

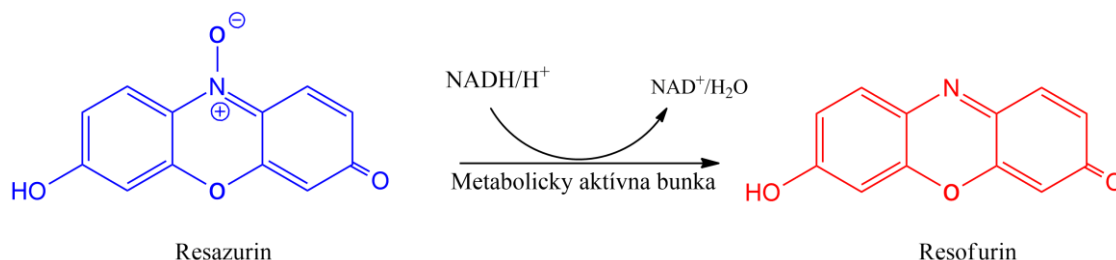
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 % DMEM bez buniek											10% DMEM bez buniek
B	Slepá vzorka	Kontrola	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
C			16	16	16	16	16	16	16	16	16	
D			5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	
E			1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	
F			0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	
G			0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
H			10 % DMEM bez buniek									
	Látka 1			Látka 2			Látka 3					

Obrázok 11: Schéma 96-jamkovej doštičky s bunkami pripravená na testovanie cytotoxicity pomocou resazurínu. Koncentrácia testovaných látok v jednotlivých jamkách je uvedená v µmol·l⁻¹. Prvý stĺpec, ktorý obsahuje 100 µl 10% DMEM bez buniek, slúži ako slepá vzorka. Druhý stĺpec obsahuje 80 µl 10% DMEM s bunkami, ktoré sú kultivované s 20 µl sterilnej vody. Tento stĺpec slúži ako kontrola. V stĺpcoch 3–11 sa nachádza 80 µl 10% DMEM s bunkami. Do týchto stĺpcov bolo pomocou multikanálovej pipety prenesených 20 µl testovaných látok v triplikátoch. Koncentrácia testovaných látok klesala v doštičke v jednotlivých stĺpcoch smerom nadol.

4.2.4.4 Stanovenie viability buniek pomocou resazurinu

Po 72 hodinovej kultivácii buniek s testovanými látkami bola pod mikroskopom skontrolovaná koncentrácia buniek v jednotlivých jamkách v 96-jamkovej doštičke. Následne bola premiestnená do sterilného laminárneho boxu a multikanálovou pipetou bolo pridaných 10 μl resazurinu do jamiek ($125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Doštička bola premiestnená do inkubátora. Po 3 hodinovej inkubácii bola zmeraná na fluorescenčnom readeri mikrotitračných doštičiek pri hodnotách excitácie/emisie 544/590 nm. Z nameraných hodnôt bola stanovená hodnota inhibičnej aktivity IC_{50} jednotlivých látok v programe Origin. Smerodajná odchýlka (SD) bol vypočítaná z hodnôt IC_{50} z troch nezávislých opakovaní pomocou MS Excel 2007.

Resazurin je redoxné farbivo, ktoré sa používa za účelom stanovenia životaschopnosti buniek. Toto farbivo prechádza cez membránu do cytosolu bunky a metabolicky aktívna bunka je schopná ho premeniť na resofurin a dihydroresofurin. Farbivo je premenené z oxidovanej modrej formy na redukovanú červenú formu, ktorá je fluorescentná (Obrázok 12). Mieru jej absorbancie je možno zmerať v rozmedzí 540–630 nm (Vega-Avila *et Pugsley*, 2011).

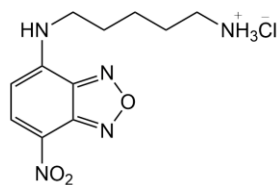


Obrázok 12: Premena redoxnej (modrej) formy farbiva resazurinu metabolicky aktívnou bunkou na jeho oxidačnú (červenú) formu resofurin.

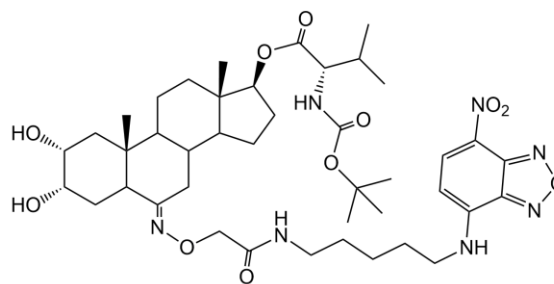
4.2.4.5 Mikroskopovanie

96-jamkové doštičky s bunkami HeLa a BJ určené na mikroskopovanie boli pripravené podľa postupu uvedenom v 4.2.4.2. Príprava experimentu. Podľa postupu uvedenom v 4.2.4.3. Príprava a aplikácia látok na testovanie boli látky **MK-432**, **MK-435**, **22**, **23** a BODIPY TR aplikované na bunky HeLa a BJ. Chemická štruktúra látok **MK432**, **MK-435** a BODIPY TR je uvedená na Obrázku 13. Biologická aktivita látok bola po ich aplikácii sledovaná pomocou inverzného fluorescenčného mikroskopu v bunkách HeLa a BJ pri zväčšení $400\times$ v časových bodoch: hneď po pridaní, 30 minútach, 1 hodine, 3 hodinách, 24 hodinách, 48 hodinách a 72 hodinách. V prípade pozmenenej aktivity boli vyhotovené fotografie. Látky **23** a BODIPY TR boli pozorované pri hodnotách

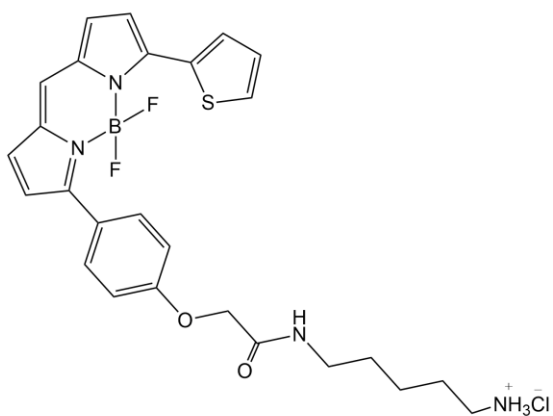
excitácie/emisie 580/610 nm a látky **MK-432** a **MK-435** pri hodnotách excitácie/emisie 465/535 nm.



MK-432



MK-435



BODIPY TR kadaverín

Obrázok 13: Chemická štruktúra látok **MK-432**, **MK-435** a BODIPY TR kadaverínu.

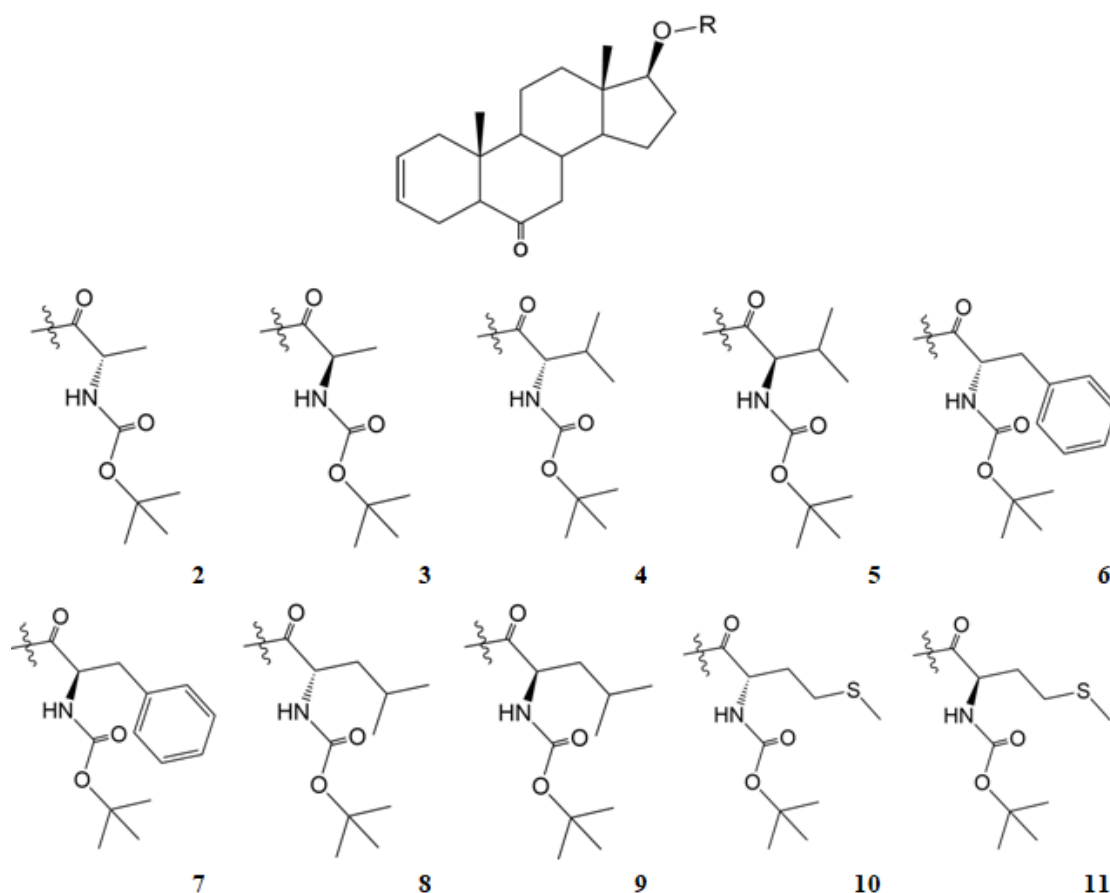
5 Výsledky

5.1 Chemická časť

V chemickej časti v rámci tejto bakalárskej práce bolo dvojstupňovou syntézou úspešne pripravených a identifikovaných 20 látok. Tieto látky boli v biologickej časti testované na ich cytotoxickú aktivitu. Výsledky testovania boli analyzované a následne bol vybraný najaktívnejší derivát, ktorý bol modifikovaný pre detailnejšie štúdium biologickej aktivity BR v nádorových bunkách. Pripravené deriváty obsahovali na steroidnom skelete hydroxylové skupiny na C-2, C-3 v konfigurácii α alebo β , a šesťčlenný B kruh s oxo skupinou na C-6. Medzi sebou sa líšili v druhu naviazanej aminokyseliny na C-17.

5.1.1 Príprava esterov

Podľa všeobecného postupu prípravy esteru bolo nasyntetizovaných 10 látok (Obrázok 14). Jedná sa o estery aminokyselín s východzím ketónom. Amino skupina aminokyselín je chránená Boc skupinou. Do reakcie boli použité alanín, valín, fenylalanín, leucín a metionín v konfigurácii L a D. Pripravené estery boli použité do ďalšej reakcie.



Obrázok 14: Stručný prehľad látok pripravených pomocou všeobecného postupu prípravy esterov. (R)-AK, (2) L-alanín, (3) D-alanín, (4) L-valín, (5) D-valín, (6) L-fenylalanín, (7) D-fenylalanín, (8) L-leucín, (9) D-leucín, (10) L-metionín, (11) D-metionín.

Ester s Boc-L-alanínom (2) a Boc-D-alanínom (3)

Podľa všeobecného postupu prípravy esteru boli pripravené látky **2** a **3** vo forme bielej voskovitej pevnej látky. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu A. Mobilná fáza: roztok cyklohexánu a dietyléru v pomere 3 : 2. Výsledkom bolo 310 mg (98 %) esteru **2** a 226 mg (95 %) esteru **3**.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-alaninát (**2**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,81 (s, 3H, 19-H); 1,4 (d, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH₃); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,97–2,05 (m, 4H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,31 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,72 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 5,05 (bd, 1H, $J = 7,9$ Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2), 5,69 (m, 1H, H-3). ¹³C-NMR δ 11,98; 13,50; 18,98; 20,57; 21,67; 23,21; 27,13; 28,31 (3 \times C); 36,44; 37,35; 39,28; 39,95; 43,11; 46,37; 49,30; 51,04; 53,22; 53,80; 79,77; 82,99; 124,37; 124,88; 155,04; 173,36; 211,35. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₇H₄₂NO₅ ([M+H]⁺): 460,3063; nájdené: 460,3065.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-alaninát (**3**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,73 (s, 3H, 18-H); 0,82 (s, 3H, 19-H), 1,38 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH₃); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,98–2,06 (m, 4H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,31 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,67 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, $J' = 7,8$ Hz, H-17 α); 5,04 (bd, 1H, $J = 6,7$ Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). ¹³C-NMR δ 11,95; 13,51; 18,74; 20,58; 21,68; 23,25; 27,28; 28,31 (3 \times C); 36,38; 37,36; 39,29; 39,98; 42,99; 46,41; 49,21; 51,05; 53,25; 53,82; 79,74; 83,16; 124,42; 124,88; 155,09; 173,34; 211,41. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₇H₄₂NO₅ ([M+H]⁺): 460,3063; nájdené: 460,3065.

Ester s Boc-L-valínom (4) a Boc-D-valínom (5)

Látky **4** a **5** boli pripravené podľa všeobecného postupu prípravy esteru. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu A. Mobilná fáza: roztok dietyléru a cyklohexánu v pomere 9 : 1. Estery **4** (175 mg, 69 %) a **5** (195 mg, 77 %) boli získané vo forme bielej pevnej látky.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**4**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,82 (s, 3H, 19-H); 0,9 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH₃); 0,98 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH₃); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,97–2,05 (m, 4H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,23 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,71 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 5,03 (bd, 1H, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). ¹³C-NMR δ 12,13; 13,51; 17,50; 19,02; 20,59; 21,68; 23,26; 27,24; 28,31(3 \times C); 31,38; 36,47; 37,34; 39,28; 39,96; 42,98; 46,37; 51,01; 53,24; 53,80; 58,59; 79,68; 83,10; 124,37; 124,91; 155,67; 172,37; 211,35. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₉H₄₆NO₅

$([M+H]^+)$ 488,3376; nájdené 488,3376.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-valinát (**5**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,73 (s, 3H, 18-H); 0,83 (s, 3H, 19-H), 0,89 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 0,97 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,98–2,06 (m, 4H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,23 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,66 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 5,03 (bd, 1H, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,04; 13,51; 17,56; 18,90; 20,58; 21,68; 23,27; 27,30; 28,30 ($3\times\text{C}$); 31,29; 36,35; 37,36; 39,29; 39,99; 42,88; 46,40; 50,96; 53,26; 53,82; 58,45; 79,66; 83,22; 124,42; 124,87; 153,54; 172,06; 211,40. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{NO}_5$ ($[M+H]^+$) 488,3376; nájdené 488,3379.

Ester s Boc-L-fenylalanínom (**6**) a Boc-D-fenylalanínom (**7**)

Látky **6** a **7** boli pripravené podľa všeobecného postupu prípravy esteru. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu A. Mobilná fáza: roztok cyklohexánu a dietyléru v pomere 15 : 7. Estery **6** (281 mg, 100 %) a **7** (282 mg, 101 %) boli získané vo forme bielej peny.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninát (**6**) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,74 (s, 3H, 19-H) 1,42 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,97–2,06 (m, 4H); 2,15–2,30 (m, 2H); 2,35–2,38 (m, 2H); 3,04–3,13 (m, 2H); 4,59 (m, 1H, NH-CH-CO) 4,62 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 4,96 (bd, 1H, $J = 8,6$ Hz, HN), 5,57 (m, 1H, H-2); 5,7 (m, 1H, H-3); 7,16 (m, 2H); 7,25 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz); 7,29 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 11,94; 13,51; 20,53; 21,68; 23,25; 27,29; 28,30 ($3\times\text{C}$); 36,32; 37,31; 38,59; 39,29; 39,95; 42,85; 46,37; 50,96; 53,23; 53,81; 54,50; 56,36; 79,84; 83,44; 124,39; 124,90; 126,96; 128,53; 129,31; 136,04; 136,29; 155,02; 171,94; 211,36. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{NO}_5$ ($[M+H]^+$): 536,3376; nájdené: 536,3379.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-fenylalaninát (**7**) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,71 (s, 3H, 18-H); 0,72 (s, 3H, 19-H); 1,43 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,96–2,05 (m, 5H); 2,36 (dd, 2H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,3$ Hz); 3,08 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 4,58 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,62 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 5,0 (bd, $J = 8,3$ Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3); 7,16 (m, 2H); 7,25 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz); 7,29 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 11,87; 13,50; 20,54; 21,68; 23,23; 26,88; 27,07; 28,30 ($3\times\text{C}$); 31,66; 36,30; 37,33; 38,44; 39,28; 39,96; 42,97; 46,39; 50,97; 53,23; 53,82; 54,37; 79,84; 83,36; 124,41; 124,88; 126,95; 128,48; 129,38; 136,04; 155,05; 171,88; 211,40. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{NO}_5$ ($[M+H]^+$): 536,3376; nájdené: 536,3377.

Ester s Boc-L-leucínom (8) a Boc-D-leucínom (9)

Látky **8** a **9** boli získané podľa všeobecného postupu prípravy esteru. Reakčná zmes bola spracovaná podľa postupu A. Mobilná fáza: roztok cyklohexánu a dietyléru v pomere 15 : 7. Ester **8** (198 mg, 76 %) bol získaný vo forme bielej pevnej látky a ester **9** (225 mg, 86 %) vo forme peny.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-leucinát (**8**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,81 (s, 3H, 19-H); 0,95 (d, 6H, $J = 6,7$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$); 1,44 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 1,97–2,05 (m, 4H); 2,18–2,29 (m, 2H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,30 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,68 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 4,9 (bd, 1H, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,06; 13,50; 20,59; 21,67; 22,05; 22,76; 23,25; 24,83; 27,22; 28,31($3 \times \text{C}$); 36,43; 37,33; 39,27; 39,96; 42,14; 42,99; 46,37; 51,01; 52,20; 53,22; 53,79; 79,71; 83,06; 124,38; 124,89; 155,30; 173,47; 211,39. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 502,3532; nájdené: 502,3535.

6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-leucinát (**9**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,73 (s, 3H, 18-H) 0,82 (s, 3H, 19-H); 0,95 (d, 6H, $J = 6,7$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$); 1,45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 1,98–2,05 (m, 4H); 2,16–2,30 (m, 2H); 2,35–2,39 (m, 2H); 4,30 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,66 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,9$ Hz, H-17 α); 4,89 (bd, 1H, $J = 8,6$ Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 11,97; 13,51; 20,58; 21,68; 22,09; 22,72; 23,26; 24,82; 27,22; 28,31($3 \times \text{C}$); 36,38; 37,37; 39,29; 40,00; 41,96; 42,99; 46,41; 51,03; 52,13; 53,25; 53,82; 79,72; 83,09; 124,43; 124,87; 155,34; 173,42; 211,44. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 502,3532; nájdené: 502,3537.

Ester s Boc-L-metionínom (10) a Boc-D-metionínom (11)

Podľa všeobecného postupu prípravy esteru boli pripravené látky **10** a **11**. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu A. Mobilná fáza: roztok cyklohexánu a dietyléru v pomere 3 : 2. Látky **10** (270 mg, 96 %) a **11** (244 mg, 90 %) boli získané v bielej voskovitej forme.

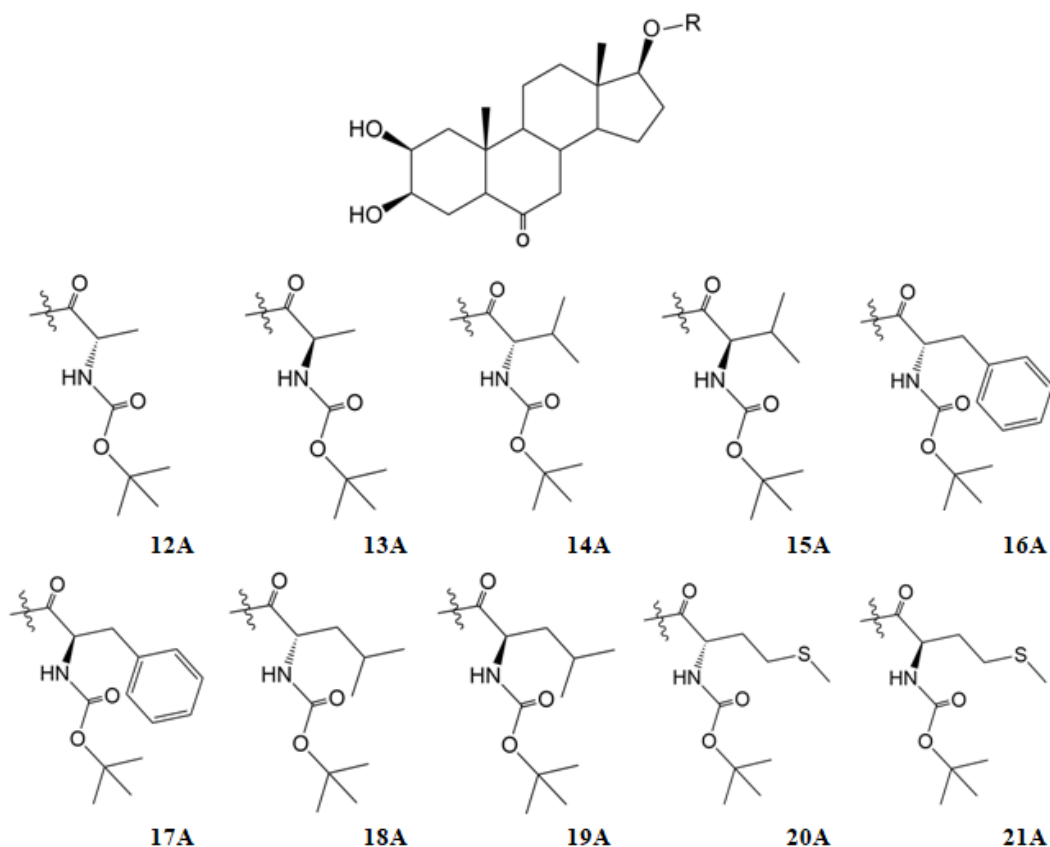
6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-methioninát (**10**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,82 (s, 3H, 19-H); 1,45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 2,0–2,01 (m, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,35–2,39 (m, 2H); 2,53–2,57 (m, 2H); 4,42 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,70 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 5,13 (bd, 1H, $J = 8,6$ Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,12; 13,50; 15,48; 20,57; 21,67; 23,23; 27,20; 28,29 ($3 \times \text{C}$); 29,95; 32,45; 36,49; 37,31; 39,27; 39,95; 43,01; 46,35; 50,97; 52,91; 53,21; 53,80; 79,96; 83,43; 124,37; 124,88; 155,27; 172,28; 211,33. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{NO}_5\text{S}$

([M+H]⁺): 520,3097; nájdené: 520,3102.

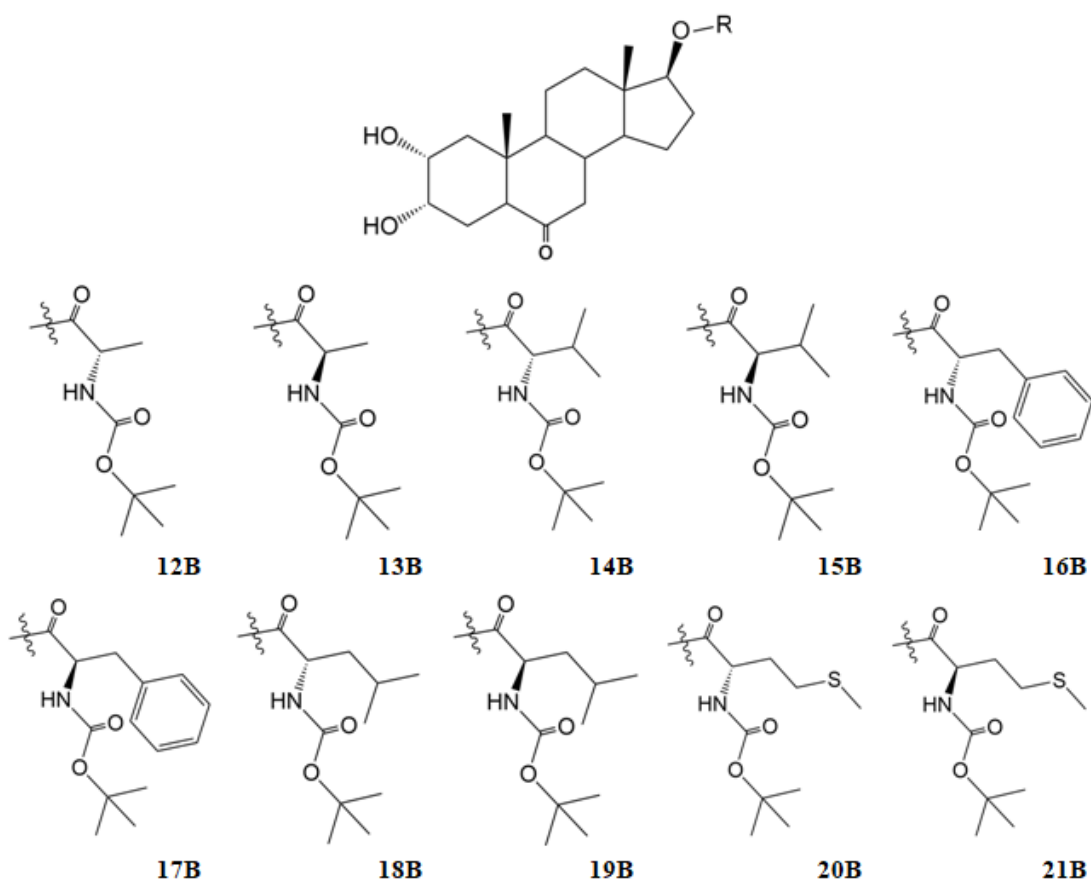
6-Oxo-5 α -androst-2-én-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-methioninát (**11**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,73 (s, 3H, 18-H); 0,82 (s, 3H, 19-H); 1,45 (s, 9H, 3 x CH₃); 2,00–2,01 (m, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,35–2,39 (m, 2); 2,52–2,61 (m, 2H); 4,42 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,68 (dd, 1H, *J* = 9,2 Hz, *J'* = 7,6 Hz, H-17 α); 5,12 (bd, 1H, *J* = 8,6 Hz, HN); 5,57 (m, 1H, H-2); 5,69 (m, 1H, H-3). ¹³C-NMR δ 12,02; 13,50; 15,46; 20,57; 21,67; 23,25; 27,29; 28,29 (3 x C); 29,92; 32,22; 36,37; 37,33; 39,28; 39,96; 42,99; 46,37; 50,99; 52,78; 53,23; 53,81; 79,95; 83,47; 124,39; 124,87; 155,29; 172,23; 211,32. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₉H₄₆NO₅S ([M+H]⁺): 520,3097; nájdené: 520,3101.

5.1.2 Príprava diolov

Z esterov, ktoré boli pripravené v rámci tejto bakalárskej práce v prvom stupni syntézy, bolo podľa všeobecného postupu prípravy diolu nasyntetizovaných 10 látok. Jednalo sa o zmes izomérov, ktoré boli pomocou HPLC rozdelené na minoritný 2 β ,3 β -diol (Obrázok 15) a majoritný 2 α ,3 α -diol (Obrázok 16).



Obrázok 15: Stručný prehľad pripravených derivátov s hydroxylovými skupinami na C-2 a C-3 v konfigurácii β . (R) Boc-AK, (12A) Boc-L-alanín, (13A) Boc-D-alanín, (14A) Boc-L-valín, (15A) Boc-D-valín, (16A) Boc-L-fenylalanín, (17A) Boc-D-fenylalanín, (18A) Boc-L-leucín, (19A) Boc-D-leucín, (20A) Boc-L-metionín, (21A) Boc-D-metionín.



Obrázok 16: Stručný prehľad pripravených derivátov s hydroxylovými skupina na C-2 a C-3 v konfigurácii α . (R) Boc-AK, (12B) Boc-L-alanín, (13B) Boc-D-alanín, (14B) Boc-L-valín, (15B) Boc-D-valín, (16B) Boc-L-fenylalanín, (17B) Boc- D-fenylalanín, (18B) Boc-L-leucín, (19B) Boc-D-leucín, (20B) Boc-L-metionín, (21B) Boc-D-metionín.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (12A) a 2 α ,3 α -diolu (12B) z esteru 2

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru 2 z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s L-alanínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 9 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 9 : 1) boli pripravené dva izomérne dioly 12A (25 mg) a 12B (120 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-alaninát (12A): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,79 (s, 3H, 18-H); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,39 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3); 1,44 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 1,96 (m, 1H); 2,12 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 2,23 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J' = 2,4$ Hz); 2,32 (dd, 1H, $J = 13,0$ Hz, $J' = 4,4$ Hz); 3,63 (m, 1H, H-2 β); 4,03 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 β); 4,31 (m, 1H, NH-CH $_2$ -CO); 4,71 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,9$ Hz, H-17 α); 5,06 (bd, 1H $J = 7,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,09; 15,20; 18,93; 20,99; 23,21; 24,13; 27,11; 28,31 ($3 \times \text{C}$); 36,45; 36,90; 40,49; 42,30; 43,31; 45,83; 49,29; 50,97; 54,50;

57,13; 69,01; 71,65; 79,79; 82,90; 155,05; 173,40; 210,09. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{27}H_{44}NO_7$ ($[M+H]^+$): 494,3118; nájdené: 494,3116.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-alaninát (12B**):** 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0,77 (s, 3H, 18-H); 0,79 (s, 3H, 19-H), 1,39 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 1,90–1,95 (dt, 2H, $J = 15,2$ Hz, oba $J' = 3,4$ Hz); 2,31 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,7 (dd, 1H, $J = 12,7$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 α); 4,05 (m, 1H, H-3 α); 4,31 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,72 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, $J' = 7,8$ Hz, H-17 α); 5,07 (bd, 1H, $J = 7,2$ Hz, HN). ^{13}C -NMR δ 12,07; 13,56; 18,97; 20,66; 23,23; 26,25; 27,14; 28,31 ($3 \times C$); 36,38; 37,35; 40,13; 42,47; 43,27; 46,13; 49,30; 50,70; 51,01; 53,57; 68,21; 68,28; 79,82; 82,93; 155,09; 173,39; 211,47. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{27}H_{44}NO_7$ ($[M+H]^+$): 494,3118; nájdené: 494,3118.

Príprava **2 β ,3 β -diolu (13A)** a **2 α ,3 α -diolu (13B)** z esteru **3**

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **3** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s D-alanínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 9 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 9 : 1) boli pripravené dva izomérene dioly **13A** (25 mg) a **13B** (58 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-alaninát (13A**):** 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0,78 (s, 3H, 18-H); 0,96 (s, 3H, 19-H); 1,34 (d, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH_3); 1,42 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 1,94 (m, 1H); 2,08 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 2,21 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J' = 2,4$ Hz); 2,29 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,43 (bs, 6H); 3,56 (m, 1H, H-2 β); 3,97 (m, 1H, H-3 β); 4,26 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,62 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 5,06 (bd, 1H $J = 7,2$ Hz, HN). ^{13}C -NMR δ 11,96; 15,09; 18,45; 20,93; 23,18; 23,74; 27,19; 28,21 ($3 \times C$); 29,69; 36,30; 36,91; 40,54; 42,18; 43,12; 49,47; 50,88; 54,44; 57,16; 68,83; 71,13; 79,83; 83,11; 155,18; 173,41; 210,96. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{27}H_{44}NO_7$ ($[M+H]^+$): 494,3118; nájdené: 494,3121.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-alaninát (13B**):** 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0,74 (s, CH_3 , 18-H); 0,79 (s, CH_3 , 19-H); 1,35 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3); 1,43 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 1,97–2,04 (m, 2H); 2,28 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,47 (bs, 3H); 2,68 (dd, 1H, $J = 12,5$ Hz, $J' = 2,4$ Hz); 3,71 (m 1H, H-2 α); 4,01 (m, 1H, H-3 α); 4,27 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,64 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,9$ Hz, H-17 α); 5,05 (bd, 1H $J = 7,2$ Hz, HN). ^{13}C -NMR δ 11,96; 13,50; 18,54; 20,63; 23,20; 26,20; 27,21; 28,25 ($3 \times C$); 29,62; 36,26; 37,32; 39,94; 42,45; 43,10; 46,09; 49,63; 50,71; 50,96; 53,51; 68,11; 79,84; 83,10;

155,17; 173,39; 211,93. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{27}H_{44}NO_7$ ($[M+H]^+$): 494,3118; nájdené: 494,3123.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (14A) a 2 α ,3 α -diolu (14B) z esteru 4

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru 4 z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s L-valínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (dietyléter : chloroform 9 : 1) a HPLC (dietyléter : chloroform 9 : 1) boli pripravené dva izomérne dioly **14A** (20 mg) a **14B** (80 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**14A**): 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0,81 (s, 3H, 18-H); 0,90 (s, 3H, 19-H); 0,98 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,00 (s, 3H, CH_3); 1,45 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 1,96 (t, 2H, $J = 12,5$ Hz); 2,13 (dd, 2H, $J = 14,5$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 2,23 (m, 1H); 2,34 (dd, 1H, $J = 12,8$ Hz, $J' = 4,3$ Hz); 3,64 (m, 1H, H-2 β); 4,04 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 β); 4,23 (m, 1H, NH- \underline{CH} -CO); 4,70 (dd, 1H, $J = 7,9$ Hz, $J' = 9,7$ Hz, H-17 α); 5,04 (bd, 1H, $J = 8,9$ Hz, HN). ^{13}C -NMR δ 12,23; 15,23; 17,50; 19,02; 21,02; 23,27; 24,17; 27,23; 28,31 ($3 \times C$); 31,35; 36,48; 36,89 40,48; 42,30; 43,18; 45,82; 50,95; 54,53; 57,10; 58,60; 69,02; 71,69; 79,73; 83,01; 155,68; 172,40; 209,98. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{29}H_{46}NO_6$ ($[(M-H_2O)+H]^+$): 504,3325; nájdené: 504,3329.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**14B**): 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0,76 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 0,90 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 0,97 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, $3 \times CH_3$); 1,92 (dt, 2H, $J = 15,2$, oba $J = 3,4$ Hz); 2,01 (t, 1H, $J = 12,7$ Hz); 2,11 (dd, 2H, $J = 3,8$ Hz, $J' = 2,6$ Hz); 2,31 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,70 (dd, 1H, $J = 12,5$ Hz, $J' = 2,8$ Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 α); 4,05 (d, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 α); 4,22 (m, 1H, NH- \underline{CH} -CO); 4,70 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-17 α); 5,05 (bd, 1H, $J = 9,2$ Hz, HN). ^{13}C -NMR δ 12,19; 13,55; 17,51; 19,01; 20,66; 23,25; 26,25; 27,23; 28,30 ($3 \times C$); 31,25; 36,38; 37,31; 40,10; 42,46; 43,11; 46,10; 50,68; 50,95; 53,55; 58,58; 68,18; 68,27; 79,73; 83,04; 155,68; 172,37; 211,49. HRMS: (API+) vypočítané pre $C_{29}H_{48}NO_7$ ($[M+H]^+$): 522,3431; nájdené: 522,3428.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (15A) a 2 α ,3 α -diolu (15B) z esteru 5

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru 5 z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s D-valínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (dietyléter : chloroform 9 : 1) a HPLC (dietyléter : chloroform 9 : 1) boli pripravené dva izomérne dioly **15A**

(16 mg) a **15B** (94 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-valinát (**15A**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,82 (s, 3H, 18-H); 0,89 (s, 3H, 19-H); 0,96 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH₃); 1,00 (s, 3H, CH₃); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,96 (t, 2H, *J* = 12,7 Hz); 2,21–2,24 (m, 2H); 2,33 (dd, 1H, *J* = 13,1 Hz, *J'* = 4,3 Hz); 3,64 (m, 1H, H-2 β); 4,04 (d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-3 β); 4,22 (m, 1H, NH-CH₂-CO); 4,65 (t, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-17 α); 5,03 (bd, 1H, *J* = 8,9 Hz, HN). ¹³C-NMR δ 12,16; 15,23; 17,56; 18,90; 21,01; 23,28; 24,17; 27,29; 28,30 (3 \times C); 31,26; 36,37; 36,90; 40,51; 42,34; 43,08; 45,86; 50,91; 54,56; 57,13; 58,48; 69,03; 71,69; 79,73; 83,15; 155,69; 172,33; 210,05. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₉H₄₈NO₇ ([M+H]⁺) 522,3431; nájdené 522,3434.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-valinát (**15B**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,77 (s, 3H, 18-H); 0,81 (s, 3H, 19-H); 0,89 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃); 0,96 (d, 3H, *J* = 7 Hz, CH₃); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,93 (dt, 1H, *J* = 15,2 Hz, oba *J'* = 3,2 Hz); 2,02 (t, 3H, *J* = 12,5 Hz); 2,13 (dd, 1H, *J* = 11,6 Hz, *J'* = 6,7 Hz); 2,31 (dd, *J* = 13,0 Hz, *J'* = 4,4 Hz); 2,71 (dd, 1H, *J* = 12,4 Hz, *J'* = 4,2 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2 α); 4,05 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-3 α); 4,22 (m, 1H, NH-CH₂-CO); 4,66 (dd, 1H, oba *J* = 9,2 Hz, *J'* = 7,6 Hz, H-17 α); 5,05 (bd, 1H, *J* = 8,9 Hz, HN). ¹³C-NMR δ 12,11; 13,57; 17,56; 18,89; 20,66; 23,27; 26,23; 27,29; 28,30 (3 \times C); 31,21; 36,27; 37,34; 40,13; 42,49; 43,03; 46,14; 50,69; 50,93; 53,57; 58,45; 68,19; 68,28; 79,73; 83,13; 155,70; 172,32; 211,53. HRMS: (API+) vypočítané pre C₂₉H₄₈NO₇ ([M+H]⁺) 522,3431; nájdené 522,3436.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (**16A**) a 2 α ,3 α -diolu (**16B**) z esteru **6**

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **6** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s L-fenylalanínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 13 : 7) boli pripravené dva izomérmé dioly **16A** (13 mg) a **16B** (65 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninát (**16A**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,73 (s, 3H, 18-H); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,42 (s, 9H, 3 \times CH₃); 1,95 (m, 1H); 2,13 (dd, 1H, *J* = 14,7 Hz, *J'* = 3,1 Hz); 2,23 (dd, 1H, *J* = 12,1 Hz, *J'* = 2,0 Hz); 2,32 (dd, 1H, *J* = 13,1 Hz, *J'* = 4,3 Hz); 3,03–3,13 (m, 2H), 3,64 (m, 1H, H-2 β); 4,04 (q, 1H, *J* = 3,4 Hz, H-3 β); 4,58 (m, 1H, NH-CH₂-CO); 4,62 (m, 1H, H-17 α); 4,95 (bd, 1H, *J* = 8,3 Hz, HN); 7,16 (m, 2H); 7,25 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 7,29 (m, 2H). ¹³C-NMR δ 12,04; 15,21; 20,96; 23,26; 24,17; 27,28; 28,28 (3 \times CH₃); 29,68; 36,33; 36,84; 38,55; 40,47; 42,32;

43,05; 45,82; 50,90; 54,52; 57,11; 69,02; 71,68; 79,88; 83,34; 126,98; 128,55 (2×C); 129,30 (2×C); 136,03, 155,12; 172,02; 210,07. HRMS: (API+) vypočítané pre C₃₃H₄₆NO₆ ([*(M-H₂O)+H*]⁺): 552,3325; nájdené: 552,3328.

2α,3α-Dihydroxy-6-oxo-5α-androstán-17β-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-fenylalaninát (**16B**): ¹H-NMR (CDCl₃) δ 0,72 (s, 3H, 18-H); 0,76 (s, 3H, 19-H); 1,42 (s, 9H, 3×CH₃); 1,92 (dt, 1H, *J* = 15,0 Hz, oba *J'* = 3,4 Hz); 2,30 (dd, 1H, *J* = 13,1 Hz, *J'* = 4,6 Hz); 3,03–3,13 (m, 2H); 3,75 (m, 1H, H-2α); 4,05 (q, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-3α); 4,57 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,62 (m, 1H, H-17α); 5,0 (bd, 1H, *J* = 8,3 Hz, HN); 7,16 (m, 2H); 7,25 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz); 7,29 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz). ¹³C-NMR δ 12,01; 13,55; 20,62; 23,25; 26,27; 27,28; 28,28 (3×CH₃); 31,21; 36,26; 37,37; 38,54; 40,11; 42,44; 42,99; 46,09; 50,66; 50,92; 53,52; 54,45; 68,25; 79,89; 83,40; 126,98; 128,52 (2×C); 129,29 (2×C); 136,02; 155,03; 172,00; 211,54. HRMS: (API+) vypočítané pre C₃₃H₄₈NO₇ ([*M+H*]⁺): 570,3431; nájdené: 570,3428.

Príprava 2β,3β-diolu (17A) a 2α,3α-diolu (17B) z esteru 7

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **7** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s D-fenylalanínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 13 : 7) boli pripravené dva izomérne dioly **17A** (21 mg) a **17B** (100 mg).

2β,3β-Dihydroxy-6-oxo-5α-androstán-17β-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-fenylalaninát (**17A**): ¹H-NMR (CDCl₃) 0,70 (s, 3H, 18-H); 0,98 (s, 3H, 19-H); 1,43 (s, 9H, 3×CH₃); 1,94 (m, 1H); 2,11–2,13 (m, 2H); 2,22 (d, 1H, *J* = 10,1 Hz); 2,31 (dd, 1H, *J* = 13,0 Hz, *J'* = 4,4 Hz); 3,07 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz); 3,64 (bs, 1H, H-2β); 4,04 (bs, 1H, H-3β); 4,56 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,61 (dd, 1H, *J* = 9,5 Hz, *J'* = 7,6 Hz, H-17α); 5,01 (bd, *J* = 7,9 Hz, HN); 7,14–7,16 (m, 2H); 7,24 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz); 7,28 (m, 2H). ¹³C-NMR δ 12,00; 15,20; 20,98; 23,25; 24,19; 27,08; 28,30 (3×C); 26,69; 36,33; 36,88; 38,44; 40,49; 42,34; 43,04; 45,86; 50,91; 54,54; 57,13; 69,04; 71,71; 79,89; 83,30; 126,97; 128,49 (2×C); 129,37 (2×C); 136,02, 155,05; 171,89; 209,96. HRMS: (API+) vypočítané pre C₃₃H₄₈NO₇ ([*M+H*]⁺) 570,3431; nájdené 570,3433.

2α,3α-Dihydroxy-6-oxo-5α-androstán-17β-yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-fenylalaninát (**17B**): ¹H-NMR (CDCl₃) 0,70 (s, 3H, 18-H); 0,98 (s, 3H, 19-H); 1,43 (s, 9H, 3×CH₃); 1,94 (m, 1H); 2,11–2,13 (m, 2H); 2,22 (d, 1H, *J* = 10,1 Hz); 2,31 (dd, 1H, *J* = 13,0 Hz, *J'* = 4,4 Hz); 3,07 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz); 3,64 (bs, 1H, H-2β); 4,04 (bs, 1H, H-3β); 4,56 (m, 1H, NH-CH-

CO); 4,61 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 5,01 (bd, $J = 7,9$ Hz, HN); 7,14–7,16 (m, 2H); 7,24 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz); 7,28 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 11,89; 13,49; 20,58; 23,18; 26,83; 27,01; 28,24 (3 \times C); 29,62; 36,19; 37,27; 38,36; 40,00; 42,43; 43,07; 46,06; 50,64; 50,88; 53,46; 54,35; 68,12; 79,92; 83,27; 126,92; 128,42 (2 \times C); 129,30 (2 \times C); 135,94; 155,08; 171,90; 211,72. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 570,3431; nájdené 570,3428.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (18A) a 2 α ,3 α -diolu (18B) z esteru 8

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **8** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s L-leucínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 13 : 7) boli pripravené dva izomérené dioly **18A** (29 mg) a **18B** (83 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-leucinát (**18A**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,8 (s, 3H, 18-H); 0,95 (d, 6H, $J = 6,4$ Hz, 2 \times CH $_3$); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,44 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 1,96 (m, 1H); 2,12 (dd, 1H, $J = 14,5$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 2,23 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J' = 2,4$ Hz); 2,33 (dd, 1H, $J = 13,0$ Hz, $J' = 4,4$ Hz); 3,63 (m, 1H, H-2 β); 4,03 (q, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 β); 4,29 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,67 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 4,91 (bd, 1H, $J = 8,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,18; 15,21; 21,02; 22,02; 22,77; 23,26; 24,14; 24,82; 27,22; 28,31(3 \times C); 36,45; 36,88; 40,50; 42,09; 42,29; 43,19; 45,83; 50,95; 52,21; 54,52; 57,11; 69,01; 71,66; 79,76; 82,97; 155,32; 173,51; 210,08. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_6$ ($[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$): 518,3482; nájdené: 518,3485.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-leucinát (**18B**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,77 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H 19-H); 0,95 (d, 6H, $J = 6,4$ Hz, 2 \times CH $_3$); 1,44 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 1,93 (dt, 1H, $J = 15,0$ Hz, oba $J' = 3,4$ Hz), 2,02 (m, 1H); 2,31 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,70 (dd, 1H, $J = 12,5$ Hz, $J' = 3,1$ Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 α); 4,05 (q, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 α); 4,3 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,68 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,6$ Hz, H-17 α); 4,93 (bd, 1H, $J = 8,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,14; 13,56; 20,67; 22,03; 22,77; 23,26; 24,82; 26,25; 27,22; 28,31(3 \times C); 36,37; 37,32; 40,11; 42,10; 42,48; 43,13; 46,12; 50,68; 50,97; 52,19; 53,55; 68,20; 68,27; 79,77; 83,00; 155,34; 173,51; 211,52. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{NO}_7$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 536,3587; nájdené: 536,3582.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (19A) a 2 α ,3 α -diolu (19B) z esteru 9

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **9**

z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s D-leucínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 13 : 7) boli pripravené dva izoméne dioly **19A** (20 mg) a **19B** (60 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-leucinát (19A**):** $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,81 (s, 3H, 18-H); 0,95 (d, 6H, $J = 6,7$ Hz, $2\times\text{CH}_3$); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,44 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,96 (m, 1H); 2,13 (dd, 1H, $J = 14,7$ Hz, $J' = 3,1$ Hz), 2,23 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J' = 2,4$ Hz); 2,33 (dd, 1H, $J = 13$ Hz, $J' = 4,4$ Hz); 3,64 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (m, 1H, H-3 β); 4,29 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,65 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,9$ Hz, H-17 α); 4,90 (bd, 1H, $J = 8,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,07; 15,22; 21,01; 22,04; 22,72; 23,27; 24,14; 27,22; 28,30 ($3\times\text{C}$); 36,92; 40,51; 41,90; 42,35; 43,18; 45,86; 50,96; 52,13; 54,54; 57,13; 69,04; 71,67; 79,79; 83,04; 128,82; 130,92; 155,39; 173,47; 210,18. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{N}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 536,3587; nájdené 536,3585.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-leucinát (19B**):** $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,76 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 0,94 (d, 6H, $J = 6,7$ Hz, $2\times\text{CH}_3$); 1,44 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,91 (dt, 1H, $J = 15,3$ Hz, oba $J' = 3,4$ Hz); 2,01 (t, 1H, $J = 12,8$ Hz); 2,3 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,6$ Hz); 2,70 (d, 1H, $J = 11,3$ Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 α); 4,05 (q, 1H, $J = 3,1$ Hz, H-3 α); 4,28 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,66 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 7,9$ Hz, H-17 α); 4,94 (bd, 1H, $J = 8,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,01; 13,54; 20,66; 22,03; 22,69; 23,24; 24,79; 26,22; 27,20; 28,28 ($3\times\text{C}$); 36,30; 37,34; 40,08; 41,86; 42,48; 43,12; 46,13; 50,68; 50,98; 52,10; 53,55; 68,18; 68,26; 79,79; 83,03; 155,41; 173,74; 211,67. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{N}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 536,3587; nájdené 536,3592.

Príprava **2 β ,3 β -diolu (20A)** a **2 α ,3 α -diolu (20B)** z esteru **10**

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **10** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s L-metionínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : metanol 19 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) boli pripravené dva izoméne dioly **20A** (13 mg) a **20B** (54 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-methioninát (20A**):** $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,82 (s, 3H, 18-H); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,25–1,26 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 1,45 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,96 (t, 1H, $J = 12,8$ Hz); 2,05 (s, 1H); 2,33 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,0$ Hz); 2,44 (m, 1H); 2,94 (s, 3H); 3,05 (m, 1H); 3,16 (m, 1H); 3,67 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (bs, 1H, H-3 β); 4,39 (m, 1H, NH-CH-CO); 4,70 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 5,24 (bd, 1H, J

= 5,8 Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,27; 15,22; 20,99; 23,23; 24,14; 25,81; 26,27; 27,19; 28,24 (3 \times C); 29,67; 36,45; 36,82; 40,46; 40,81; 43,22; 45,01; 45,78; 50,85; 51,11; 52,16; 54,48; 57,12; 68,11; 84,03; 155,32; 171,35; 209,95. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 554,3151; nájdené 554,3151.

2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-methioninát (20B**):**
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,75 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 1,24–1,25 (m, 4H, 2 \times CH $_2$); 1,43 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 2,04 (s, 1H); 2,29 (dd, 1H, $J = 13,0$ Hz, $J' = 4,4$ Hz); 2,71 (d, 1H, $J = 11,0$ Hz); 2,94 (s, 3H); 3,05 (m, 1H); 3,19 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, H-2 α); 4,04 (bs, 1H, H-3 α); 4,37 (m, 1H, NH-CH $_2$ -CO); 4,71 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-17 α); 5,40 (bd, 1H, $J = 7,9$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,19; 13,53; 14,12; 20,65; 23,18; 25,53; 27,11; 28,20 (3 \times C); 29,17; 29,62; 36,38; 37,24; 39,99; 40,80; 42,41; 43,17; 45,97; 50,63; 50,85; 51,07; 53,36; 60,38; 68,09; 83,89; 155,46; 171,18; 211,55. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 554,3151; nájdené 554,3148.

Príprava 2 β ,3 β -diolu (**21A**) a 2 α ,3 α -diolu (**21B**) z esteru **11**

Podľa všeobecného postupu prípravy diolu bola pripravená z esteru **11** z predchádzajúcej syntézy zmes izomérov s D-metionínom. Chemická reakcia bola spracovaná podľa postupu B. Pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (EtOAc : metanol 19 : 1) a HPLC (EtOAc : cyklohexán 4 : 1) boli pripravené dva izomérené dioly **21A** (15 mg) a **21B** (60 mg).

2 β ,3 β -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-methioninát (21A**):**
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,81 (s, 3H, 18-H); 0,99 (s, 3H, 19-H); 1,25–1,26 (m, 4H, 2 \times CH $_2$); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH $_3$); 1,96 (m, 1H); 2,14 (m, 1H); 2,32 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz, $J' = 4,3$ Hz); 2,42 (m, 1H); 2,94 (s, 3H); 3,05 (m, 1H); 3,18 (m, 1H); 3,63 (m, 1H, H-2 β); 4,03 (m, 1H, H-3 β); 4,39 (m, 1H, NH-CH $_2$ -CO); 4,68 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-17 α); 5,27 (bd, 1H, $J = 7,6$ Hz, HN). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 12,17; 15,21; 20,97; 23,22; 24,09; 25,58; 27,29; 28,23 (3 \times C); 29,65; 36,37; 36,83; 40,46; 40,74; 42,31; 43,20; 45,76; 50,86; 51,04; 52,02; 54,45; 57,11; 68,98; 71,62; 83,98; 155,42; 171,13; 210,04. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 554,3151; nájdené 554,3153.

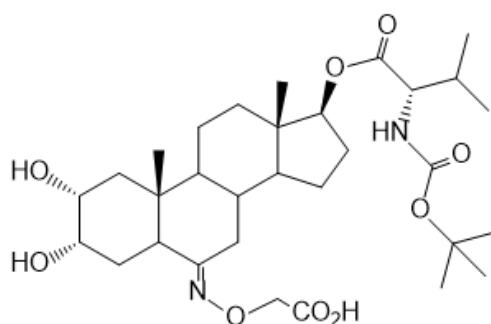
2 α ,3 α -Dihydroxy-6-oxo-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-D-methioninát (21B**):**
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,75 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 1,29–1,34 (m, 4H, 2 \times CH $_2$); 1,44 (s, 11H); 2,00 (t, 1H, $J = 12,7$ Hz); 2,30 (dd, 1H, $J = 13,1$ Hz; $J' = 4,6$ Hz); 2,44 (m, 1H); 2,69 (dd, 2H, $J = 13,1$ Hz; $J' = 3,1$ Hz); 2,93 (s, 3H); 3,04 (m, 1H); 3,16 (m, 1H); 3,74 (m, 1H, H-2 α); 4,03 (m, 1H, H-3 α); 4,38 (m, 1H, NH-CH $_2$ -CO); 4,69 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-

17 α); 5,36 (bd, 1H, $J = 6,4$ Hz HN). ^{13}C -NMR δ 12,10; 13,53; 20,62; 23,19; 25,46; 26,23; 27,27; 28,22 (3 \times C); 29,62; 36,27; 37,23; 40,01; 40,72; 42,20; 43,15; 46,01; 50,67; 50,88; 51,01; 52,00; 53,44; 68,13; 68,22; 83,93; 155,44; 171,12; 211,54. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 554,3151; nájdené 554,3152.

5.1.3 Príprava karboxymetyloxímu **22** z derivátu **14B**

Priebeh chemickej reakcie prípravy karboxymetyloxímu **22** bol monitorovaný pomocou TLC. Po ukončení bola reakčná zmes extrahovaná medzi EtOAc a vodu. Spojená organická fáza bola premytá vodou a vysušená MgSO_4 . Rozpúšťadlá boli odparené na RVO. Produkt chemickej reakcie bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikagéle (mobilná fáza EtOAc : metanol 97 : 3). Výsledkom syntézy bol karboxymethyloxím **22** (11 mg, 88 %) vo forme bielej pevnej látky, ktorý bol použitý do nasledujúcej reakcie (Obrázok 17).

2 $\alpha,3\alpha$ -Dihydroxy-6-(karboxymethoxyimino)-5 α -androstán-17 β -yl *N*-(*t*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**22**): ^1H -NMR (CDCl_3) δ 0,75 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 0,90 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 0,97 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, 3 \times CH_3); 1,91 (dt, 2H, $J = 15,2$, $J = 3,4$ Hz); 2,08-2,23 (m, 2H); 2,42 (dd, 1H, $J = 12,7$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 3,28 (dd, 1H, $J = 13,4$ Hz, $J' = 4,3$ Hz); 3,75 (m, 1H, H-2 β); 4,02 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-3 β); 4,22 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, $J' = 4,6$ Hz, NH-CH-CO); 4,55 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$); 4,69 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-17 α); 5,09 (bd, 1H, $J = 9,2$ Hz, NH). ^{13}C -NMR δ 12,26; 12,86; 17,52; 19,02; 20,60; 23,38; 27,29; 27,65; 28,31 (3 \times C); 30,10; 31,15; 35,23; 36,52; 39,64; 40,38; 43,05; 43,26; 50,79; 53,91; 58,61; 68,41; 68,53; 69,80; 79,77; 83,21; 155,74; 161,80; 172,44; 173,49. HRMS: (API+) vypočítané pre $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_9$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 595,3595; nájdené 595,3598.

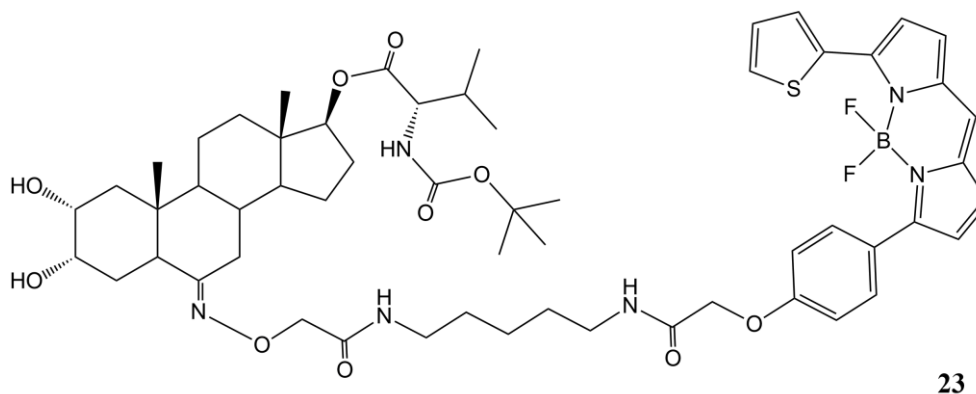


22

Obrázok 17: Chemická štruktúra karboxymetyloxímu **22**.

5.1.4 Príprava derivátu 23 naviazaním fluorescenčnej značky BODIPY TR

Priebeh chemickej reakcie prípravy derivátu 23 bol monitorovaný pomocou TLC. Po ukončení reakcie bol DMF odparený na RVO. Stĺpcovou chromatografiou na silikagéle (mobilná fáza gradient 1–3 % isopropanolu v chloroforme) bol pripravený fluorescenčný derivát **23** (6 mg, 30 %), ktorý bol získaný vo forme tmavofialovej pevnej látky (Obrázok 18). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,74 (s, 3H, 18-H); 0,80 (s, 3H, 19-H); 0,90 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 0,97 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,45 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 2,12-2,23 (m, 2H); 2,45 (dd, 1H, $J = 12,4$ Hz, $J' = 2,9$ Hz); 3,13 (m, 1H, CH_2NH); 3,25 (dd, 1H, $J = 13,6$ Hz, $J' = 4,4$ Hz); 3,29-3,41 (m, 2H, CH_2NH); 3,52 (m, 1H, CH_2NH); 3,70 (m, 1H, H-2 β); 4,02 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3 β); 4,23 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J' = 4,4$ Hz, NH-CH-CO); 4,41 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, OCH_2CO_2); 4,47 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, OCH_2CO_2); 4,56 (s, 2H, OCH_2CONH); 4,68 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-17 α); 5,04 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, NH); 6,18 (dd, 1H, $J = 6,6$ Hz, $J' = 5,0$ Hz, CH_2CONH); 6,66 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H_{pyrrol}); 6,79 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, CH_2CONH); 6,83 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H_{pyrrol}); 7,02 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, $2 \times \text{H}_{\text{benzen}}$); 7,08 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H_{pyrrol}); 7,10 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H_{pyrrol}); 7,16 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, $J' = 3,8$ Hz, $\text{H}_{\text{thiofen}}$); 7,20 (s, 1H, C=CH-); 7,49 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, $J' = 1,0$ Hz, $\text{H}_{\text{thiofen}}$); 7,98 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, $2 \times \text{H}_{\text{benzen}}$); 8,11 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J' = 1,0$ Hz, $\text{H}_{\text{thiofen}}$).



Obrázok 18: Chemická štruktúra fluorescenčnou derivátu **23**.

5.2 Biologická časť

5.2.1 Hodnotenie cytotoxicity pripravených derivátov

V biologickej časti v rámci tejto bakalárskej práce bol testovaný efekt pripravených aminokyselinových diolov na viabilitu normálnych ľudských fibroblastov BJ a nádorových bunkových línií, ktoré zahŕňali bunky rakoviny krčka maternice (HeLa) a bunky chronickej myeloidnej leukémie (K-562). Miera cytotoxicity pripravených derivátov bola stanovená pomocou resazurinu. Bunky boli kultivované s testovanými derivátmi 72 hodín. Testovanie prebehlo v troch nezávislých opakovaní, v ktorých boli stanovené hodnoty IC_{50}

pre jednotlivé deriváty. V BJ neboli testované tie látky, ktoré v predchádzajúcich meraniach (v nádorových bunkových líniách HeLa a K-562) vykazovali hodnotu $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vo všeobecnosti vykazovali výraznejší inhibičný účinok deriváty s L-AK a α orientáciou vicinálnych hydroxylov na C-2 a C-3. Bunky K-562 boli citlivejšie na pôsobenie testovaných derivátov a v BJ nebol zaznamenaný žiaden výraznejší inhibičný efekt. Najvyšší inhibičný účinok bol zaznamenaný s derivátom **14B** v bunkách HeLa a K-562 bez vplyvu v BJ (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Výsledné priemerné hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) z troch nezávislých meraní v dvoch nádorových bunkových líniách (HeLa, K-562) a normálnych ľudských fibroblastoch BJ po 72 hodinách inkubácie s pripravenými diolmi.

Látky	Bunková línia (IC_{50} ; $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		
	HeLa	K-562	BJ
12A	28,50 ± 4,35	> 50	> 50
12B	17,36 ± 2,81	22,62 ± 0,79	> 50
13A	> 50	> 50	—
13B	> 50	40,66 ± 1,8	> 50
14A	> 50	> 50	—
14B	2,81 ± 0,69	3,66 ± 0,99	> 50
15A	> 50	> 50	—
15B	36,01 ± 1,59	> 50	> 50
16A	18,18 ± 0,24	26,41 ± 3,99	43,08 ± 7,49
16B	> 50	24,26 ± 4,77	> 50
17A	> 50	45,30 ± 1,27	> 50
17B	> 50	24,83 ± 5,70	44,60 ± 0,23
18A	> 50	> 50	—
18B	6,02 ± 1,68	6,19 ± 2,14	> 50
19A	> 50	> 50	—
19B	46,08 ± 1,85	33,88 ± 2,24	> 50
20A	> 50	> 50	—
20B	> 50	> 50	—
21A	> 50	> 50	—
21B	> 50	> 50	—

*priemer hodnôt IC_{50} , ± smerodajná odchýlka (SD), koncentrácia látok v jamke uvedená v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Derivát **14B** bol modifikovaný naviazaním fluorescenčnej značky BODIPY TR za účelom detailnejšieho štúdia biologickej aktivity. Výsledkom bol derivát **23**, ktorého inhibičný účinok bol pozorovaný v bunkách HeLa a BJ. Pomocou fluorescenčného mikroskopu bol pozorovaný jeho transport do cytosolu a prípadne aj do jadra buniek.

Biologická aktivita derivátu **23** (cez linker naviazaná fluorescenčná značka BODIPY TR) bola porovnaná s **MK-435**, ktorý vo svojej štruktúre obsahuje cez linker naviazanú fluorescenčnú značku NBD. Miera cytotoxicity bola stanovená pomocou resazurinu. Bunky boli kultivované s látkami 72 hodín. Testovanie prebehlo v troch nezávislých opakovaníach, z ktorých boli stanovené hodnoty IC_{50} . Inhibičný účinok derivátu **23** v bunkách HeLa bol výrazne nižší v porovnaní s východným derivátom **14B**. Cytotoxický účinok derivátu **23** bol zaznamenaný v BJ, ktorý je pravdepodobne spôsobený samotným fluoroforom, ktorý vykazoval inhibičný efekt v bunkách HeLa aj v BJ. Karboxymetyloxím **22** nevykazoval inhibičný efekt ani v bunkách HeLa, ani v BJ. Podobné výsledky boli pozorované s derivátom **MK-435** a **MK-432** (Tabuľka 2). Derivát **MK-435** vykazoval silnejší inhibičný účinok v bunkách HeLa ako v BJ, derivát **23** zase vykazoval vyšší inhibičný účinok v bunkách HeLa ako v BJ. Miera cytotoxicity týchto derivátov však bola približne rovnaká.

Tabuľka 2: Výsledné hodnoty IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) z troch nezávislých meraní v nádorových bunkových líniiach HeLa a normálnych ľudských fibroblastoch BJ po 72 hodinách inkubácie s fluorescenčnými derivátmi.

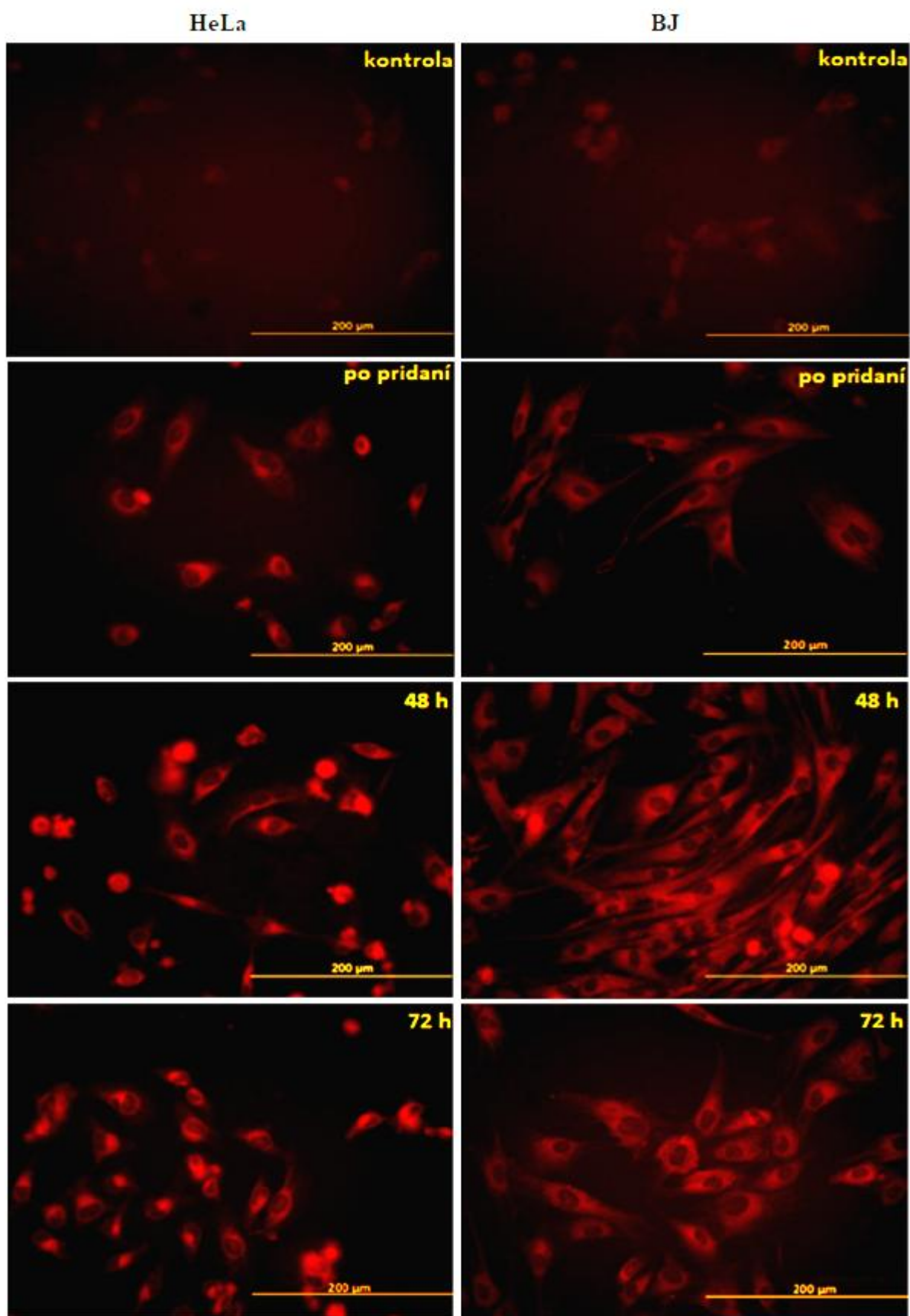
Látky	Bunková línia (IC_{50} ; $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	
	HeLa	BJ
23	32,10 ± 2,08	22,21 ± 6,07
BODIPY TR kadaverín	29,72 ± 4,34	22,59 ± 2,98
22	> 50	>50
MK-435	20,84 ± 4,49	31,40 ± 9,46
MK-432	31,89 ± 3,52	18,60 ± 2,84

*priemer hodnôt IC_{50} , ± smerodajná odchýlka (SD), koncentrácia látok v jamke uvedená v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

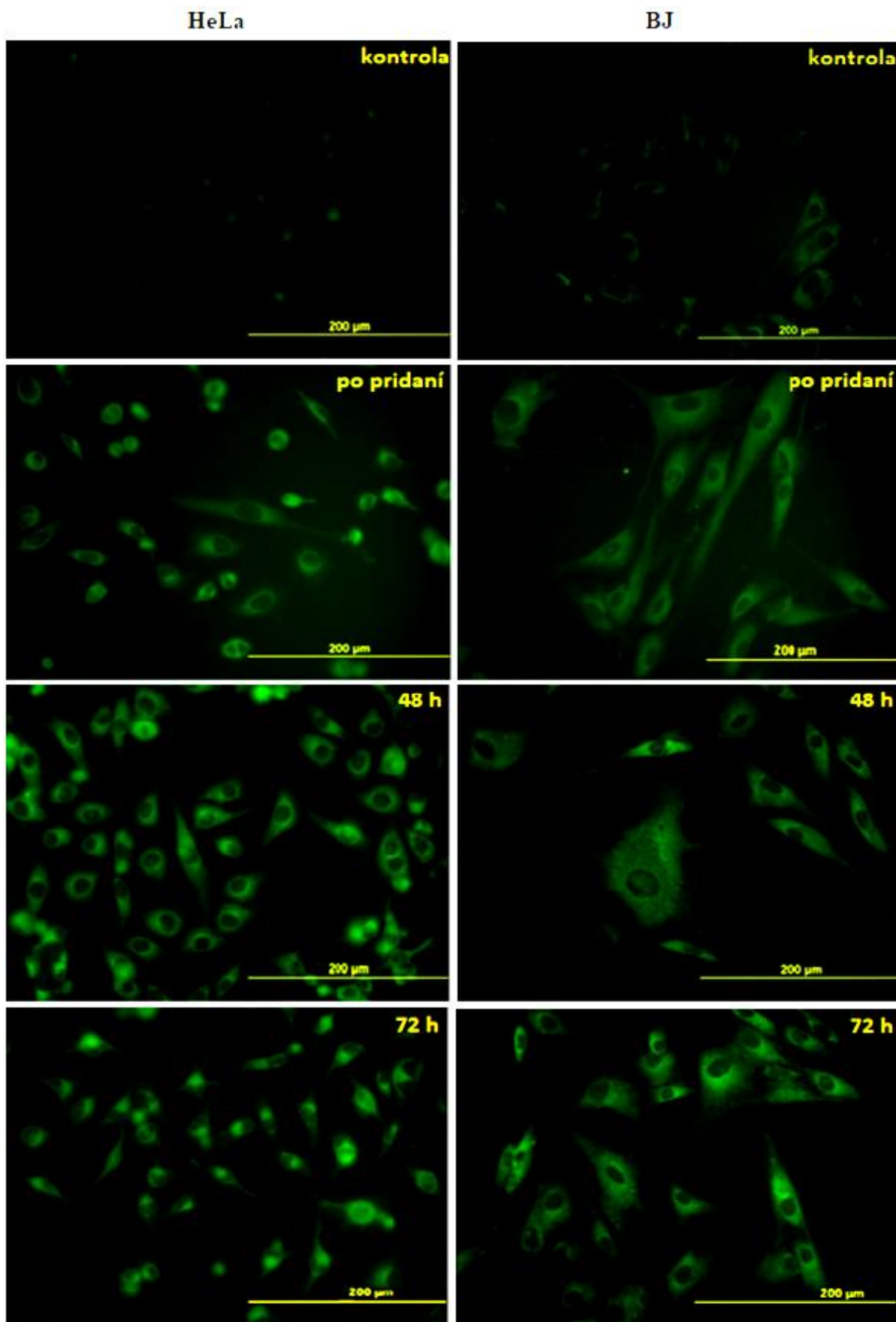
5.2.2 Pozorovanie transportu **23** a **MK-435** do cytosolu a jadra buniek

Pomocou fluorescenčného mikroskopu bol pozorovaný transport látky **23** pri (Obrázok 19) a **MK-435** pri hodnotách (Obrázok 20) do cytosolu a jadra bunky. Derivát **23** obsahuje vo svojej štruktúre cez linker naviazanú fluorescenčnú značku BODIPY TR (červená fluorescencia). Derivát **MK-435** má rovnakú štruktúru ako **23**, len namiesto

BODIPY TR má svojej štruktúre cez linker naviazaný NBD (zelená fluorescencia). Obidva deriváty prechádzali voľne cez cytoplazmatickú membránu vďaka ich lipofilnej povahe a fluorescenčný signál bol v cytosole pozorovaný hneď po pridaní. U niektorých buniek bol pozorovaný fluorescenčný signál v jadre v priebehu niekoľkých hodín. Silnejší fluorescenčný signál v jadre a v jeho okolí bol pozorovaný až po 48 hodinách a po 72 hodinách bol pozorovaný v jadre takmer všetkých buniek. Fluorescenčný signál **MK-435** bol pozorovaný v jadre v kratšom časovom úseku ako v prípade derivátu **23**, čo pravdepodobne súvisí s jeho štruktúrou. Fluorescenčný signál derivátu **MK-435** bol výraznejší ako derivátu **23**, ale nebol dostatočne stabilný. V krátkom čase dochádzalo k jeho vypáleniu. Z toho vyplýva, že deriváty s BODIPY TR sú vhodnejšími kandidátmi na detailnejšie štúdium biologickej aktivity ako deriváty s NBD.



Obrázok 19: Transport derivátu **23** ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do cytosolu a jadra buniek pozorovaný pomocou fluorescenčného mikroskopu počas 72 hodín v bunkách HeLa a BJ pri zväčšení $400\times$.



Obrázok 20: Transport derivátu MK-435 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do cytosolu a jadra bunky pozorovaný pomocou fluorescenčného mikroskopu počas 72 hodín v bunkách HeLa a BJ pri zväčšení $400\times$.

6 Diskusia

Táto bakalárska práca poukazuje na cytotoxický efekt pripravených aminokyselinových derivátov BR v nádorových bunkových líniiach HeLa a K-562 bez efektu v normálnych ľudských fibroblastoch BJ (hodnota $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tieto deriváty sú steroidnej povahy a obsahujú vo svojej štruktúre hydroxylové skupiny na C-2, C-3 v konfigurácii α alebo β , a šesťčlenný kruh B s oxo skupinou na C-6. Medzi sebou sa líšia v druhu a konfigurácii naviazanej aminokyseliny na C-17, ktorej amino skupina bola chránená Boc skupinou.

Najvýraznejší inhibičný účinok vykazovala látka **14B** (Boc-L-valín, hydroxylové skupiny v konfigurácii α) v obidvom nádorových bunkových líniiach (HeLa $IC_{50} 2,81 \pm 0,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a K-562 $IC_{50} 3,66 \pm 0,99 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bez efektu na BJ. Zaujímavé výsledky boli pozorované u derivátu BR4848 z predchádzajúcej štúdie, ktorý vykazoval výrazný inhibičný účinok v bunkách HeLa ($IC_{50} 3,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a v bunkách CEM ($IC_{50} 4,3 \pm 0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bez efektu v BJ (Rárová *et al.*, 2018). Keďže BR4848 obsahuje vo svojej štruktúre zmes L a D-valínu, tak nebolo možné s istotou tvrdiť, ktorá z týchto dvoch konfigurácií je zodpovedná za jeho inhibičný účinok. Derivát **14B** bol za účelom štúdia vzťahu medzi biologickou aktivitou a štruktúrou aminokyselinových derivátov BR pripravený v maximálnej čistote spolu s ďalšími derivátmi, a tým pádom je aj vhodnejší pre štúdium väzby na steroidné receptory ako BR4848.

Vo všeobecnosti vykazovali silnejší inhibičný účinok deriváty s L-AK na C-17 a hydroxylovými skupinami na C-2 a C-3 v konfigurácii α . Tieto výsledky sa až na drobné výnimky zhodujú s publikovanými výsledkami štúdií vzťahu medzi biologickou aktivitou a štruktúrou prírodných alebo syntetických derivátov BR (Malíková *et al.*, 2008; Rárová *et al.*, 2016). Čo sa týka konfigurácie AK, tak výnimkou bol derivát **15B** (Boc-D-valín, konfigurácia α) a **19B** (Boc-D-leucínom, konfigurácia α). Obidva deriváty vykazovali inhibičný účinok na bunkách HeLa a derivát **19B** aj na bunkách K-562. Ich cytotoxický účinok bol však nízky ($IC_{50} > 30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v porovnaní s aktívnymi derivátmi s L-AK. Deriváty **12A** (Boc-L-alanín) a **16A** (Boc-L-fenylalanín), ktoré majú hydroxylové skupiny v konfigurácii β , inhibovali proliferáciu buniek HeLa a derivát **16A** bol aktívny aj voči bunkám K-562. Deriváty s L a D-metionínom (**20A**, **20B**, **21A**, **21B**) nevykazovali inhibičný účinok na bunkách HeLa ani na bunkách K-562 ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), čo môže súvisieť s prítomnosťou atómu síry v ich štruktúre. Taktiež bolo pozorované, že suspenzná nádorová bunková línia, K-562, bola citlivejšia na pôsobenie testovaných diolov. To by

mohlo byť spôsobené tým, že testované látky v tomto prípade pôsobia na celý povrch bunky.

V tejto práci bol pozorovaný transport derivátov **23** (cez linker naviazaná fluorescenčná značka BODIPY TR) a **MK-435** (cez linker naviazaná fluorescenčná značka NBD) do cytosolu a jadra buniek, a taktiež bol stanovený ich inhibičný efekt. Keďže sa tieto deriváty líšia len v druhu naviazanej fluorescenčnej značky a ich steroidný nosič je rovnaký, tak bolo možné medzi sebou porovnávať ich fluorescenčné signály. V prípade derivátu **MK-435** nebol fluorescenčný signál dostatočne stabilný a v krátkom časovom úseku došlo k jeho vypáleniu. Naopak signál derivátu **23** vykazoval oveľa vyššiu stabilitu. Z toho vyplýva, že deriváty s BODIPY TR sú vhodnejšími kandidátmi pre detailnejšie štúdium biologickej aktivity ako deriváty s NBD a to najmä vďaka vyššej stabilite fluorescenčného signálu. Obidva deriváty sú lipofilnej povahy, čo im umožňuje voľne prechádzať cez cytoplazmatickú membránu bunky. Ich fluorescenčný signál bol tým pádom v cytosole pozorovaný hneď po ich aplikácii. Fluorescenčný signál derivátu **MK-435** bol v jadre detekovaný v kratšom časovom úseku ako v prípade derivátu **23**, čo pravdepodobne súvisí s ich veľkosťou, keďže molekulová hmotnosť BODIPY TR ($M_r = 545 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) je približne trikrát väčšia ako NBD ($M_r = 165 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Je možné, že fluorescenčná značka nedovoľuje derivátu **23** transport cez jadrovú membránu a s tým spojenú reguláciu transkripčnej aktivity s následnou apoptózou bunky. Ďalšou variantou je, že fluorescenčná značka by mohla byť pred vstupom do jadra bunky odštiepená z derivátu, aby bol umožnený jeho transport do jadra. To by mohlo súvisieť s menej výrazným fluorescenčným signálom derivátu **23** v jadre a v jeho okolí, ktorý bol zároveň pozorovaný oveľa neskôr ako u derivátu **MK-435**. Taktiež by mohol mať vplyv prebytok látok nad množstvom receptorov. Tieto úvahy nie sú zatiaľ potvrdené a vyžadujú ďalšie štúdium. Vďaka fluorescenčným derivátom bolo možné po ich aplikácii pozorovať zmenu tvaru a agregácie buniek. Bunky, ktoré nemali funkčný metabolizmus a postupne podliehali apoptóze zväčšovali svoj objem. V cytosole týchto buniek bolo možné pozorovať nahromadený fluorescenčný signál.

Pripravené deriváty nevykazovali výraznejší inhibičný efekt na BJ. To môže súvisieť s tým, že tieto bunky rastú nahlúčené vedľa seba a tým pádom nepôsobia deriváty na celý povrch bunky, ale len na časť. Taktiež je dôležité pripomenúť, že u normálnych buniek sa uplatňuje tzv. kontaktná inhibícia rastu, kedy v určitej konfluencii prechádzajú do pomalšieho režimu a tým pádom sú rezistentnejšie (Pardee, 1974).

Štúdiom derivátu BR4848 bolo zistené, že samotný steroid a voľná Boc-AK (bez

steroidného nosiča) nevykazujú oddelene žiaden inhibičný efekt. Antiproliferačný účinok nebol taktiež zaznamenaný v prípade, že bola na steroidnom nosiči naviazaná AK bez chrániacej Boc skupiny. Predpokladá sa, že bunka reaguje na derivát s AK bez Boc skupiny ako na prirodzenú AK a metabolizuje ju normálnym spôsobom, zatiaľ čo AK s Boc skupinou považuje za cudziu a nevie ju spracovať. Z týchto pozorovaní vyplýva, že Boc skupina má dôležitý vplyv na inhibičný účinok syntetických derivátov. Pre potvrdenie týchto hypotéz sú potrebné ďalšie štúdie (Kvasnica, nepublikované výsledky).

Vo viacerých štúdiách bolo dokázané, že BR sa zapájajú do rôznych signálnych dráh, ktorých výsledkom je apoptóza a to nezávisle od ich receptorového stavu. Ich mechanizmus účinku však nie je dostatočne známy a popísaný. Syntetický derivát BR4848 vykazuje výrazný antiproliferačný účinok popísaný v bunkách HeLa ($IC_{50} 3,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a taktiež bol popísaný jeho antiangiogénny účinok v bunkách HUVEC ($IC_{50} 25,2 \pm 0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Po jeho aplikácii došlo k zníženiu expresie antiapoptických proteínov Bcl-2 rodiny, konkrétne Bcl-2 a Mcl-1, k aktivácii kaspázy-3 a 7, a nakoniec bola DNA štiepená enzýmom PARP-1. Keďže derivát **14B** bol pripravený v čistejšej podobe (Boc-L-valín) ako BR4848 (Boc-D,L-valín), tak by sa mohol zapájať do rovnakej signalizačnej dráhy ako BR4848 a taktiež je možné predpokladať jeho antiangiogénny účinok. Derivát BR4848 spôsoboval apoptózu v bunkách rakoviny prsníka MCF7 ($IC_{50} 10,2 \pm 1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a MDA-MB-468 ($IC_{50} 46,6 \pm 0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), a taktiež v bunkách rakoviny prostaty LNCaP ($IC_{50} 20,0 \pm 1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Rárová *et al.*, 2018). Stanovená hodnota IC_{50} je výrazne nižšia ako v prípade prírodného 24-epiBL, ktorý spôsoboval apoptózu v bunkách rakoviny prsníka (MCF7 $IC_{50} 60 \pm 1,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a MDA-MB-468 $IC_{50} 68 \pm 2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a prostaty (LNCaP $IC_{50} 60 \pm 3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) reguláciou expresie proteínov Bcl-2 rodiny a kaspázovej aktivity (Steigerová *et al.*, 2010, 2012). 24-epiBL aktivoval v bunkách LNCaP katabolizmus PA, ktorého výsledkom je zníženie intracelulárnych hladín PA a tvorba toxických vedľajších produktov ako je peroxid vodíka a aldehydy, ktoré spôsobujú apoptózu (Obakan *et al.*, 2014).

Derivát **14B** vykazuje výrazný inhibičný účinok na bunkách HeLa a K-562 (HeLa $IC_{50} 2,81 \pm 0,69 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a K-562 $IC_{50} 3,66 \pm 0,99 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) bez efektu na BJ a je pripravený v maximálnej čistote, tak je možné predpokladať, že sa zapája do viacerých dráh, ktorých výsledkom je apoptóza. Keďže účinok BR v živočíšnych bunkách nie je dostatočne popísaný, tak sú potrebné ďalšie štúdie, ktoré by mohli pomôcť k popísaniu zmien na úrovni génov a proteínov v nádorových bunkách s rôznym histopatologickým pôvodom.

7 Záver

V rámci tejto bakalárskej práce bolo pripravených a identifikovaných 20 aminokyselinových derivátov BR s hydroxylovými skupinami na C-2 a C-3 v polohe α alebo β . Na prípravu týchto derivátov boli použité alanín, valín, fenylalanín, leucín a metionín v konfigurácii L a D. Bol pozorovaný ich vplyv na nádorové bunkové línie HeLa a K-562, a normálne ľudské fibroblasty BJ. Všetky deriváty boli pripravené v maximálnej čistote s cieľom detailného štúdia vzťahu medzi biologickou aktivitou a štruktúrou. Výraznejší inhibičný efekt bol pozorovaný u L-AK derivátov s hydroxylovými skupinami v konfigurácii α . Tieto výsledky odpovedajú teoretickým poznatkom.

Najvyšší inhibičný účinok bol pozorovaný u derivátu **14B** (Boc-L-valín, hydroxylové skupiny v konfigurácii α) na oboch nádorových líniách bez efektu na BJ. Derivát **14B** bol pripravený v oveľa čistejšej podobe ako derivát BR4848, ktorý v rámci štúdií vykazoval zaujímavú biologickú aktivitu. Za účelom detailnejšieho štúdia biologickej aktivity bol derivát **14B** modifikovaný a bol pripravený derivát **23**, ktorý má vo svojej štruktúre cez linker naviazanú fluorescenčnú značku BODIPY TR. Pomocou fluorescenčného mikroskopu bol pozorovaný jeho transport do cytosolu a jadra bunky. Porovnaním fluorescenčného signálu derivátov **23** a **MK-435**, ktorý obsahuje cez linker naviazanú fluorescenčnú značkou NBD, bolo zistené, že pre štúdium biologickej aktivity sú vhodnejšie deriváty s BODIPY TR vďaka vyššej stabilite fluorescenčného signálu. Tieto deriváty by mohli fungovať ako prekurzory protinádorových liečiv, ale je potrebné ďalšie štúdium mechanizmu ich účinku, ktorý nie je dostatočne známy a popísaný.

8 Zdroje

- Agostinelli, E., Seiler, N. (2007). Lysosomotropic compounds and spermine enzymatic oxidation products in cancer therapy (review). *International Journal of Oncology* 31, 473–484.
- Agostinelli, E., Arancia, G., Vedova, L.D., Belli, F., Marra, M., Salvi, M., Toninello, A. (2004). The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 27, 347–358.
- Bajguz, A., 2011. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants, in: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–27.
- Bajguz, A., Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology Biochemistry* 47, 1–8.
- Bajguz, A., Tretyn, A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62, 1027–1046.
- Bhat, T.A., Singh, R.P. (2008). Tumor angiogenesis – A potential target in cancer chemoprevention. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1334–1345.
- Carange, J., Longpré, F., Daoust, B., Martinoli, M.G. (2011). 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP⁺-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Toxicology* 13.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6, 389–395.
- Castilla V., Ramirez J., Coto CE. (2010). Plant and animal steroids a new hope to search for antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry* 17, 1858–1873.
- Dutertre, M., Smith, C.L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 431–437.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285, 1182–1186.
- Folkman, J. (1984). What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Laboratory Investigation* 51, 601–604.
- Franěk, F., Eckschlager, T., Kohout, L. (2003). 24-Epibrassinolide at Subnanomolar Concentrations Modulates Growth and Production Characteristics of a Mouse Hybridoma. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 68, 2190–2200.
- Fujioka, S., Sakurai, A. (1997). Brassinosteroids. *Natural Product Reports* 14, 1–10.
- Gleave, M., Goldenberg, S.L., Bruchovsky, N., Rennie, P. (1998). Intermittent androgen

- suppression for prostate cancer: rationale and clinical experience. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 1, 289–296.
- Golovkova, T.A., Kozlov, D.V., Neckers, D.C. (2005). Synthesis and Properties of Novel Fluorescent Switches. *Journal of Organic Chemistry* 70, 5545–5549.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen Jr, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., Cook Jr, J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216.
- Haubrick, L.L., Assmann, S.M. (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell Environ.* 29, 446–457.
- Hector, S., Tummala, R., Kisiel, N.D., Diegelman, P., Vujcic, S., Clark, K., Fakih, M., Kramer, D.L., Porter, C.W., Pendyala, L. (2008). Polyamine catabolism in colorectal cancer cells following treatment with oxaliplatin, 5-fluorouracil and N1, N11 diethylnorspermine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62, 517–527.
- Hu, Y., Bao, F., Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24, 693–701.
- Jin, Z., El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology and Therapy* 4, 139–163.
- Johnson, I.D., Kang, H.C., and Haugland, R.P. (1991). Fluorescent membrane probes incorporating dipyrrometheneboron difluoride fluorophores. *Analytical Biochemistry* 198, 228–237.
- Karolin, J., Johansson, L.B.A., Strandberg, L., Ny, T. (1994). Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 116, 7801–7806.
- Kim, I.Y., Kim, B.C., Seong, D.H., Lee, D.K., Seo, J.M., Hong, Y.J., Kim, H.T., Morton, R.A., Kim, S.J. (2002). Raloxifene, a mixed estrogen agonist/antagonist, induces apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cell lines. *Cancer Research* 62, 5365–5369.
- Klocker, H., Culig, Z., Hobisch, A., Cato, A.C.B., Bartsch, G. (1994). Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *The Prostate* 25, 266–273.
- Konopleva, M., Zhao, S., Hu, W., Jiang, S., Snell, V., Weidner, D., Jackson, C.E., Zhang, X., Champlin, R., Estey, E. (2002). The anti-apoptotic genes *Bcl-X(L)* and *Bcl-2* are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *British Journal of Haematology* 118, 521–534.
- Kovalenko, Y.D., Litvinovskaya, R.P., Veyalkina, N.N., Adamovich, A.V., Yuraga, T.M., Solovey, O.M. (2010). Study of 24-epibrasinolide toxicological properties in acute experiment. *Prob Health Eco* 5, 98–102.
- Lau, K.M., LaSpina, M., Long, J., Ho, S.M. (2000). Expression of Estrogen Receptor (ER)- α and ER- β in Normal and Malignant Prostatic Epithelial Cells: Regulation by Methylation and

- Involvement in Growth Regulation. *Cancer Research* 60, 3175–3182.
- Malíková, J., Swaczynová, J., Kolár, Z., Strnad, M. (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 69, 418–426.
- Mandava, N.B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39, 23–52.
- Marumo, S., Hattori, H., Abe, H., Nonoyama, Y., Munakata, K. (1968). The presence of novel plant growth regulators in leaves of *Distylium racemosum* Sieb et Zucc. *Agricultural and Biological Chemistry* 32, 528–529.
- Mazorra, L.M., Núñez, M., Hechavarría, M., Coll, F., Sánchez-Blanco, M.J. (2002). Influence of Brassinosteroids on Antioxidant Enzymes Activity in Tomato Under Different Temperatures. *Biologia Plantarum* 45, 593–596.
- Michelini, F.M., Ramírez, J.A., Berra, A., Galagovsky, L.R., Alché, L.E. (2004). In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids* 69, 713–720.
- Mitchell, J.W., Whitehead, M.R. (1941). Responses of vegetative parts of plants following application of extract of pollen from *Zea mays*. *Botanical Gazette* 102, 770–791.
- Mitchell, J.W., Skaggs, D.P., Anderson, W.P. (1951). Plant growth-stimulating hormones in immature bean seeds. *Science* 114, 159–161.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., Smith, M.V. (1970). Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225, 1065.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70, 461–477.
- Ni, Y., Wu, J. (2014). Far-red and near infrared BODIPY dyes: synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging. *Organic and Biomolecular Chemistry* 12, 3774–3791.
- Obakan, P., Arisan, E.D., Calcabrini, A., Agostinelli, E., Bolkent, Ş., Palavan-Unsal, N. (2014). Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines. *Amino Acids* 46, 553–564.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 1, 1286–1290.
- Ramírez, J.A., Teme Centurión, O.M., Gros, E.G., Galagovsky, L.R. (2000). Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids* 65, 329–337.
- Rárová, L., Zahler, S., Liebl, J., Kryštof, V., Sedlák, D., Bartůněk, P., Kohout, L., Strnad, M. (2012). Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids* 77, 1502–1509.
- Rárová, L., Steigerová, J., Kvasnica, M., Bartůněk, P., Křížová, K., Choudounská, H., Kolář, Z.,

- Sedlák, D., Oklestkova, J., Strnad, M. (2016). Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 159, 154–169.
- Rárová, L., Sedlák, D., Oklestkova, J., Steigerová, J., Liebl, J., Zahler, S., Bartůnek, P., Kolář, Z., Kohout, L., Kvasnica, M. (2018). The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 178, 263–271.
- Rossi, V., Bellastella, G., De Rosa, C., Abbondanza, C., Visconti, D., Maione, L., Chieffi, P., Della Ragione, F., Prezioso, D., De Bellis, A. (2011). Raloxifene induces cell death and inhibits proliferation through multiple signaling pathways in prostate cancer cells expressing different levels of estrogen receptor α and β . *Journal of Cellular Physiology* 226, 1334–1339.
- Schipper, R.G., Romijn, J.C., Cuijpers, V.M.J.I., Verhofstad, A. a. J. (2003). Polyamines and prostatic cancer. *Biochemical Society Transaction* 31, 375–380.
- Seiler, N., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28, 843–861.
- Seiler, N., Duranton, B., Raul, F. (2002). The polyamine oxidase inactivator MDL 72527. *Progress in Drug Research* 59, 1–40.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G_1 cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* 9, 1149–1163.
- Steigerová, J., Oklešťková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., Strnad, M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 188, 487–496.
- Steigerová, J., Rárová, L., Oklešťková, J., Křížová, K., Levková, M., Sváňchová, M., Kolář, Z., Strnad, M. (2012). Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50, 4068–4076.
- Su, K.-L., Liao, Y.-F., Hung, H.-C., Liu, G.-Y. (2009). Critical factors determining dimerization of human antizyme inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26768–26777.
- Takatsuto, S., Yazawa, N., Ikekawa, N., Morishita, T., Abe, H. (1983). Synthesis of (24R)-28-homobrassinolide analogues and structure-activity relationships of brassinosteroids in the rice-lamina inclination test. *Phytochemistry* 22, 1393–1397.
- Treibs, A., Kreuzer, F.H. (1968). Difluorboryl-Komplexe von Di- und tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 718, 208–223.
- Vega-Avila, E., Pugsley, M.K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54, 10–14.
- Valeur, B., Berberan-Santos, M.N. (2011). A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* 88, 731–738.

- Veselý, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S. (1994). Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of Biochemistry* 224, 771–786.
- Voitovich, A.M., Nadzharian, L.A., Kotelenets, A.I., Afonin, V.I., Davydovskii, A.G., Ushkov, A.A. (2004). Estimation of potential mutagenic activity of 24- epibrassinolide. *Tsitol Genetics* 38, 49–53.
- Wachsman, M.B., Ramirez, J.A., Galagovsky, L.R., Coto, C.E. (2002). Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13, 61–66.
- Wachsman, M.B., Castilla, V., Talarico, L.B., Ramirez, J.A., Galagovsky, L.R., Coto, C.E. (2004). Antiherpetic mode of action of (22S,23S)-3beta-bromo-5alpha,22,23-trihydroxystigmastan-6-one in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 524–526.
- Weijer, C.J. (2003). Visualizing signals moving in cells. *Science* 300, 96–100.
- Weisburger, J.H. (1998). Worldwide prevention of cancer and other chronic diseases based on knowledge of mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402, 331–337.
- Yokota, T., Arima, M., Takahashi, N. (1982). Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters* 23, 1275–1278.