

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



**Příprava biologicky degradabilních esterů
kyseliny dihydrobetulinové s protinádorovými
účinky**

Jana Krasulová

Bakalářská práce

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Tato bakalářská práce byla vypracována na Katedře jaderné a organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006-2007 pod vedením RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
ÚVOD.....	5
TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1. Současný stav studované problematiky.....	7
1.1 Lupanové triterpenoidy s protinádorovou aktivitou.....	7
1.2 Biologicky štěpitelné estery kyseliny betulínové (III) a dihydrobetulinové (V).....	12
2. Příprava výchozích sloučenin.....	16
2.1 Triterpeny.....	16
2.2 Sacharidová činidla XLIV, XLVII.....	17
3. Příprava hydrofil. biolog. degradab. esterů kys. dihydrobetulinové (1a).....	18
3.1 Estery 2-methoxyethan-1-olu 1b a 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu 1c.....	18
3.2 Sacharidové estery 1d, 1e	19
4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin.....	22
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
TABULKA ¹³ C NMR SPEKTER.....	30
ZÁVĚR.....	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Acm	acetoxymethyl
Ac ₄ GAL-Br	(2,3,4,6-tetraacetyl)- α -D-galaktopyranosylbromid
Ac ₄ GLC-Br	(2,3,4,6-tetraacetyl)- α -D-glukopyranosylbromid
DBU	1,8-diazabicyklo [5,4,0] undec-7-en
DMAP	4-(<i>N, N</i> -dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamid
Et	ethyl
Glc	1- β -D-glukopyranosyl
Me	methyl
MeCN	acetonitril
Ph	fenyl
Pht	ftaloyl
Py	pyridin
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -buthanol
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TsOH	4-toluensulfonová kys.
Z	benzyloxykarbonyl

Poznámka k číslování

V této práci budou použity dva typy číslování sloučenin. Sloučeniny nepřipravované v této práci budou označeny číslicemi římskými, výchozí triterpenická sloučenina a sloučeniny nové nebo již v literatuře popsané, které jsou připravovány v rámci této práce, budou označeny číslicemi arabskými.

ÚVOD

V současné době jsou jednou z nejčastějších příčin předčasného úmrtí maligní nádorová onemocnění. Ze statistik vyplývá, že každý čtvrtý jedinec v naší republice v průběhu života onemocní zhoubným nádorem¹. Proto probíhá intenzivní výzkum cytostatik, která by měla vysokou účinnost, nízkou toxicitu a byla snadno dostupná. Většina komerčně využívaných cytostatik jsou látky přírodního původu. Příkladem jsou hojně užívané rostlinné alkaloidy² vinkristin a vinblastin z barvínku červeného, paklitaxel z tisů nebo etoposid a teniposid z kořene mandragory.

Na našem pracovišti již několik let probíhá systematický výzkum přírodních pentacyklických triterpenoidů, u nichž byly prokázány nejen účinky cytostatické, ale i protizánětlivé, hepatoprotektivní, analgetické, antimikrobiální, virostatické a mnohé další.³ Kyselina betulinová, která se získává například z kůry platanu (*Platanus hispanica*⁴, *Platanus acerifolius*⁵), vykazuje⁵ protinádorovou aktivitu vůči neuroektodermálním nádorům (maligní melanom, malobuněčné nádory plic, neuroblastom, Ewingův sarkom a další). Chemickou modifikací kyseliny betulinové byly získány sloučeniny s vyššími aktivitami, a tudíž lepšími terapeutickými možnostmi. Nejúčinnější deriváty odvozené od lupanového, des-E-lupanového a 18 α -oleanového skeletu, tzv. betuliny⁶ mají cytotoxickou aktivitu $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ a jsou účinné vůči mnoha nádorovým liniím. Mezi sloučeniny s významnou cytotoxicitou patří i některé deriváty kyseliny dihydrobetulinové.

Cíle této práce:

1. Provést literární rešerši přípravy biologicky degradabilních esterů kyseliny betulinové a dihydrobetulinové.
2. Připravit biologicky odbouratelné (2-methoxyethan-1-olu, 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu a sacharidové) estery kyseliny dihydrobetulinové pro testování cytotoxicity.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Současný stav studované problematiky

1.1 Lupanové triterpenoidy s protinádorovou aktivitou

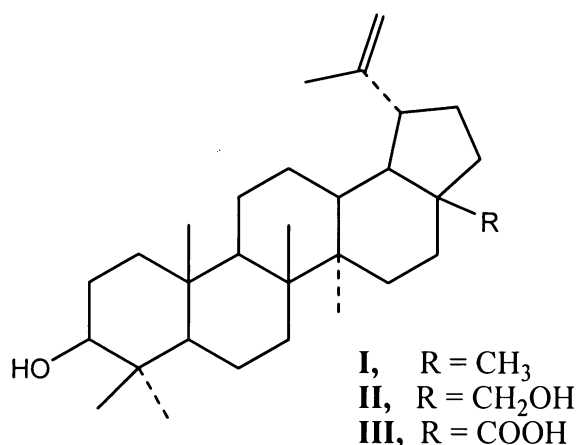
Skupina cyklických triterpenoidů, které byly dosud izolovány, zahrnuje více než 4000 různých látek³ jedinečných svými biologickými účinky. Za účelem nalezení látek s optimálními farmakologickými vlastnostmi probíhá vývoj synteticky modifikovaných derivátů.

Lupanové triterpenoidy patří mezi biologicky nejvýznamější triterpenoidní struktury. Do této skupiny patří např. lupeol (**I**), betulin (**II**), kyselina betulinová (**III**) a jejich deriváty.

Lupeol³ (**I**) se vyskytuje v mnoha ovocných plodech a léčivých rostlinách, má chemopreventivní a antiangiogenní účinky a působí jako antioxidant.

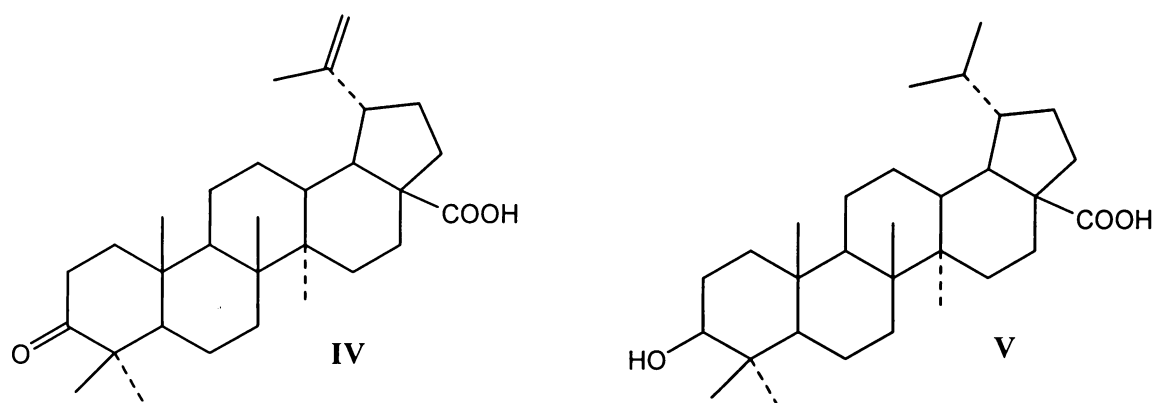
Betulin⁵ (**II**) je obsažen až ze 30 % ve vnějších vrstvách březové kůry⁷ (*Betula pendula*), nemá významnou cytotoxickou aktivitu, ale jeho deriváty vzniklé chemickou modifikací hydroxylových skupin v poloze C-3 a C-28 vykazují protinádorové účinky.

Kyselinu betulinovou (**III**) lze v omezeném množství izolovat z různých rostlin, například z kůry platanu (*Platanus Hispanica*⁴, *Platanus acerifolius*⁵), nebo připravit⁸ ve dvou krocích z betulinu (**II**). Příprava⁷ z betulinu (**II**) je ale komplikovaná, vzhledem k tvorbě směsi produktů. Kyselina **III** má nejen účinky cytotoxické, ale i protizánětlivé, antivirové⁹ a anti-HIV¹⁰. V roce 1991 byla publikována první práce¹¹ popisující cytotoxické účinky kyseliny betulinové (**III**). Do té doby byly známy pouze protinádorové účinky směsí obsahujících kyselinu **III**. V další práci¹² jsou již popsány cytotoxické účinky kyseliny **III** na buněčných liniích lidského melanomu. Zároveň nebyla pozorována ani akutní ani chronická toxicita v dávce až 500 mg/kg. Kyselina betulinová (**III**) v buňkách indukuje spuštění apoptózy^{8,13}. V práci⁹ jsou popisovány účinky kyseliny **III** i proti dalším buněčným liniím (ovariální karcinom, malobuněčné a nemalobuněčné nádory plic). Zároveň je kyselina **III** srovnávána s běžným protinádorovým lékem doxorubicinem. V tomto srovnání kyselina **III** vykazovala řádově nižší toxicitu vůči nenádorovým buňkám.

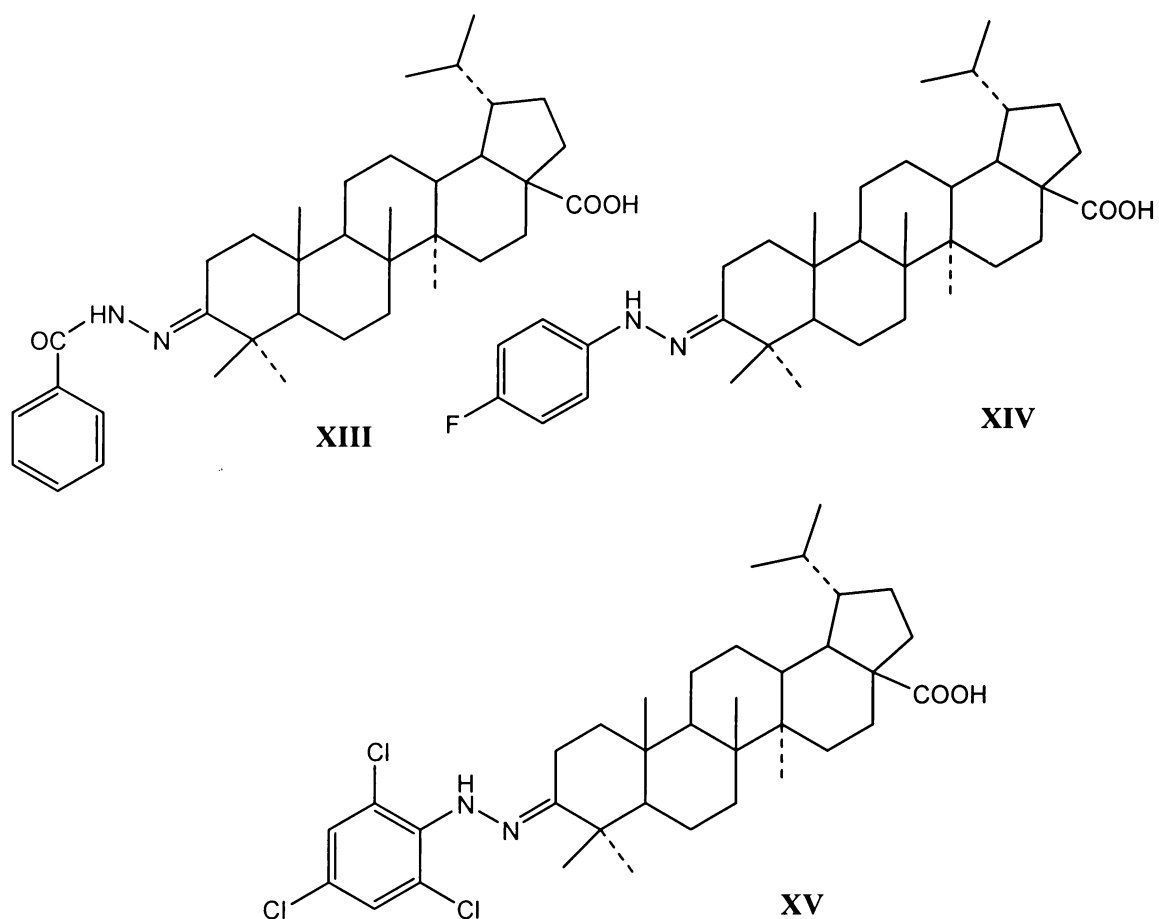
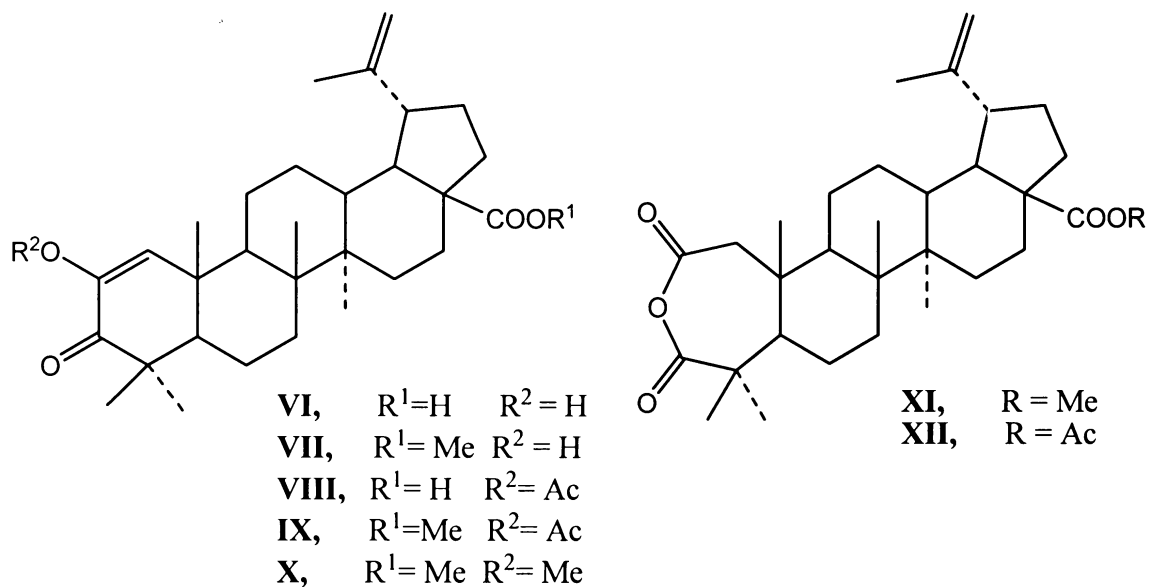


S cílem zvýšit cytotoxicitu a také optimalizovat farmakologické vlastnosti probíhá syntéza derivátů kyseliny betulinové (**III**). Kyselinu **III** lze chemicky modifikovat¹³ v polohách C-3, C-20 a C-28.

Oxidací 3 β -hydroxyskupiny kyseliny **III** lze získat¹⁴ kyselinu betulonovou (**IV**), která má cytotoxickou aktivitu 4 - 6x vyšší, a hydrogenací dvojně vazby, kyselinu dihydrobetulinovou (**V**), která má vyšší cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím ovariálního karcinomu a karcinomu děložního krčku.

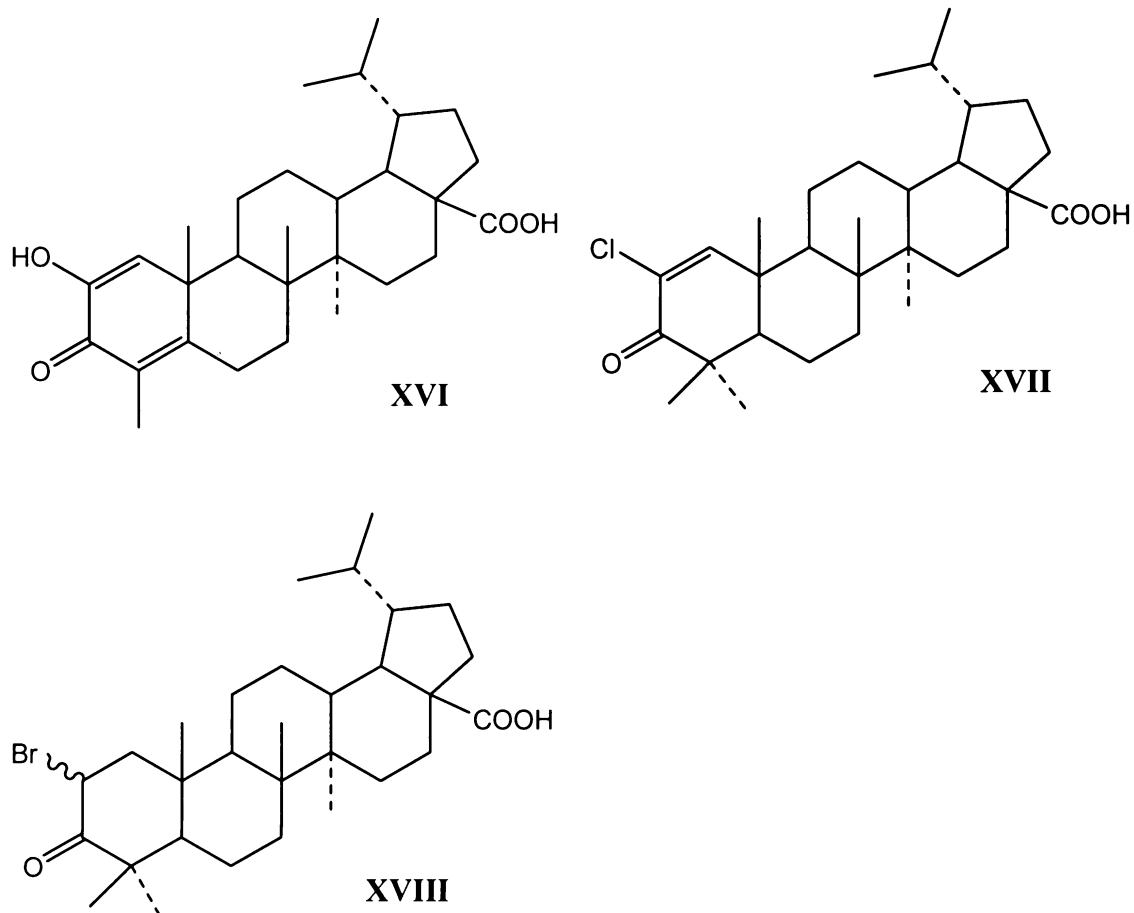


Skupiny derivátů, které jsou aktivní vůči mnoha nádorovým liniím a vykazují vyšší cytotoxickou aktivitu než samotná kyselina betulonová (**III**), jsou diosfenoly^{8,14} **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X** snadno štěpitelné anhydridy^{r,m} **XI**, **XII** a hydrazony^{8,15} **XIII**, **XIV**, **XV**.

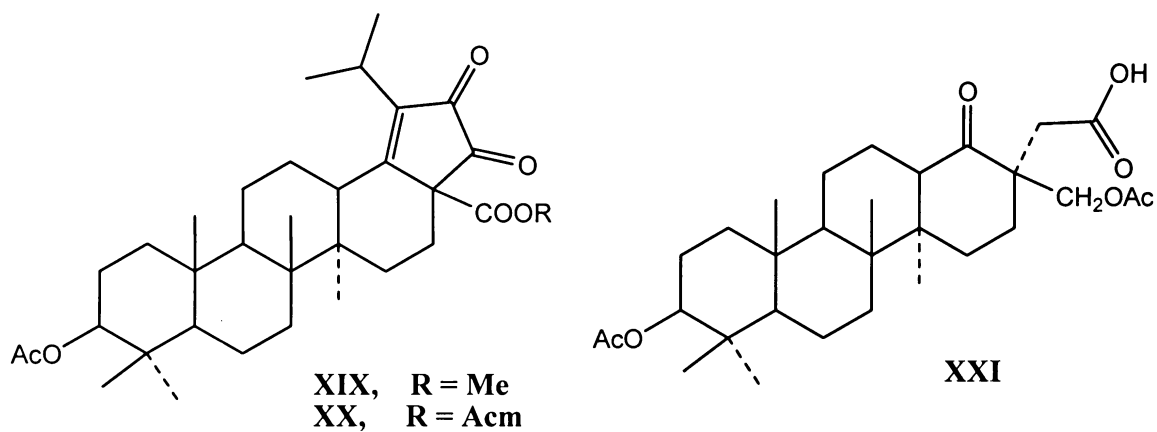


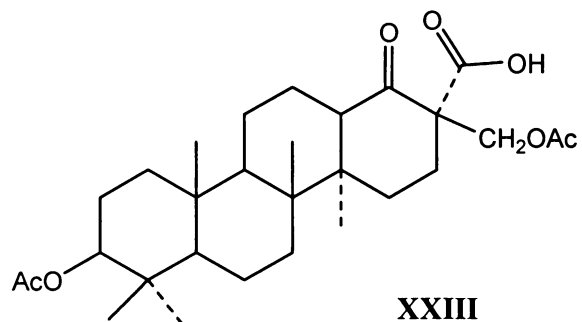
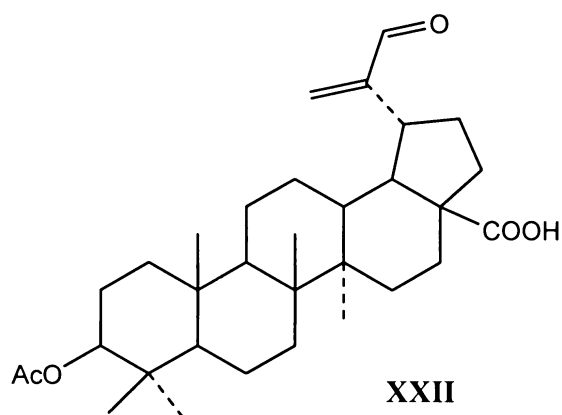
Další deriváty kyseliny dihydrobetulinové (V), které vznikly také modifikací A-kruhu⁸ a vyznačují se vysokou cytotoxicitou jsou **XVI** vykazující silnou aktivitu vůči nádorové linii ovariálního karcinomu, **XVII** s aktivitou vůči buněčným nádorovým

liniím melanomu a plic, bromderivát **XVIII**¹⁵, který vykazuje aktivitu vůči nádorovým buňkám T-lymfoblastické leukemie.

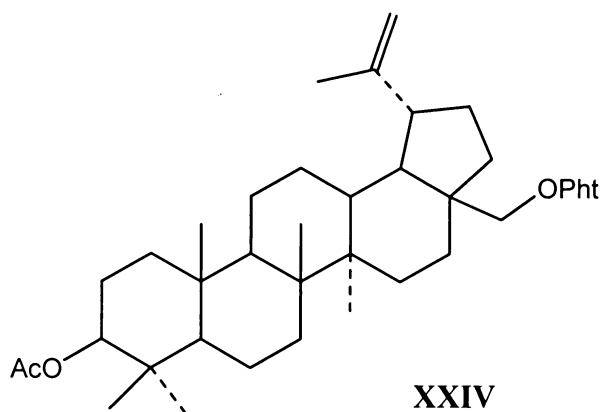


Také modifikací E-kruhu lze získat deriváty⁶ se zajímavými aktivitami-diketony **XIX**, **XX**, kyselinu **XXI**, aldehyd **XXII**. Velmi významným derivátem je β -ketokyselina **XXIII**, která je nejúčinnější sloučeninou odvozenou od des-E-lupanového skeletu.





Bylo zjištěno, že i derivatizace hydroxyskupiny betulinu (**II**) a kyseliny betulinové (**III**) ftalanhydridem⁵ vede ke zvýšení cytotoxicity. Příkladem je hemiftalát **XXIV**. Hemiftaláty jsou vysoce polární sloučeniny, což zlepšuje jejich rozpustnost v médiích založených na vodné bázi. Navíc je možné užití různě substituovaných ftalanhydridů.



1.2 Biologicky štěpitelné estery kyseliny betulinové a dihydrobetulinové

Špatná rozpustnost ve fyziologických podmínkách a obtížná purifikovatelnost volných kyselin je důvodem pro přípravu derivátů. Vhodným typem derivatizace triterpenoidních kyselin se ukázala esterifikace karboxylové skupiny v poloze C-28. Alkyl estery jsou obtížně štěpitelné v organismu, proto je předmětem výzkumu triterpenoidů nalezení nových typů esterů, které by byly snadno připravitelné, stabilní a zároveň biologicky degradabilní.

V práci^{4,6} byly porovnávány aktivity methyl-esterů, pivaloyloxymethyl-esterů (Pom-) a acetoxymethyl-esterů (Acm-) s aktivitami volných kyselin. Pouze u Acm-esterů byla nalezena zajímavá cytotoxická aktivita. Acm-ester **XXV** byl připraven⁴ reakcí kyseliny betulinové (**III**) a Acm-Br v přítomnosti DBU ve výtěžku 75 % (schéma 1) a vykazoval dokonce aktivitu vyšší než měla původní kyselina **III**. V případě esteru **XXVI** a Acm-esterů enolacetátu **XXVII** a aldehydu **XXVIII** byly naměřeny aktivity srovnatelné s původní kyselinou.

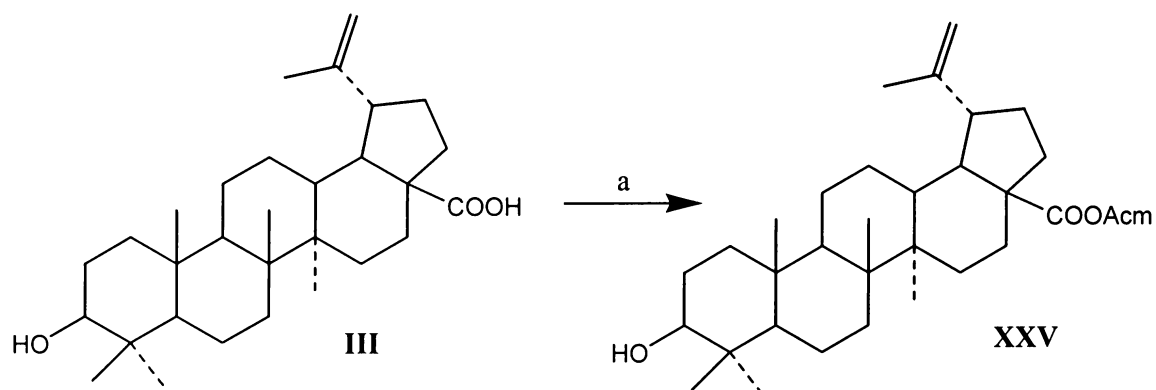
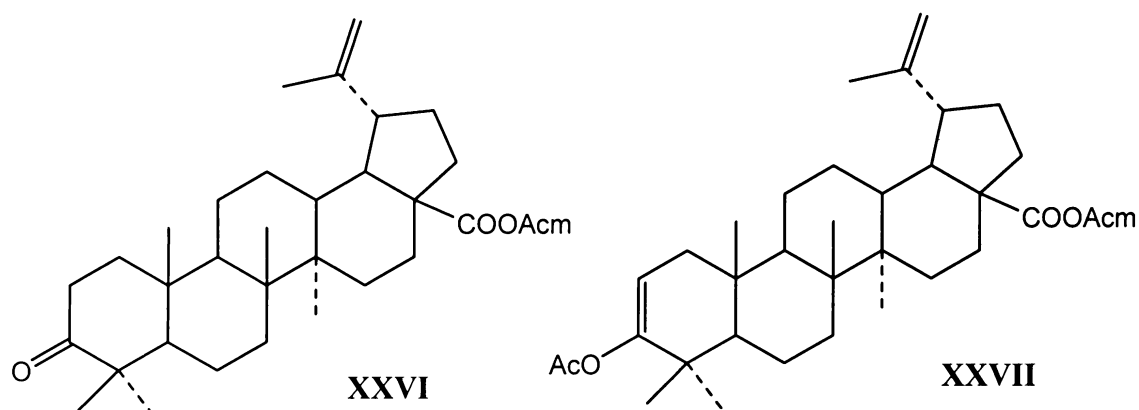
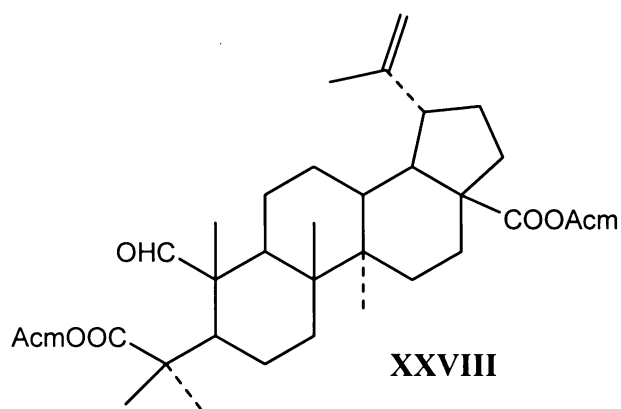


Schéma 1: a: AcmBr, DBU / CH₂Cl₂, MeCN





Skupinou esterů s potenciálně zajímavými biologickými aktivitami jsou estery sacharidové. Sacharidové estery¹⁶ mnoha triterpenoidů a steroidů jsou pro organismus lépe biologicky dostupné než výchozí necukerné složky. Práce¹⁶ z roku 2003 se zaměřuje na nalezení jednoduchého způsobu přípravy sacharidových esterů triterpenoidů, který by umožnil přísun ve větším měřítku pro testování biologických aktivit. Reakcí kyseliny betulinové (**III**) s 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glukopyranosylbromidem a Ag_2O v pyridinu¹⁶ nebo modifikovaným způsobem¹⁷ s K_2CO_3 ve směsi acetonu a acetonitrilu byl získán glukopyranosyl-ester **XXIX** ve výtěžku nad 60 %, který byl následně deacetylován reakcí s methanolátem sodným v methanolu za vzniku esteru **XXX** (schéma 2).

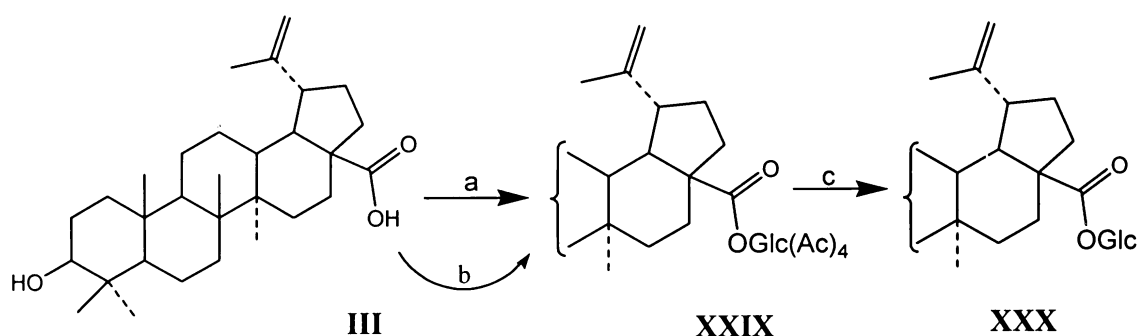


Schéma 2: a: $\text{Ac}_4\text{GLC-Br}$, Ag_2O / Py; b: $\text{Ac}_4\text{GLC-Br}$, K_2CO_3 / MeCN, aceton; c: MeONa / MeOH

V publikaci¹⁸ byly připraveny anhydridy **XXXI**, **XXXII** reakcí kyseliny betulinové (**III**) a dihydrobetulinové (**V**) s akryloylchloridem v přítomnosti hydridu sodného v DMF (schéma 3). Sloučeniny **XXXI** a **XXXII** mají antiangiogenní účinky a jejich aktivita $\text{IC}_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$.

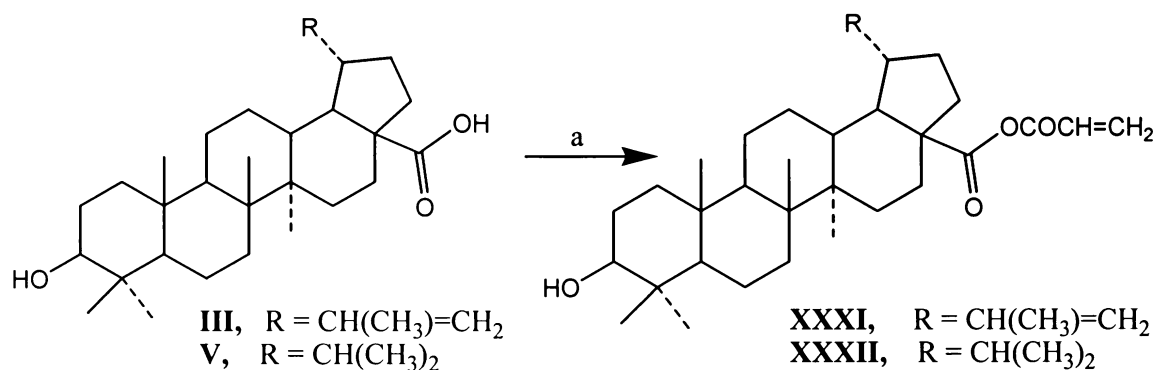


Schéma 3: a: CH₂=CHCOCl, NaH / DMF

K významnému zvýšení biologické aktivity došlo i u některých hemifitalátů, příkladem je ethyl-ester hemifitalátu **XXXIII**, který se připravuje⁵ reakcí ethyl-esteru **XXXIV** s ftalanhydridem a DMAP v pyridinu ve výtěžcích přes 70 % (schéma 4).

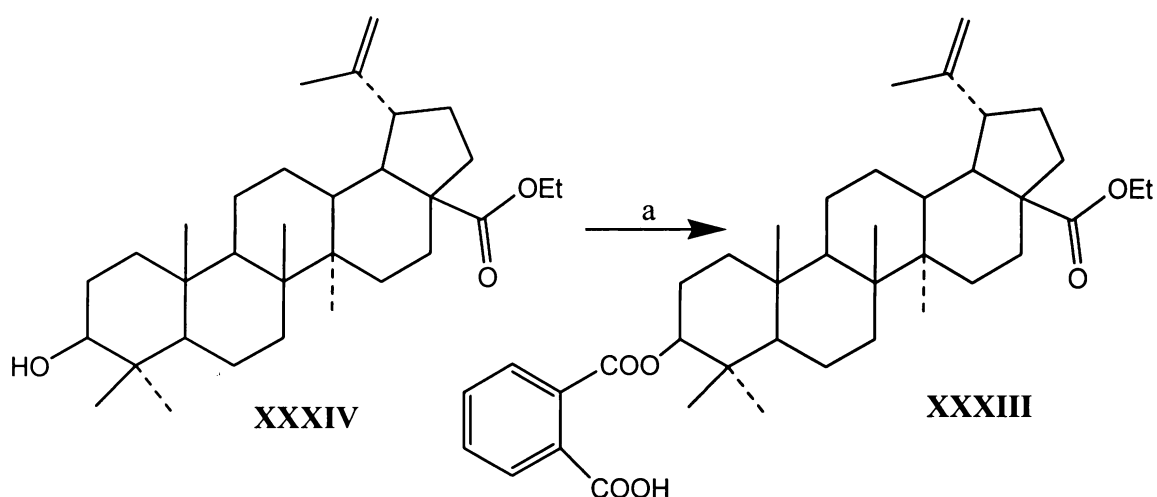


Schéma 4: a: ftalanhydrid / DMAP / Py

Práce¹⁹ se zabývá methoxyethyl-estery peptidů a glykopeptidů. Tyto estery jsou rozpustné ve vodných rozpouštědlech, snadno purifikovatelné a většina z nich snadno krystalizuje. Další výhodou esterů methoxyethan-1-olu a 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu je jejich stabilita při reakcích na peptidickém skeletu. Příkladem je stabilita methoxyethylové skupiny při hydrolýze bis(2'-methoxyethyl)-esteru kys. asparagové **XXXVII**, která zůstává při pH 7, teplotě 37 °C nedotčena po dobu 1 h (schéma 5). Díky těmto vlastnostem je předmětem zájmu také příprava tohoto typu esterů triterpenoidních kyselin. Na triterpenoidech zatím tento typ esterů popsán není a je proto výzvou syntetických pracovišť je připravit a prozkoumat jejich vlastnosti.

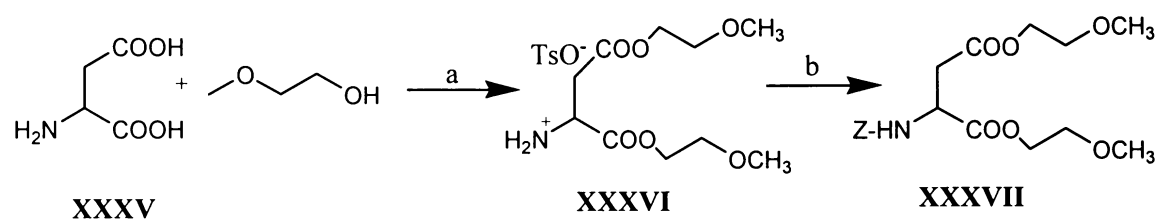


Schéma 5: a: TsOH / toluen, reflux; b: Z-Cl / NEt₃

2. Příprava výchozích sloučenin

2.1 Triterpeny

Výchozí sloučeninou pro přípravu všech esterů této práce byla kyselina dihydrobetulinová (**1a**). Kyselinu dihydrobetulinovou (**1a**) lze připravit z betulinu (**II**), který se izoluje extrakcí ze svrchních vrstev březové kůry ethanolem. Betulin (**II**) je následně acetylován acetanhydridem v pyridinu za vzniku betulin-diacetátu (**XXXVIII**), z něhož parciální hydrolýzou hydroxidem draselným vzniká betulin-monoacetát **XXXIX**, který je dále hydrogenován na dihydrobetulin-monoacetát **XL**, oxidován na kyselinu acetyl-dihydrobetulinovou **XLI** a následně hydrolyzován za vzniku⁷ kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) (schéma 6).

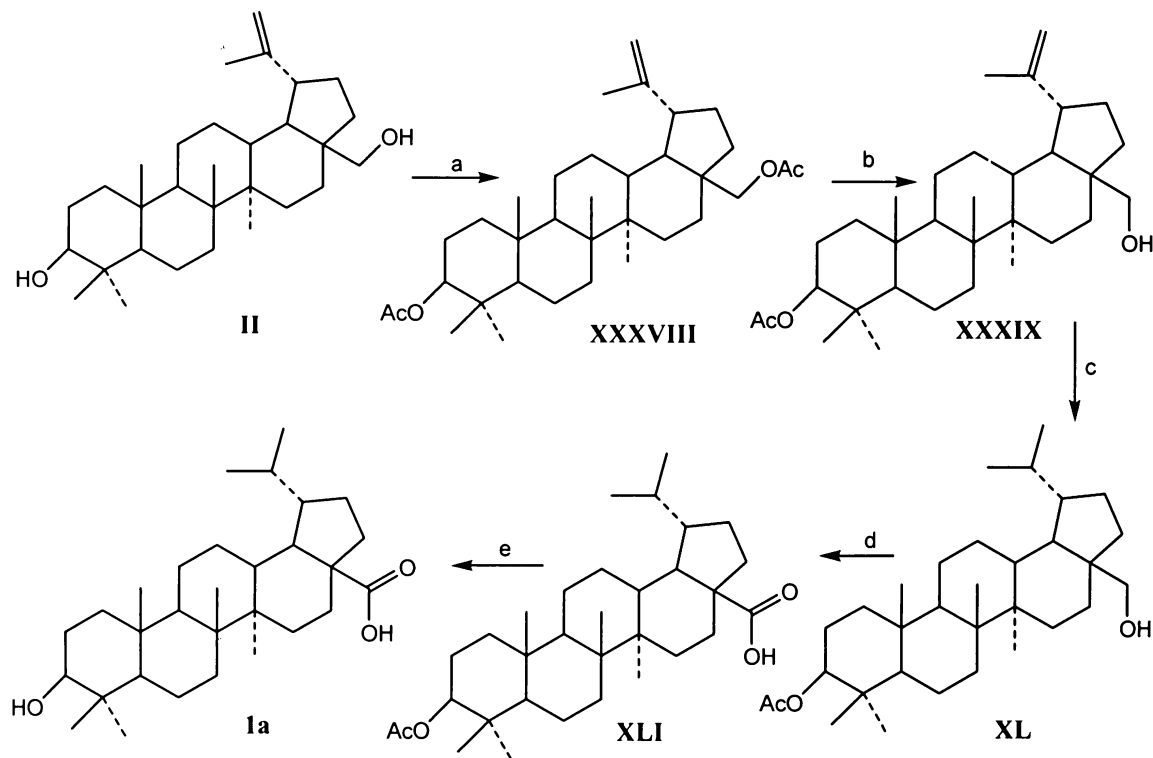


Schéma 6: a: Ac_2O , Py / $100\text{ }^\circ\text{C}$; b: KOH / PhMe , EtOH ; c: H_2 , Ra-Ni / THF ;
d: Ru_2O , NaIO_4 / EtOAc , H_2O ; e: KOH / methoxyethanol (reflux)

2.2 Sacharidová činidla XLIV, XLVII

Acetylací D-galaktosy (XLII) acetanhydridem v přítomnosti kyseliny chloristé vzniká 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosa (XLIII). Následnou reakcí s bromovodíkem za chlazení vzniká²⁰ 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-galaktopyranosylbromid (XLIV). Analogickým sledem reakcí se z D-glukosy (XLV) připravuje 2,3,4,6-tetraacetyl- α -D-glukopyranosylbromid (XLVII) (schéma 7).

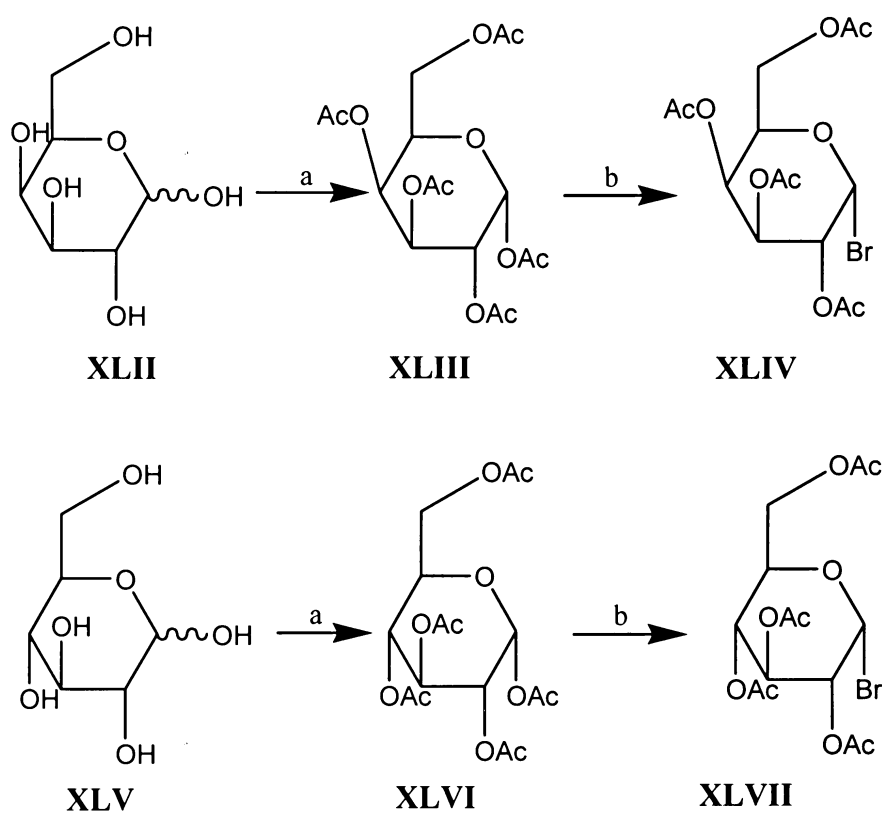


Schéma 7: a: HClO₄ / acetanhydrid; b: HBr / AcOH (chlazení)

3. Příprava hydrofilních biologicky degradabilních esterů kyseliny dihydrobetulinové (**1a**)

3.1 Estery 2-methoxyethan-1-olu a 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu **1b,1c**

Je známo¹⁹, že estery 2-methoxyethan-1-olu a 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu jsou díky své hydrofilní povaze rozpustné v polárních rozpouštědlech a mohly by být výhodným typem derivatizace triterpenických kyselin pro *in vivo* testování.

Estery **1b** a **1c** byly připraveny¹⁷ reakcí kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) s komerčně dostupným 2-brom-1-methoxyethanem resp. 1-(2'-methoxyethoxy)-2-bromethanem (schéma 8) v přítomnosti DBU jako báze. Během reakcí, zpracování ani čištění se nevyskytly žádné komplikace, výtěžky byly 40 - 50 %.

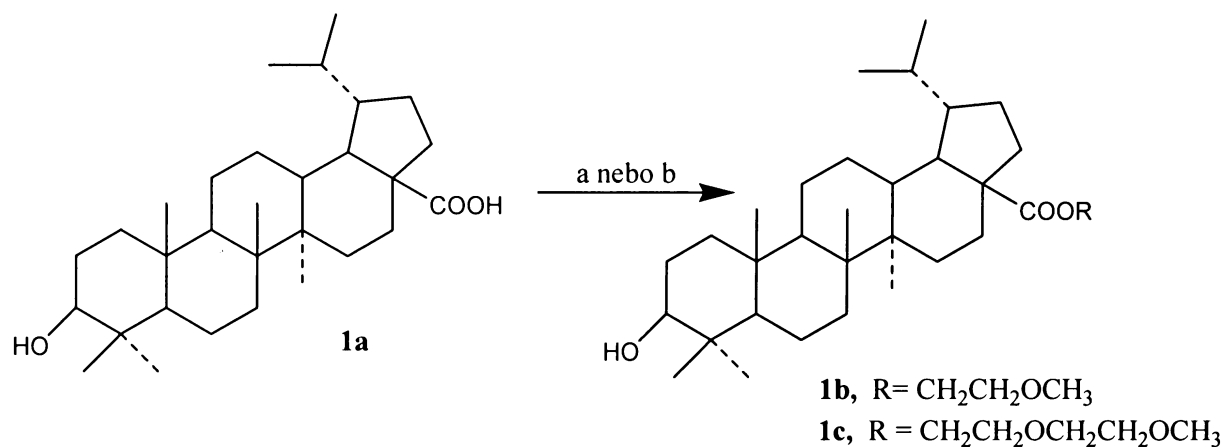


Schéma 8: a: CH₃OCH₂CH₂Br, DBU / CH₂Cl₂, MeCN
b: CH₃OCH₂CH₂OCH₂CH₂Br, DBU / CH₂Cl₂, MeCN

Identifikace připravených esterů **1b**, **1c** byla provedena na základě spektrálních dat. V ¹H NMR spektru esteru **1b** byl nalezen kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen také multiplet dvou vodíků H-1' při δ ~ 4.2 ppm, triplet dvou vodíků H-2' při δ ~ 3.6 ppm s interakční konstantou J ~ 4.5 Hz a singlet tří vodíků H-3' při δ ~ 3.4 ppm. V ¹³C NMR spektru esteru **1b** byly nalezeny kromě signálů výchozího triterpenu také signály uhlíku C-1' při δ ~ 71 ppm, uhlíku C-2'

při $\delta \sim 63$ ppm a uhlíku C-3' při $\delta \sim 59$ ppm. IČ spektrum obsahovalo pás charakteristický pro esterovou skupinu při 1693 cm^{-1} a pás typický pro hydroxyskupinu při 3531 cm^{-1} . V MS EI byl nalezen molekulový iont a dále ionty odpovídající ztrátám molekuly vody, oxidu uhličitého, methylového radikálu, dále ztrátě 103 hmotnostních jednotek ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^\bullet$).

V ^1H NMR esteru **1c** byl nalezen kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen také multiplet dvou vodíků H-1' při $\delta \sim 4.2$ ppm, triplet dvou vodíků H-2' při $\delta \sim 3.7$ ppm s interakční konstantou $J \sim 5.1$ Hz, multiplet dvou vodíků H-3' při $\delta \sim 3.6$ ppm, multiplet dvou vodíků H-4' při $\delta \sim 3.5$ ppm a singlet tří vodíků H-5' při $\delta \sim 3.4$ ppm. V ^{13}C NMR esteru **1c** byl kromě signálů výchozího triterpenu nalezen také signál uhlíku C-1' při $\delta \sim 63$ ppm, uhlíku C-2' při $\delta \sim 69$ ppm, uhlíku C-3' při $\delta \sim 70$ ppm, uhlíku C-4' při $\delta \sim 72$ ppm a uhlíku C-5' při $\delta \sim 59$ ppm. IČ spektrum obsahovalo pás charakteristický pro esterovou skupinu při 1685 cm^{-1} a pás typický pro hydroxylovou skupinu při 3531 cm^{-1} . V MS EI byly nalezeny analogické fragmentace jako v případě esteru **1b** a dále iont odpovídající ztrátě 147 hmotnostních jednotek ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^\bullet$).

3.2. Sacharidové estery **1d**, **1e**

Vzhledem k zajímavým biologickým aktivitám a dobré biologické dostupnosti sacharidových esterů triterpenických kyselin¹⁶ byly v rámci této práce připraveny z kyseliny **1a** tetra-*O*-acetylglykopyranosyl-estery **1d**, **1e**.

Tetra-*O*-acetylované sacharidové estery **1d**, **1e** byly připraveny modifikovaným postupem dle práce¹⁷ a to reakcí kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) s $\text{Ac}_4\text{GAL-Br}$ **XLIV** a $\text{Ac}_4\text{GLC-Br}$ **XLVII** (schéma 9) ve směsi acetonu a acetonitrilu v přítomnosti uhličitanu draselného jako báze. Výtěžek galaktopyranosyl-esteru **1d** byl 20 % a glukopyranosyl-esteru **1e** méně než 4 %, což je pravděpodobně způsobeno velice špatnou rozpustností kyseliny **1a** ve většině organických rozpouštědel. Při reakci docházelo k tvorbě „gelu“, který ztěžoval následné zpracování i čištění. Ani modifikací reakčních podmínek, přidáním dalších rozpouštědel či prodloužením reakční doby, se nepodařilo získat významně lepší výtěžky.

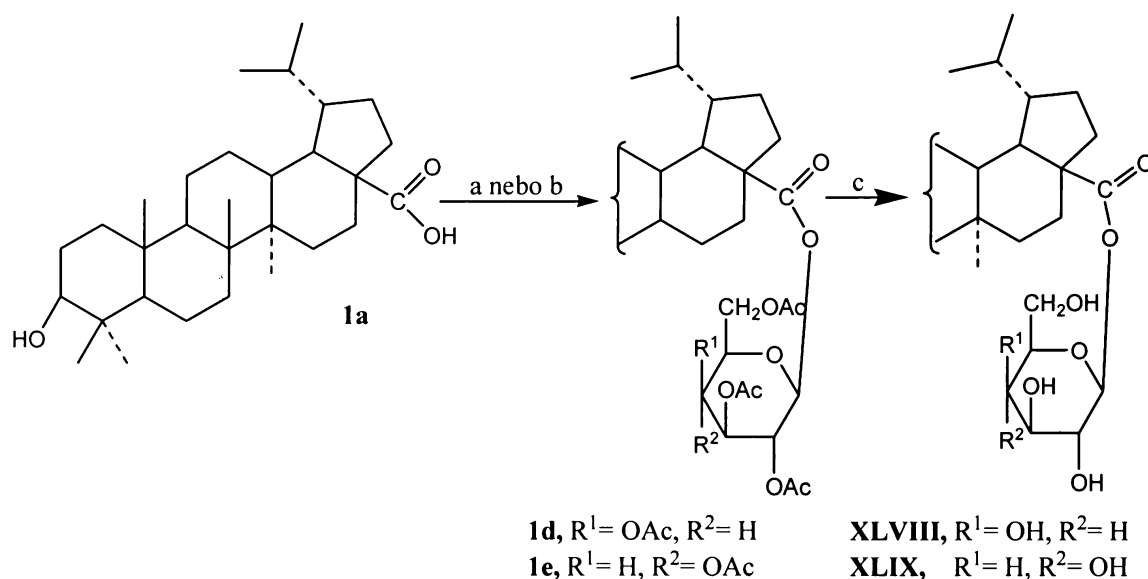


Schéma 9: a: Ac₄GAL-Br, K₂CO₃ / MeCN, aceton
 b: Ac₄GLC-Br, K₂CO₃ / MeCN, aceton
 c: MeONa / MeOH

Připravený tetraacetylovaný sacharidový ester **1d** byl charakterizován na základě spektrálních dat a ester **1e** též na základě shody spektrálních dat s autentickým preparátem¹⁶.

V ¹H NMR spektru galaktopyranosyl-esteru **1d** se kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen nacházel také multiplet tří vodíků H-5', H-6'a a H-6'b při δ ~ 4.1 ppm, dublet dubletu jednoho vodíku H-3' při δ ~ 5.1 ppm s interakčními konstantami J₁ ~ 10.5 Hz a J₂ ~ 3.3 Hz, dublet dubletu jednoho vodíku H-2' při δ ~ 5.4 ppm s interakčními konstantami J₁ ~ 10.5 Hz a J₂ ~ 8.4 Hz, dublet jednoho vodíku H-4' při δ ~ 5.4 ppm s interakční konstantou J ~ 3.3 Hz a dublet vodíku H-1' při δ ~ 5.6 ppm s interakční konstantou J ~ 8.4 Hz. V ¹³C NMR spektru esteru **1d** byl kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen nalezen také signál uhlíku C-1' při δ ~ 91 ppm, C-2' při δ ~ 71 ppm, C-3' při δ ~ 71 ppm, C-4' při δ ~ 68 ppm, C-5' při δ ~ 67 ppm a C-6' při δ ~ 61 ppm. IČ spektrum obsahovalo pás charakteristický pro esterovou skupinu při 1753 cm⁻¹ a pás typický pro hydroxylovou skupinu při 3557 cm⁻¹. V MS ESI byl nalezen iont [M + Na]⁺.

V ¹H NMR spektru glukopyranosyl-esteru **1e** byl nalezen kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen také multiplet jednoho vodíku H-5' při δ ~ 3.8 ppm, dublet dubletu jednoho vodíku H-6'a při δ ~ 4.1 ppm s interakčními konstantami J₁ ~ 12.6 Hz a J₂ ~ 2.4 Hz, dublet dubletu jednoho vodíku H-6'b při δ ~ 4.3 ppm s interakčními konstantami J₁ ~ 12.3 Hz a J₂ ~ 4.5 Hz; multiplet tří

vodíků H-3', H-2', H-4' při $\delta \sim 5.2$ ppm a dublet jednoho vodíku H-1' při $\delta \sim 5.7$ ppm s interakční konstantou $J \sim 8.1$ Hz. V ^{13}C NMR spektru esteru **1e** byl nalezen kromě signálů charakteristických pro výchozí triterpen také signál uhlíku C-1' při $\delta \sim 91$ ppm, C-2' při $\delta \sim 70$ ppm, C-3' při $\delta \sim 72$ ppm, C-4' při $\delta \sim 68$ ppm, C-5' při $\delta \sim 73$ ppm a C-6' při $\delta \sim 62$ ppm. IČ spektrum obsahovalo pás charakteristický pro esterovou skupinu při 1755 cm^{-1} a pás typický pro hydroxylovou skupinu při 3585 cm^{-1} . V MS ESI byl nalezen iont $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Vzhledem k časové tísní práce nebyly provedeny závěrečné deacetylace sacharidových esterů **1d**, **1e**. Nicméně v literatuře¹⁶ je popsána příprava deacetylovaných glukopyranosyl-esterů kyseliny betulinové (**III**) a dihydrobetulinové (**1a**) reakcí příslušných tetraacetylovaných esterů s methanolátem sodným v methanolu. V práci¹⁷ je touto metodou připraven glukopyranosyl-ester **XXX** ve výtěžku přes 80 %, proto by měly být analogickým postupem připravené i deacetylované estery **XLVIII**, **XLIX** (schéma 9).

4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Celkem byly na *in vitro* cytotoxickou aktivitu metodou MTT-testu²¹ na nádorové linii CEM (T-lymfoblastická leukémie) testovány 4 sloučeniny. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Cytotoxickou aktivitu charakterizuje index IC_{50} , který představuje minimální koncentraci testované sloučeniny (v $\mu\text{mol/l}$) usmrcující právě 50 % nádorových buněk. Sloučenina se považuje za aktivní, pokud je její $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$. Derivát, jehož $IC_{50} = 250 \mu\text{mol/l}$, je považován za zcela neúčinný.

Ester **1b** vykazoval aktivitu $IC_{50} = 17 \mu\text{mol/l}$, což znamená pokles cytotoxicity oproti výchozí kyselině **1a** ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol/l}$)¹⁷, ester **1c** byl zcela neúčinný ($IC_{50} = 250 \mu\text{mol/l}$).

U tetraacetylovaných sacharidových esterů **1d**, **1e** byly naměřeny významné aktivity ($IC_{50} = 9 \mu\text{mol/l}$, $IC_{50} = 7 \mu\text{mol/l}$) srovnatelné s původní kyselinou **1a**.

Sloučenina	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]
	CEM
1a	7
1b	17
1c	250
1d	9
1e	7

Tabulka 1: *In vitro* cytotoxické aktivity sloučenin připravených v rámci této práce testovaných na buněčné linii CEM.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obecné poznámky k experimentální části

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 a jsou korigovány. Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotkách [10^{-1} Deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$], koncentrace, c [g/100 ml] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IČ spektra byla měřena v chloroformu na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS – 300 (^1H při 299.95 MHz, ^{13}C při 100.58 MHz) v roztoku v CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$ ppm. Multiplicita signálů v ^{13}C NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů (δ stupnice) a interakčních konstant (Hz) v ^1H NMR byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Chemické posuny byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty v jednotkách Hz na jedno desetinné místo.

Hmotnostní spektra EI byla měřena na přístroji Shimadzu QP 2010, teplota iontového zdroje byla 150 °C, zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhříváném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s), energie ionizujících elektronů byla 75 eV. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější ion v oblasti $m/z > 50$.

Hmotnostní spektra ESI byla měřena na přístroji BRUKKER esquire 3000, zavedení vzorku bylo provedeno v roztoku methanolu. U vzorků měřených tímto způsobem je uveden pouze ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ eventuelně jeden nebo dva ionty dceřinné.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F_{254} (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 110 – 200 °C.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 - 200 μm ; Merck 7734). Používaný HPLC systém měl toto uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), preparativní HPLC kolona (Labio 25×250 mm nebo 50×250 mm, sorbent Biospher Si120, 7 μm), Refractive index detektor IOTA 2 (Precision Instruments), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 1.20 a automatický

sběrač frakcí Gilson (model 206). K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200).

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (jsou vždy uvedeny u experimentu):

- A hexan : ethyl-acetát 2:1 (obj.)
- B toluen : diethylether 6:1 (obj.)
- C toluen : diethylether 5:1 (obj.)

Mobilní fáze použité pro HPLC jsou označeny čísly, které představují objemové procento ethyl-acetátu v hexanu.

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována. 2-brom-1-methoxyethan a 1-(2'-methoxyethoxy)-2-bromethan byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich s.r.o. Kyselina dihydrobetulinová (**1a**) a bromidy **XLIV** a **XLVII** byly získány z dřívějších přísunů v naší laboratoři^{7,20}.

Cytotoxická aktivita byla testována na pracovišti MUDr. M. Hajdúcha Ph.D., v Laboratoři experimentální medicíny Dětské kliniky FN v Olomouci následujícím způsobem: Testovaná sloučenina byla v šesti různých zředěních přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukémie CEM v jamkách kultivačního panelu. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Inkubace buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou trvala 72 h při 37 °C, v 5% atmosféře CO₂ a 100% vlhkosti. Poté byl do každé jamky panelu přidán MTT - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid] a inkubace pokračovala další 4 h. Inkubace byla ukončena přidáním dodekansulfonátu sodného a procento přežívajících buněk bylo stanoveno spektrofotometricky při 540 nm. Z křivek dávkové závislosti je vypočítána koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk - TCS₅₀.

Obvyklé zpracování reakční směsi:

Reakční směs byla nalita do pětinasobného množství vody a extrahována dichlormethanem. Spojené organické podíly byly promyty vodou a rozpouštědla byla odpařena na RVO.

1. Příprava 2'-methoxyethyl-3 β -hydroxylup-28-oátu (1b)

Do roztoku kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) (500 mg; 2.2 mmol) ve směsi CH₂Cl₂ (3 ml) a MeCN (1 ml) byl přidán DBU (340 μ l; 4.5 mmol) a 1-brom-2-methoxyethan (330 μ l; 7.0 mmol). Reakční směs byla míchána 4 dny za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (eluční soustava C). Poté byla směs zpracována obvyklým způsobem a purifikována HPLC (mobilní fáze 32). Spojené frakce byly krystalizovány z methanolu. Byl získán ester **1b** ve formě bílých krystalů (202 mg; 35 %) o t.t. 182.5 °C, [α]_D - 14.8 (c 0.27). IR spektrum: 1693 (C=O), 3531 (O-H). ¹H NMR spektrum: 0.75 d, 3H (J = 6.6 Hz); 0.76 s, 3H (1 \times CH₃); 0.83 s, 3H (1 \times CH₃); 0.85 d, 3H (J = 6.9 Hz); 0.92 s, 3H (1 \times CH₃); 0.94 s, 3H (1 \times CH₃); 0.97 s, 3H (1 \times CH₃); 3.16-3.22 m, 1H (H-3 α); 3.37 s, 3H (OCH₃); 3.58 t, 2H (J = 4.5 Hz); 4.14-4.30 m, 2H. ¹³C NMR spektrum viz. str. 30. MS (EI) m/z (%): [Pro C₃₃H₅₆O₄ M⁺ 516] 516 (M⁺, 26), 498 (8), 483 (2), 455 (4), 413 (39), 395 (7), 351 (4), 294 (13), 207 (46), 189 (100). Elem. anal. pro C₃₃H₅₆O₄ (516.4) vypočteno 76.69 % C, 10.92 % H, 12.38 % O; nalezeno 76.75 % C, 10.99 % H, 12.44 % O.

2. Příprava 2'-(2''-methoxyethoxy)ethyl-3 β -hydroxylup-28-oátu (1c)

Do roztoku kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) (500 mg; 2.2 mmol) ve směsi CH₂Cl₂ (3 ml) a MeCN (1 ml) byl přidán DBU (340 μ l; 4.5 mmol) a 1-(2'-methoxyethoxy)-2-bromethan (475 μ l; 7.0 mmol). Reakční směs byla míchána 4 dny za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (eluční soustava C). Poté byla směs zpracována obvyklým postupem a přečištěna HPLC (mobilní fáze 67). Spojené frakce byly krystalizovány z methanolu. Byl získán ester **1c** ve formě krystalů (295 mg; 48 %) o t.t. 156.7 °C, [α]_D -13.2 (c 0.27). IR spektrum: 1685 (C=O), 3531 (O-H). ¹H NMR spektrum: 0.75 d, 3H (J = 6.9 Hz) (1 \times CH₃); 0.76 s, 3H (1 \times CH₃); 0.83 s, 3H (1 \times CH₃); 0.85 d, 3H (J = 6.9 Hz) (1 \times CH₃); 0.91 s, 3H (1 \times CH₃); 0.94 s, 3H (1 \times CH₃); 0.97 s, 3H (1 \times CH₃); 3.16-3.22 m (H-3 α); 3.38 s, 3H (OCH₃); 3.52-3.57 m, 2H; 3.61-3.66 m, 2H; 3.69 t, 2H (J = 5.1 Hz); 4.16-4.30 m, 2H (4 \times CH₂O). ¹³C NMR spektrum viz str. 30. MS (EI) m/z (%): [Pro C₃₅H₆₀O₅ M⁺ 560] 560 (M⁺, 7), 542 (34), 527 (4), 499 (2), 413 (14), 395 (4), 351 (4), 207 (13), 189 (37). Elem. anal. pro C₃₅H₆₀O₅ (560.4) vypočteno 74.95 % C, 10.78 % H, 14.26 % O; nalezeno 74.91 % C, 10.72 % H, 14.18 % O.

3. Příprava (2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl)- β -D-galaktopyranosyl-3 β -hydroxylup-28-oátu (1d)

Do roztoku kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) (500 mg; 2.2 mmol) ve směsi acetonu (10 ml) a acetonitrilu (5 ml) byl přidán uhličitán draselný (175 mg; 2.5 mmol) a Ac₄GAL-Br **XLIV** (800 mg; 3.6 mmol). Reakční směs byla míchána 7 dní za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (eluční soustava A). Poté byla směs zpracována, prolita přes sloupeček silikagelu a následně separována HPLC (mobilní fáze 67). Spojené frakce byly lyofilizovány z *t*-BuOH. Byl získán ester **1d** ve formě bílého lyofilizátu (180 mg; 21 %) o t.t. 125.1 °C, $[\alpha]_D - 6.8$ (c 0.29). IR spektrum: 1753 (C=O), 3557 (O-H). ¹H NMR spektrum: 0.75 d, 3H (J = 6.9 Hz, 1×CH₃); 0.76 s, 3H (1×CH₃); 0.83 s, 3H (1×CH₃); 0.85 d, 3H (J = 6.9 Hz, 1×CH₃); 0.90 s, 3H (1×CH₃); 0.94 s, 3H (1×CH₃); 0.97s, 3H (1×CH₃); 2.00 s, 3H; 2.03 s, 6H; 2.17 s, 3H; (4×CH₃COO); 3.17-3.22m, 1H (H-3 α); 4.00-4.18 m, 3H (H-5', H-6'a, H-6'b); 5.11 dd, 1H (J₁ = 10.5 Hz, J₂ = 3.3 Hz, H-3'); 5.37 dd, 1H (J₁ = 10.5 Hz, J₂ = 8.4 Hz, H-2'); 5.43 bd, 1H (J = 3.3 Hz, H-4'); 5.64 d, 1H (J = 8.4 Hz, H-1'). ¹³C NMR spektrum viz str. 30. MS (ESI) m/z (%): [Pro C₄₄H₆₈O₁₂ [M+Na]⁺ 811] 811 (67.5). Elem. anal. pro C₄₄H₆₈O₁₂ (788.5) vypočteno 66.98 % C; 8.69 % H; 24.33 % O; nalezeno 67.04 % C; 8.76 % H; 24.39 % O.

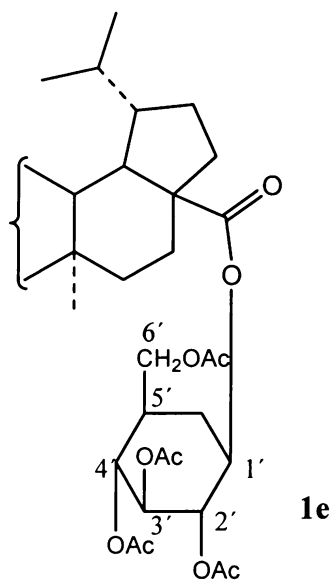
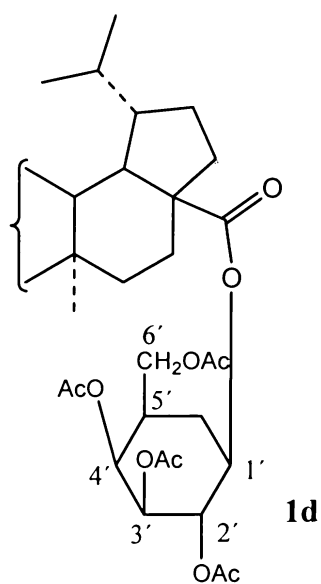
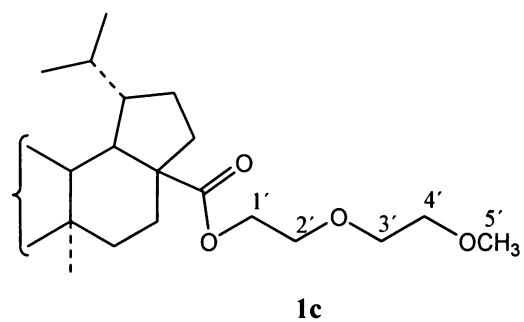
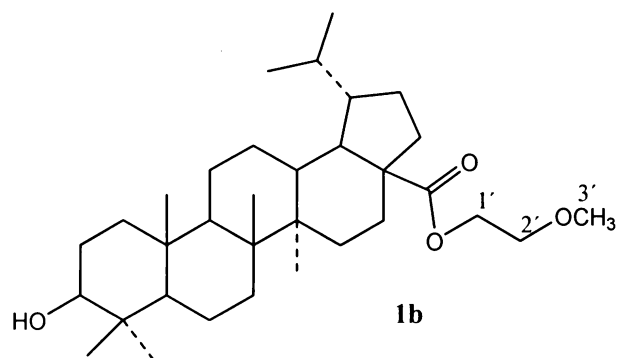
4. Příprava (2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl)- β -D-glukopyranosyl-3 β -hydroxylup-28-oátu (1e)

Do roztoku kyseliny dihydrobetulinové (**1a**) (400 mg; 2.2 mmol) ve směsi acetonu (16 ml) a acetonitrilu (8 ml) byl přidán uhličitán draselný (140 mg; 2.5 mmol) a Ac₄GLC-Br **XLVII** (640 mg; 3.6 mmol). Reakční směs byla míchána 7 dní za r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (eluční soustava B). Následně byl přidán DMF (10 ml) a další Ac₄GLC-Br **XLVII** (640 mg; 3.6mmol). Poté byla směs zpracována obvyklým postupem, přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu ve směsi toluen / ethylacetát (2:1) a purifikována HPLC (mobilní fáze 40). Spojené frakce byly lyofilizovány z *t*-BuOH. Byl získán ester **1e** ve formě bílého lyofilizátu (25 mg; 3.6 %) o t.t. 119.8 °C, $[\alpha]_D -11.1$ (c 0.23). IR spektrum: 1755 (C=O), 3585 (O-H). ¹H NMR spektrum: 0.75 d, 3H (J = 8.4 Hz); 0.76 s, 3H (1×CH₃); 0.83 s, 3H (1×CH₃); 0.85 d, 3H (J = 6.9 Hz); 0.89 s, 3H (1×CH₃); 0,94 s, 3H (1×CH₃); 0.96 s, 3H (1×CH₃); 2.02 s, 6H;

2.03 s, 3H; 2.07 s, 3H; (4×CH₃COO); 3.16-3.22 m, 1H (H-3α); 3.79-3.85 m, 1H (H-5'); 4.06 dd, 1H (J₁ = 12.6 Hz, J₂ = 2.4 Hz, H-6'a); 4.31 dd, 1H (J₁ = 12.3 Hz, J₂ = 4.5 Hz, H-6'b); 5.12-5.3 m, 3H (H-3', H-2', H-4'); 5.68 d, 1H (J₁ = 8.1 Hz, H-1'). ¹³C NMR spektrum viz str. 30. MS (ESI) m/z (%): [Pro C₄₄H₆₈O₁₂ [M+Na]⁺ 811] 811 (75.6). Elem. anal. pro C₄₄H₆₈O₁₂ (788.5) vypočteno 66.98 % C; 8.69 % H; 24.33 % O; nalezeno 67.02 % C; 8.74 % H; 24.39 % O.

Literatura¹⁶ uvádí t.t. 150 °C (EtOH), [α]_D-13 (c 0.01).

ČÍSLOVÁNÍ ESTERŮ



TABULKA ^{13}C NMR SPEKTER

Přirazení signálů ^{13}C NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií.

Atom C	Sloučenina			
	1b	1c	1d	1e
1	38.71	38.71	38.68	38.69
2	27.40	27.39	27.37	27.37
3	78.97	78.97	78.91	78.92
4	38.85	38.85	38.84	38.85
5	55.31	55.31	55.26	55.27
6	18.30	18.29	18.31	18.30
7	34.41	34.40	34.48	34.48
8	40.72	40.72	40.66	40.68
9	50.33	50.31	50.28	50.27
10	37.16	37.16	37.15	37.15
11	20.93	20.92	20.90	20.88
12	26.95	26.94	26.85	26.86
13	38.08	38.09	37.84	38.05
14	42.55	42.54	42.56	42.57
15	29.60	29.62	29.74	29.73
16	31.99	32.01	31.42	31.43
17	56.99	56.99	57.18	57.21
18	48.90	48.88	48.58	48.61
19	44.18	44.18	43.89	44.09
20	29.74	29.73	29.74	29.65
21	22.73	22.74	22.47	22.58
22	37.35	37.34	36.76	36.88
23	27.97	27.97	27.96	27.97
24	15.36	15.36	15.35	15.36
25	16.08	16.08	16.06	16.07
26	15.96	16.01	16.06	16.00
27	14.60 ^a	14.60 ^a	14.56 ^a	14.59 ^a
28	176.22	176.25	174.20	174.45
29	22.98	22.98	22.88	22.87
30	14.67 ^a	14.67 ^a	14.62 ^a	14.63 ^a
1'	70.70	62.71	91.46	91.00
2'	62.55	69.34	71.41 ^b	69.88 ^b
3'	58.81	70.40	70.94 ^b	72.48 ^b
4'	-	71.94	67.51 ^b	68.00 ^b
5'	-	59.07	66.81 ^b	72.94 ^b
6'	-	-	60.71	61.51
<u>CO</u> CH ₃	-	-	170.28	170.58
<u>CO</u> CH ₃	-	-	170.18	170.15
<u>CO</u> CH ₃	-	-	169.98	169.39
<u>CO</u> CH ₃	-	-	169.06	168.93
<u>CO</u> CH ₃	-	-	20.70	20.67
<u>CO</u> CH ₃	-	-	20.64	20.57
<u>CO</u> CH ₃	-	-	20.59	20.57
<u>CO</u> CH ₃	-	-	20.53	20.57

a, b signály mohou být zaměněny

ZÁVĚR

1. Byla provedena literární rešerše biologicky odbouratelných esterů kyseliny betulinové (**III**) a dihydrobetulinové (**1a**).
2. Byly připraveny estery methoxyethan-1-olu **1b**, 2-(2'-methoxyethoxy)ethan-1-olu **1c** a tetraacetylované sacharidové estery **1d**, **1e**. Všechny připravené sloučeniny byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu. Aktivita sloučenin **1d**, **1e** byla $< 10 \mu\text{mol/l}$.
3. Celkem byly připraveny a plně charakterizovány 3 dosud nepopsané sloučeniny **1b**, **1c**, **1d**.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vorlíček J.: Klinická onkologie, skripta Masarykovy Univerzity v Brně Fakulty lékařské (1999).
2. Lincová D., Farghali H. : Základní a aplikovaná farmakologie, Galén (2002).
3. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J. : Klin. Farmakol. Farm., **18**, 14-21 (2004).
4. Urban M., Šarek J., Tišlerová I., Džubák P., Hajdúch M. : Bioorg. Med. Chem., **13**, 5527-5535 (2005).
5. Kvasnica M., Šarek J., Klinotová E., Džubák P., Hajdúch M. : Bioorg. Med. Chem., **13**, 3447-3454 (2005).
6. Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: J. Med. Chem., **46**, 5402- 5415 (2003).
7. Urban M.: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 2005.
8. Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J.: J. Pharm. Sci., **29**, 1-13, (2006).
9. Zuco V., Supino R., Righetti S.C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formeli F. : Cancer Lett., **175**, 17-25 (2002).
10. Hashimoto F., Kashidawa Y., Cosentino L. M., Chen Ch. H., Garrett P. E., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem., **5**, 2133-2143 (1997).
11. Yasukawa K., Takido M., Matsumoto T., Takeuchi M., Nakagawa S. : Oncology, **48**, 72-76 (1991).
12. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher Ch. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta T. K. D., Pezutto J. M. : Nat. Med., **1**, 1046-1050 (1995).
13. Kim D. S. H. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: Bioorg. Med. Chem. Lett., **8**, 1707-1712 (1998).
14. Urban M., Šarek J., Klinot J., Kořínkova G., Hajdúch M: J. Nat. Prod., **67**, 1100-1105 (2004).
15. Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran P., Siddiqui M. J. A., Srivastava S. K., Vardhan A., Burman A. C. : Bioorg. Med. Chem. Lett., **14**, 2181-2184 (2004).
16. Samoshina N. F., Denisenko M. V., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: Chem. Nat. Comp., **39**, 575-581 (2003).

17. Martinová B.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2006.
18. Mukherjee R., Jaggi M., Rajedran P., Srivastava S. K., Siddiqui M. J. A., Vardhan A., Burman A. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 3169-3172 (2004).
19. Gewehr M., Kunz H.: *Synthesis*, **12**, 1499-1511 (1997).
20. Kvasnica M.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2003.
21. Nosková V.: Doktorská dizertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2002.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl při zpracování této bakalářské práce.

Dále děkuji RNDr. Ivě Rudovské, Ph.D. za měření a pomoc s interpretací NMR spekter, RNDr. Stanislavu Hilgardovi, CSc. za měření IČ spekter, RNDr. Martinu Štíchovi za měření MS spekter a Mgr. Bohuně Šperlichové za měření teplot tání a optických rotací.

Poděkování patří také Doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. a MUDr. Petru Džubákovi z Laboratoře experimentální medicíny FN Olomouc za měření cytotoxických aktivit nově připravených sloučenin.

Za ochotné rady při mých začátcích bych ráda poděkovala také svým kolegům z laboratoře.

Nejvíce však chci poděkovat své rodině a příteli za veškerou podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jana Šarka, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných mimo tuto práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu univerzity a školitele.

V Praze dne 16. 6. 2017.

.....
podpis