

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie



**Protizánětlivé účinky přírodních i syntetických
triterpenoidních sloučenin**

The anti-inflammatory effects of natural and synthetic
triterpenoid compounds

Pavla Spáčilová

Diplomová práce
Buněčná a vývojová biologie

Praha 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne

.....

Podpis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A BUNĚČNÝCH LINÍÍ

184B5/HER	linie lidského epitelu prsu	Me	methyl
Ac	acetyl	MIF	faktor inhibující migraci
B10R	myší makrofágová linie	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-
Bn	benzyl		-2,5-difenyltetrazolium
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie	NADH	bromid redukováná forma
COX	cyklooxygenáza		nikotinamid adenin
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium	NADPH	dinukleotidu redukováná forma
Et	ethyl		nikotinamid adenin
Glc	glukopyranosyl		dinukleotid fosfátu
GlcUA	D-glukuronopyranosyl	NF	jaderný faktor
HFL1	lidské fetální plicní fibroblasty	NO	oxid dusnatý
HLE	lidská leukocytární elastáza	PBS	fyziologický roztok
HMGB1	high-mobility group box 1 protein	PG	pufrovaný fosfátem prostaglandin
IFN	interferon	PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
IL	interleukin	PMNL	polymorfonukleární leukocyt
iNOS	indukovatelná NO syntáza	RAW 264.7	myší makrofágová linie
Jurkat	lidská T-lymfoblastická leukémie	ROS	reaktivní formy kyslíku
LCDB	lidská akutní myeloidní leukémie	SD	směrodatná odchylka
LPS	lipopolysacharid	TI	terapeutický index
LT	leukotrien	TNF	tumor nekrotizující faktor
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza	TX	tromboxan

Poznámka k číslování

V této práci je použito dvojí číslování sloučenin. Látky zmiňované v teoretické části jsou označeny římskými číslicemi, látky testované v experimentální části jsou číslovány arabskými číslicemi. Látky, které byly testovány rovněž v rámci práce (Spáčilová, 2007), jsou označeny hvězdičkou.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
OBSAH	4
ABSTRAKT.....	5
ÚVOD	6
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	6
TEORETICKÁ ČÁST.....	7
1. Protizánětlivé přírodní triterpenoidy	8
1.1 Boswellové kyseliny	8
1.2 Ursolová kyselina, oleanolová kyselina a jejich deriváty	10
1.3 Saponiny	15
1.4 Betulin, betulinová kyselina a lupeol.....	20
2. Syntetické triterpenoidní deriváty	22
2.1 Oleananové a ursanové deriváty	22
2.2 Lupanové deriváty	24
2.3 Betulininy	25
3. Testování protizánětlivých účinků.....	26
3.1 Testování inhibice tvorby NO	26
3.2 Testování inhibice tvorby ROS	27
3.3 Testování zhášení radikálů v bezbuněčném systému	27
3.4 Testování cytotoxického účinku pomocí MTT testu.....	28
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
4. Metodika	31
4.1 Obecné poznámky k experimentální části	31
4.2 Testování inhibice produkce NO a MTT test	32
4.3 Testování inhibice produkce ROS	32
4.4 Testování zhášení NO [•] radikálů.....	34
4.5 Testování zhášení O ₂ ^{-•} radikálů.....	34
5. Struktury testovaných sloučenin.....	35
6. Tabulky výsledků testování	42
DISKUZE.....	48
ZÁVĚR	54
LITERATURA.....	55
PODĚKOVÁNÍ.....	66

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na *in vitro* testování biologických aktivit souvisejících se zánětlivými procesy, jako je inhibice produkce oxidu dusnatého a reaktivních forem kyslíku v aktivovaných buňkách. V experimentální části práce bylo testováno 65 triterpenoidních derivátů na inhibici produkce oxidu dusnatého buňkami B10R stimulovanými lipopolysacharidem. Bylo nalezeno 15 sloučenin s terapeutickým indexem vyšším než 4, včetně tří sloučenin s hodnotou IC_{50} nižší než $10 \mu\text{mol/l}$. Inhibice produkce reaktivních forem kyslíku buňkami RAW 264.7 stimulovanými opsonizovaným zymosanem byla testována u 115 triterpenoidních sloučenin. U dvou derivátů byla hodnota IC_{50} nižší než $10 \mu\text{mol/l}$. Žádná ze 115 testovaných sloučenin nezhášela NO^\cdot . Byly nalezeny čtyři sloučeniny, které mírně zhášely $\text{O}^{2-\cdot}$.

Klíčová slova: triterpenoidy, protizánětlivý, NO, ROS, inhibice, zhášení

ABSTRACT

The thesis is focused on *in vitro* testing of biological activities related to inflammation, such as inhibition of nitric oxide production and inhibition of reactive oxygen species formation in activated cells. 65 triterpenoid derivatives were tested in experimental section of the thesis for nitric oxide synthesis inhibition in B10R cells stimulated with lipopolysaccharide. 15 compounds showed therapeutic index value higher than 4, including three compounds which showed IC_{50} value lower than $10 \mu\text{mol/l}$. 115 triterpenoid compounds were tested for inhibition of reactive oxygen species formation in RAW 264.7 cells stimulated with opsonized zymosan. Two compounds showed IC_{50} value lower than $10 \mu\text{mol/l}$. None of 115 tested compounds showed NO^\cdot -scavenging activity. Four compounds showed a moderate $\text{O}^{2-\cdot}$ -scavenging activity.

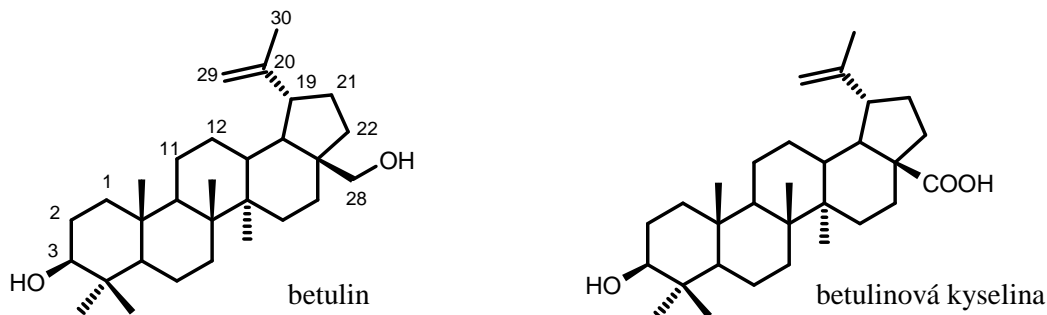
Key words: triterpenoids, anti-inflammatory, NO, ROS, inhibition, scavenger

ÚVOD

Díky rozvoji separačních a analytických technik byla v posledních dvou desetiletích z přírodních materiálů izolována řada biologicky aktivních sloučenin, jejichž farmaceutické využití je v současnosti intenzivně studováno. Trendem v současné medicíně je příprava celé řady strukturně blízkých derivátů, ze kterých jsou pak vybírány kandidátské sloučeniny na základě testování jejich biologické aktivity. Přírodní látky zde často slouží jako vzor pro přípravu nových léčiv.

Triterpenoidní sloučeniny jsou v přírodě široce rozšířeny. Jejich farmakologická aktivita je velmi významná a zejména deriváty odvozené od lupanového, oleananového, ursanového a dammaranového skeletu se vyznačují zajímavými biologickými účinky např. protizánětlivými, imunomodulačními, analgetickými, hepatoprotektivními, antimikrobiálními, antimykotickými, a protivirovými. Vykazují také významnou cytotoxickou aktivitu (Džubák *et al.*, 2006).

Betulin je lupanový derivát, jenž tvoří až 30 % suché hmotnosti svrchních vrstev březové kůry. Příbuzná betulinová kyselina se vyskytuje v kůře platanu. Objev cytotoxické aktivity betulinové kyseliny vůči melanomu (Pisha *et al.*, 1995) odstartoval intenzivní výzkum na poli syntézy derivátů betulinu a betulinové kyseliny.



Ve Skupině přírodních látek Přírodovědecké fakulty UK byla připravena skupina látek s lupanovým, 18 α -oleananovým a des-E-lupanovým skeletem, tzv. betulininů, které jsou strukturně odvozeny od betulinu a betulinové kyseliny (Šarek *et al.*, 2003). Jejich cytotoxická aktivita vůči širokému spektru nádorových linií je chráněna několika patenty (např. Hajdúch a Šarek, 2001). Vzhledem k tomu, že přírodní triterpenické sloučeniny vykazují pestré mechanismy protizánětlivých účinků, je zkoumána také protizánětlivá aktivita betulininů.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

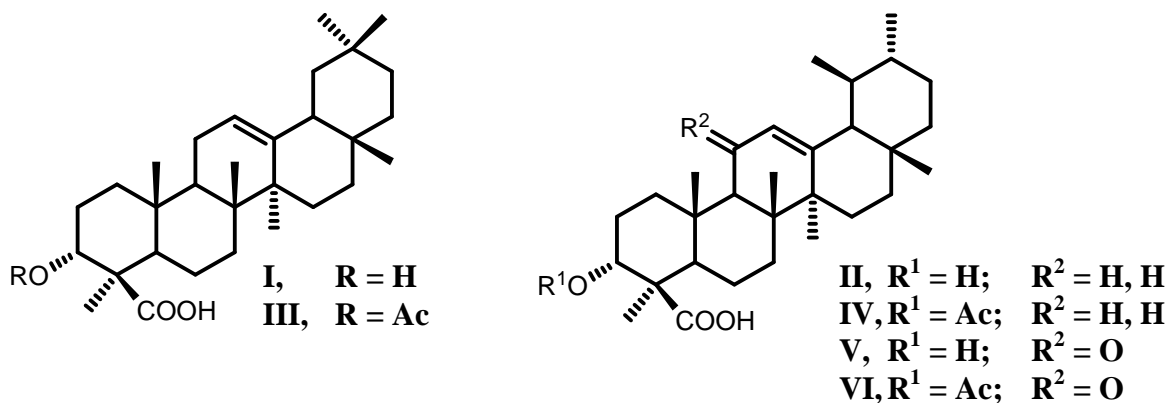
1. Provést literární rešerši protizánětlivých účinků triterpenoidních sloučenin.
2. Připravit metodiku pro testování protizánětlivých účinků triterpenoidů.
3. Provést screeningové testování protizánětlivé aktivity u vybraných triterpenoidních derivátů a vyvodit vztahy mezi strukturou a účinností.

TEORETICKÁ ČÁST

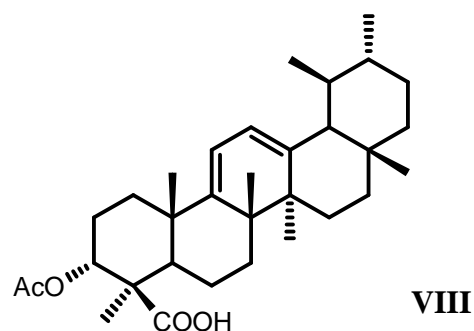
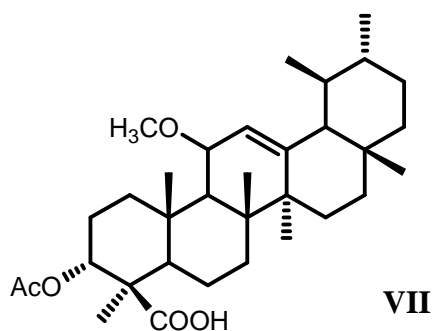
1. PŘÍRODNÍ TRITERPENOIDY

1.1 Boswellové kyseliny

Boswellové kyseliny jsou pentacyklické triterpenické sloučeniny obsažené v pryskyřici stromů rodu *Boswellia*. V Indii a Číně se pryskyřice stromu *Boswellia serrata*, lidově zvaná „salai guggul“, používá k výrobě kadidla. Zároveň je tato pryskyřice hojně využívána v tradičním lékařství, převážně k léčbě revmatoidní artritidy. Během posledních třiceti let bylo ze stromu *Boswellia serrata* izolováno více než 200 biologicky aktivních triterpenoidních sloučenin. Hlavními obsahovými látkami jsou α - a β -boswellová kyselina (**I** a **II**), jejich 3α -O-acetylované formy **III** a **IV**, 11-oxo- β -boswellová kyselina (**V**) a 3α -O-acetyl-11-oxo- β -boswellová kyselina (**VI**) (Khanna *et al.*, 2007; Shen a Lou, 2008).



Lidská 5-lipoxygenáza (EC 1.13.11.34) je enzym důležitý pro biosyntézu leukotrienů. Poruchy jeho funkce vedou k onemocněním jako je astma, chronická artritida, hepatitida, lupénka, ulcerózní kolitida a Crohnova choroba (Ammon *et al.*, 1993). Na počátku 90. let 20. století bylo zjištěno, že výše zmíněné boswellové kyseliny **I** - **VI** specificky inhibují enzymovou aktivitu 5-lipoxygenázy v potkaních polymorfonukleárních leukocytech (PMNL). Jako nejúčinnější se ukázala kyselina **VI** s hodnotou IC₅₀ 1,5 μ mol/l (Safayhi *et al.*, 1992). Rozkladem minoritní boswellové kyseliny **VII** ve slabě kyselém roztoku vody a methanolu vzniká kyselina **VIII**, jejíž hodnota IC₅₀ pro inhibici 5-lipoxygenázy je 0,75 μ mol/l (Schweizer *et al.*, 2000). Pro efektivní inhibici 5-lipoxygenázy je nutné, aby pentacyklická triterpenoidní sloučenina obsahovala karboxylovou skupinu na kruhu A. Pokud sloučenina nese také 11-oxo skupinu, je inhibice 5-lipoxygenázy výraznější (Sailer *et al.*, 1996). Kyselina **VI** je allosterický inhibitor, který se za přítomnosti vápenatých iontů váže na 5-lipoxygenázu do regulačního místa pro druhou molekulu arachidonové kyseliny (Sailer *et al.*, 1998).



Přestože původní práce uvádí, že boswellové kyseliny neovlivňují aktivitu 12-lipoxygenázy ani cyklooxygenáz (Ammon *et al.*, 1993), bylo později prokázáno, že boswellové kyseliny s těmito enzymy přímo interagují. Zatímco 3 α -O-acetyl-11-oxo- β -boswellová kyselina (VI) aktivitu 12-lipoxygenázy z krevních destiček inhibuje (v závislosti na přítomnosti resp. absenci vápenatých iontů je její IC₅₀ 15 μ mol/l, resp. 50 μ mol/l), β -boswellová kyselina (II) v koncentraci 10 μ mol/l aktivitu 12-lipoxygenázy bez přítomnosti Ca²⁺ přibližně dvojnásobně zvyšuje. Jsou-li v roztoku přítomny Ca²⁺ ionty, aktivita 12-lipoxygenázy není β -boswellovou kyselinou (II) ovlivněna (Poeckel *et al.*, 2006). Nedávno bylo zjištěno, že kyseliny II a IV - VI inhibují cyklooxygenázu-1 (COX-1). Jako nejaktivnější se opět ukázala kyselina VI, která inhibuje COX-1 v bezbuněčném systému (IC₅₀ = 32 μ mol/l) a v lidských krevních destičkách (IC₅₀ = 17 μ mol/l). Přestože boswellové kyseliny II a IV - VI inhibují rovněž aktivitu cyklooxygenázy-2 (COX-2), jejich inhibiční účinek je jen slabý (IC₅₀ > 100 μ mol/l) (Siemoneit *et al.*, 2008).

Lidská leukocytární elastáza (HLE, EC 3.4.21.37) je serinová proteáza produkovaná PMNL. Vzhledem k jejímu agresivnímu působení je spojována s onemocněními jako jsou rozedma plic, cystická fibróza, chronická bronchitida, syndrom akutní respirační tísně, glomerulonefritida a revmatoidní artritida (Safayhi *et al.*, 1997). Ukázalo se, že kyseliny II a VI inhibují HLE. Hodnota IC₅₀ pro kyselinu VI je 13,8 μ mol/l, u β -boswellové kyseliny (II) je inhibiční aktivita nižší. Účinek kyseliny VI je selektivní, neboť neinhibuje jinou serinovou proteázu, chymotrypsin (Safayhi *et al.*, 1997).

Při studiu vlivu boswellových kyselin na buněčné signální dráhy bylo zjištěno, že boswellové kyseliny v lidských PMNL aktivují mitogenem aktivované kinázy p42^{MAPK} a p38 a zvyšují hladinu vápenatých iontů v buňce. Jako efektivnější se jeví 11-oxokyseliny, nejúčinnější je kyselina VI (Altmann *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že vliv na MAPK a hladinu Ca²⁺ je spojen se stimulací tvorby ROS v lidských PMNL. Za tvorbu ROS je odpovědná NADPH oxidáza. Působením kyseliny VI v koncentraci 30 μ mol/l vzroste

tvorba superoxidových aniontů v lidských PMNL dvanáctinásobně. Vliv na MAPK a hladinu Ca^{2+} také vede ke stimulaci produkce arachidonové kyseliny (Altmann *et al.*, 2004).

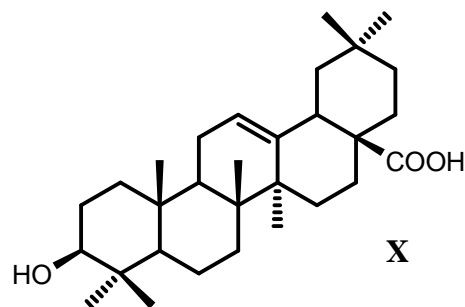
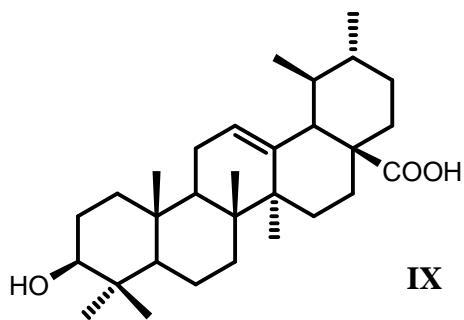
Acetylboswellové kyseliny **III** a **VI** inhibují expresi TNF- α v lidských periferních monocyttech aktivovaných LPS. Při zkoumání mechanismu tohoto účinku bylo zjištěno, že kyseliny **III** a **VI** ovlivňují signální dráhu vedoucí k transkripčnímu faktoru NF- κ B. Tento transkripční faktor reguluje nejen expresi TNF- α , ale i dalších prozánětlivých proteinů jako iNOS a IL-1. Působením acetylboswellových kyselin **III** a **VI** dochází k inhibici fosforylace inhibitoru I κ B α a p65 I κ B-kinázovým komplexem, zatímco vazba NF- κ B na DNA není nijak ovlivněna (Syrovets *et al.*, 2005).

Chemická analýza pryskyřice východoafrického stromu *Boswellia carterii* ukázala, že tato pryskyřice obsahuje podobné spektrum boswellových kyselin jako *Boswellia serrata*. V pryskyřici byly identifikovány kyseliny **I** - **VI** a **VIII**. Protože u revmatoidní artritidy dochází k aktivaci TH1 buněk, produkujících IL-2 a IFN- γ , na úkor TH2 buněk, které vytváří IL-4 a IL-10, byly zkoumány imunomodulační účinky extraktu *Boswellia carterii*. Bylo zjištěno, že extrakt získaný pomocí sezamového oleje snižuje expresi IL-2 a IFN- γ myšími splenocyty a naopak potencuje tvorbu IL-4 a IL-10. To znamená, že se díky tomuto extraktu profil uvolněných cytokinů posouvá více k TH2 buněčné odpovědi. Použitím ethanolu jako extrakčního rozpouštědla byl získán extrakt, který měl na myší splenocyty cytotoxický efekt (Chevrier *et al.*, 2005).

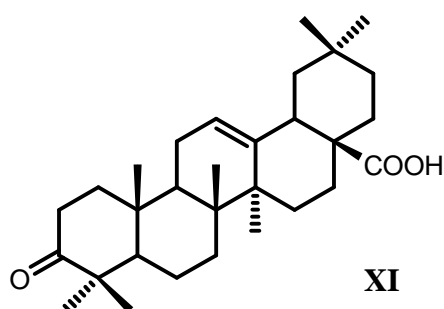
1.2 Ursolová kyselina, oleanolová kyselina a jejich deriváty

Ursolová kyselina (**IX**) je v přírodě široce rozšířená. Vyskytuje se v léčivých rostlinách jako je blahovičnick (Eucalyptus), bez čínský (Sambucus chinensis), rozmarýn lékařský (Rosmarinum officinalis) a vřes obecný (Calluna vulgaris) (Liu, 1995). Léčivý účinek těchto rostlin je často způsoben právě přítomností ursolové kyseliny (**IX**). Ta je například zodpovědná za účinek extraktu z šalvěže lékařské (Salvia officinalis) proti kožním zánětům (Baricevic *et al.*, 2001). Ursolová kyselina (**IX**) je také přirozenou složkou lidské potravy, neboť je obsažena v ovoci. Uvádí se, že slupka zralého jablka obsahuje 50 mg ursolové kyseliny (**IX**) (Fernandes *et al.*, 1964).

Rozšíření strukturně příbuzné oleanolové kyseliny (**X**) je rovněž široké. Uvádí se, že byla izolována z více než 120 rostlinných druhů. Pro příklad můžeme jmenovat ženšen pravý (Panax ginseng) či měsíček lékařský (Calendula officinalis) (Liu, 1995).



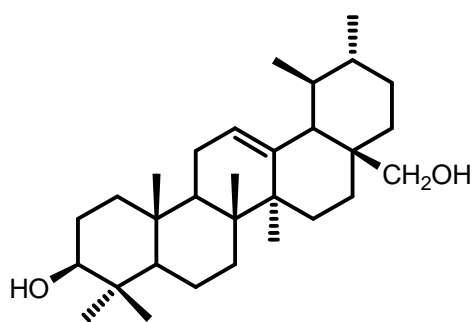
Vliv ursolové kyseliny (**IX**) na metabolismus arachidonové kyseliny v myších makrofázích byl poprvé studován na začátku 90. let 20. století. Bylo zjištěno, že ursolová kyselina (**IX**) v koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ inhibuje jak lipoxygenázy, tak cyklooxygenázy. V případě lipoxygenáz byla 5-lipoxygenáza inhibována více než 12- a 15-lipoxygenázy (Najid *et al.*, 1992). Inhibice cyklooxygenáz byla potvrzena i při výzkumu biologické aktivity ursolové kyseliny (**IX**) získané z jitrocele většího (*Plantago major*). Hodnota IC_{50} pro inhibici COX-2 a COX-1 ursolovou kyselinou (**IX**) je 130 $\mu\text{mol/l}$ resp. 210 $\mu\text{mol/l}$. Oleanolová kyselina (**X**) má slabší inhibiční účinek – inhibuje COX-2 s IC_{50} 295 $\mu\text{mol/l}$ a COX-1 s IC_{50} 380 $\mu\text{mol/l}$. Vzhledem k tomu, že obě kyseliny **IX** a **X** inhibují COX-2 výrazněji než COX-1, můžeme o nich hovořit jako o selektivních inhibitorech COX-2 (Ringbom *et al.*, 1998). Přestože oleanolová kyselina (**X**) nemá v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ vliv na aktivitu COX-1 z lidských krevních destiček, oleanonová kyselina (**XI**), izolovaná z řečičku terebinthového (*Pistacia terebinthus*), v této koncentraci inhibuje COX-1 ze 78 %. Přítomnost oxoskupiny na kruhu A v oleanonové kyselině (**XI**) tedy prohlubuje inhibiční účinek vůči cyklooxygenázám (Giner-Larza *et al.*, 2001).



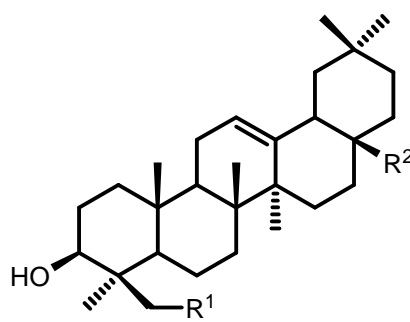
Inhibiční efekt ursolové (**IX**) a oleanolové kyseliny (**X**) na produkci eikosanoidů byl prokázán i v dalších studiích. Obě kyseliny **IX** a **X** inhibují syntézu PGE_2 v myších peritoneálních makrofázích stimulovaných ionoforem A23187 – hodnota IC_{50} je 61 $\mu\text{mol/l}$ pro ursolovou kyselinu (**IX**), resp. 24 $\mu\text{mol/l}$ pro oleanolovou kyselinu (**X**). Ursolová kyselina (**IX**) rovněž ve stejných buňkách inhibuje tvorbu TXB_2 ($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{mol/l}$) a oleanolová kyselina (**X**) má inhibiční účinek na produkci LTC_4 s IC_{50} 16 $\mu\text{mol/l}$ (Díaz *et*

al., 2000). Také oleanonová kyselina (**XI**) ovlivňuje syntézu leukotrienů. Její hodnota IC_{50} pro inhibici tvorby LTB_4 potkaními peritoneálními leukocyty je 17 $\mu\text{mol/l}$ (Giner-Larza *et al.*, 2001).

Mechanismus protizánětlivého působení ursolové kyseliny (**IX**) nespočívá pouze v inhibici enzymů zodpovědných za produkci eikosanoidů, ale také v regulaci jejich exprese. Ursolová kyselina (**IX**) ovlivňuje expresi COX-2 v buňkách 184B5/HER stimulovaných PMA. Bylo prokázáno snížení obsahu COX-2 mRNA a rovněž inhibice tvorby PGE_2 , jenž je pomocí COX-2 syntetizován (Subbaramaiah *et al.*, 2000). Mechanismus regulace exprese COX-2 ursolovou kyselinou (**IX**) spočívá v inhibici funkce transkripčního faktoru NF- κ B. Ursolová kyselina (**IX**) zde působí jako inhibitor $I\kappa$ B α kinázy. Při stimulaci buněk nádorové linie Jurkat PMA, peroxidem vodíku či cigaretovým kouřem dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a následné expresi COX-2, cyklinu D1 a matrixové metaloproteinázy-9. Exprese všech těchto proteinů je ursolovou kyselinou (**IX**) v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ inhibována (Shishodia *et al.*, 2003). Matrixová metaloproteináza-9, zvaná též želatináza B, je enzym podílející se na remodelaci extracelulární matrix. Její destruktivní efekt můžeme pozorovat u zánětlivých chorob jako je revmatoidní artritida a osteoartritida, zvýšená exprese matrixové metaloproteinázy-9 v nádorových buňkách vede k jejich invazivitě (Murphy a Nagase, 2008). Inhibice exprese matrixové metaloproteinázy-9 je tedy zajímavým účinkem využitelným v terapii zánětlivých i nádorových onemocnění.



XII

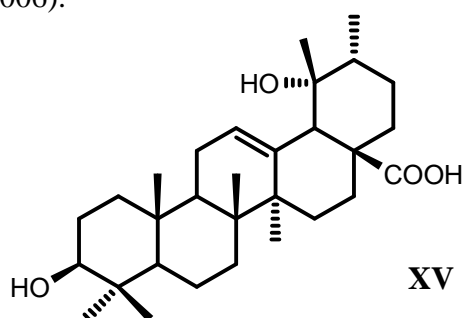


XIII, $R^1 = H$; $R^2 = CH_2OH$
XIV, $R^1 = OH$; $R^2 = COOH$

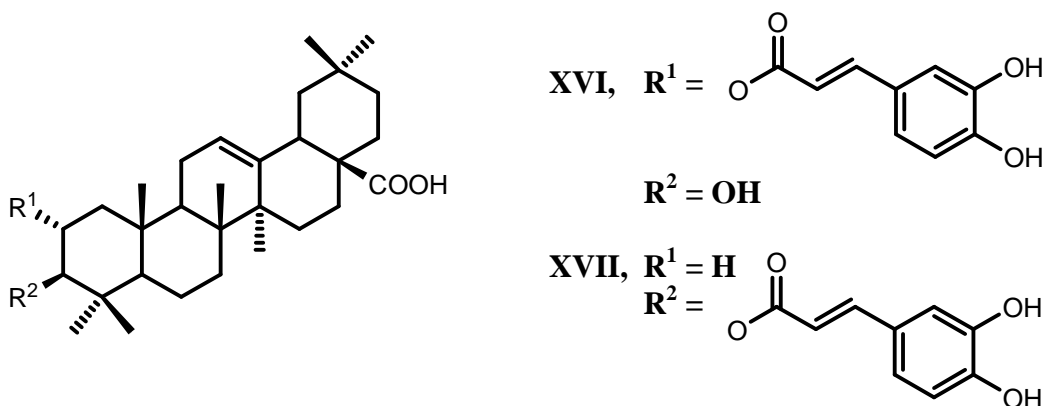
Ursolová kyselina (**IX**) i oleanolová kyselina (**X**) jsou inhibitory lidské leukocytární elastázy (HLE). Inhibiční konstanta K_i pro ursolovou kyselinu (**IX**) má hodnotu 4,4 $\mu\text{mol/l}$, pro oleanolovou kyselinu je hodnota $K_i = 6,4 \mu\text{mol/l}$. Přítomnost karboxylové skupiny v poloze 28 je nutná pro inhibiční účinek obou kyselin **X** a **IX**. Triterpenoidní alkoholy s hydroxyskupinou v poloze 28, uvaol (**XII**), odvozený od ursolové kyseliny (**IX**), a erythrodiol (**XIII**), odvozený od oleanolové kyseliny (**X**), mají

slabší inhibiční účinek ($K_i = 15,7 \mu\text{mol/l}$, resp. $17,3 \mu\text{mol/l}$). Také přítomnost hydroxyskupiny v poloze 24 u hederageninu (**XIV**) inhibiční efekt snižuje ($K_i = 62 \mu\text{mol/l}$) (Ying *et al.*, 1991).

Byla rovněž studována aktivita ursolové (**IX**) a oleanolové kyseliny (**X**) vůči klasické cestě komplementu. Zatímco ursolová kyselina (**IX**) inhibuje komplement s IC_{50} $90 \mu\text{mol/l}$ (Thuong *et al.*, 2006), hodnota IC_{50} pro oleanolovou kyselinu je vyšší – pouze $163 \mu\text{mol/l}$ (Lee *et al.*, 2004). Obecně se ve své aktivitě proti komplementu ursanové deriváty jeví oproti oleananovým derivátům jako účinnější. Například pomolová kyselina (**XV**), mající ursanový skelet, inhibuje klasickou cestu komplementu s IC_{50} $4 \mu\text{mol/l}$ (Thuong *et al.*, 2006).



Během studia biologických aktivit triterpenoidů izolovaných ze srdečníku obecného (*Leonorus cardiaca*) byl zkoumán vliv těchto sloučenin na oxidační vzplanutí v lidských neutrofilech stimulovaných opsonizovaným zymosanem A. Ukázalo se, že ursolová kyselina (**IX**) inhibuje tvorbu ROS s IC_{50} $140,76 \mu\text{g/ml}$, tj. $308 \mu\text{mol/l}$. Oproti tomu indomethacin, který byl použit jako pozitivní kontrola, má hodnotu IC_{50} pouze $246,35 \mu\text{g/ml}$, tj. $689 \mu\text{mol/l}$. Dalším testováním bylo zjištěno, že ursolová kyselina (**IX**) není zhášedčem (scavengerem neboli „zametačem“) superoxidových radikálů tvořených v bezbuněčném systému (Ali *et al.*, 2007).



Oleanolová kyselina (**X**) je rovněž slabým inhibitorem tvorby NO buňkami myší makrofágové linie RAW 264.7 stimulovanými LPS a $\text{IFN-}\gamma$. Její hodnota IC_{50} je

40,2 $\mu\text{mol/l}$. Mnohem aktivnějším derivátem je ester **XVI**, který byl stejně jako oleanolová kyselina (**X**) izolován z rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Derivát **XVI** inhibuje tvorbu NO s IC_{50} 7,6 $\mu\text{mol/l}$ (Yang *et al.*, 2007). Také ester **XVII** inhibuje tvorbu NO a rovněž produkci IL-12 (IC_{50} je v obou případech 10 $\mu\text{mol/l}$) (Rao *et al.*, 2008).

Přestože práce (Ali *et al.*, 2007) uvádí, že ursolová kyselina (**IX**) není zhášečem superoxidových radikálů, Ramachandran a Prasad v roce 2008 publikovali data, jež svědčí o tom, že ursolová kyselina (**IX**) je významným antioxidantem. Má vliv na hydroxylové radikály (HO^\cdot) (IC_{50} = 113 $\mu\text{mol/l}$), superoxidové radikály (O_2^\cdot) (IC_{50} = 92 $\mu\text{mol/l}$) i radikály oxidu dusnatého (NO^\cdot) (IC_{50} = 76 $\mu\text{mol/l}$) produkované *in vitro* v bezbuněčném systému (Ramachandran a Prasad, 2008).

V předchozím textu byly popsány protizánětlivé účinky ursolové (**IX**) a oleanolové kyseliny (**X**). Tyto účinky spočívají především v inhibici zánětlivých procesů v aktivovaných buňkách imunitního systému. V roce 2001 bylo zjištěno, že účinek ursolové kyseliny (**IX**) na klidové a aktivované makrofágy je zcela odlišný. Ursolová kyselina (**IX**) již v koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ stimuluje klidové myší peritoneální makrofágy a buňky linie RAW 264.7 k produkci NO a TNF- α , tedy k tvorbě prozánětlivých mediátorů. V koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ má ursolová kyselina (**IX**) na klidové makrofágy téměř takový účinek jako přítomnost LPS v koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Bylo rovněž zjištěno, že mechanismus účinku ursolové kyseliny (**IX**) spočívá ve stimulaci exprese jak TNF- α , tak iNOS skrze transkripční faktor NF- κB (You *et al.*, 2001). Stimulační efekt na klidové myší peritoneální makrofágy a buňky RAW 264.7 má i oleanolová kyselina (**X**). Také ona aktivuje expresi TNF- α a iNOS (Choi *et al.*, 2001).

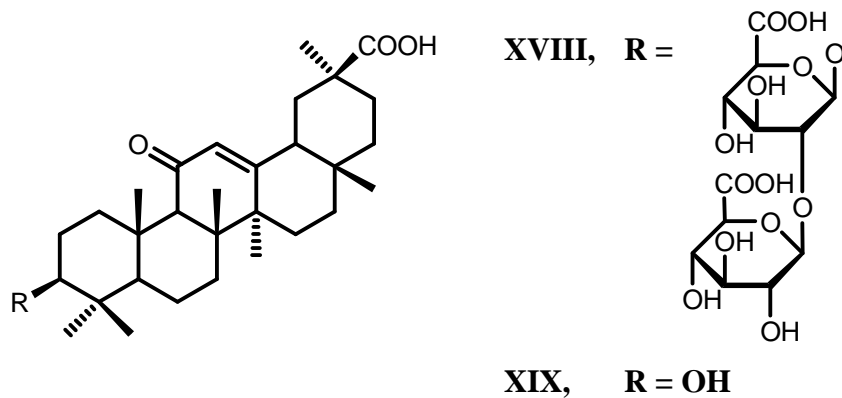
Vlivu ursolové kyseliny (**IX**) na klidové makrofágy byla v dalších letech věnována značná pozornost. Bylo zjištěno, že ursolová kyselina (**IX**) ovlivňuje uvolňování makrofágového migračního inhibičního faktoru (MIF) do média. Tento prozánětlivý cytokin reguluje aktivitu makrofágů i T-lymfocytů a stimuluje expresi TNF- α , COX-2 a toll-like receptoru 4. Přestože ursolová kyselina (**IX**) u linie RAW 264.7 stimuluje uvolňování MIF do média, hladina mRNA příslušející MIF zůstává nezměněna (Ikeda *et al.*, 2005). V *in vivo* experimentu bylo též prokázáno, že ursolová kyselina (**IX**) aplikovaná lokálně zvyšuje hladinu mRNA pro TNF- α , COX-1 a COX-2 v kůži u myší (Ikeda *et al.*, 2006). Ursolová kyselina (**IX**) rovněž indukuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a MIF a také tvorbu ROS v myších peritoneálních makrofázích. Bylo zjištěno, že ursolová kyselina (**IX**) tvoří v médiu agregáty, které se vážou na scavenger („uklízecí“) receptor CD36. Vazba agregátů na receptor byla potvrzena pomocí techniky plasmonové

rezonance. Receptor CD36 spouští signální dráhu vedoucí k produkci ROS a tím stimuluje tvorbu prozánětlivého IL-1 β . Za přítomnosti antioxidantu, *N*-acetyl-L-cysteinu, byla produkce IL-1 β výrazně nižší, což potvrzuje hypotézu, že prozánětlivý účinek ursolové kyseliny (**IX**) je spojen se signalizací receptoru CD36 (Ikeda *et al.*, 2007). Míra stimulace tvorby IL-1 β ursolovou kyselinou (**IX**) je také závislá na expresi podjednotky NADPH oxidázy gp91^{phox} v makrofázích (Ikeda *et al.*, 2008).

1.3 Saponiny

Triterpenoidní *O*-glykosidy bývají označovány jako saponiny. Mateřskou triterpenoidní sloučeninu nazýváme aglykon. U řady přírodních saponinů byla objevena zajímavá protizánětlivá aktivita.

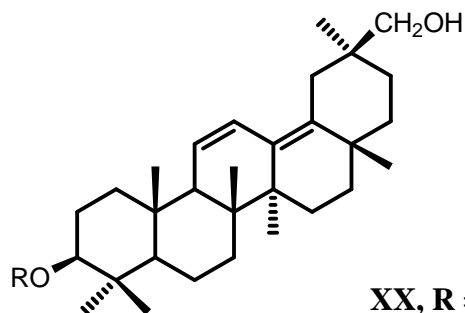
Glycyrrhizin (**XVIII**) je hlavní složka vodného extraktu z kořene lékořice (*Glycyrrhiza glabra*). Tento saponin je padesátkrát sladší než sacharóza, a proto se používá jako sladidlo. Lékořice jako taková se odnepaměti využívá také k medicínským účelům, např. k léčbě žaludečních vředů a kašle (Asl a Hosseinzadeh, 2008). Glycyrrhizin (**XVIII**) je mikroflórou v lidském střevě štěpen na svůj aglykon, 18 β -glycyrrhetovou kyselinu (**XIX**) (Yim *et al.*, 2004).



Glycyrrhizin (**XVIII**) inhibuje tvorbu ROS (superoxidových aniontů, hydroxylových radikálů i peroxidu vodíku) v lidských neutrofilech stimulovaných opsonizovaným zymosanem. Není však zhášedčem (scavengerem) ROS tvořených v bezbuněčném systému (Akamatsu *et al.*, 1991). Dále bylo zjištěno, že hlavní metabolit glycyrrhizinu (**XVIII**), 18 β -glycyrrhetová kyselina (**XIX**), inhibuje klasickou cestu komplementu (IC₅₀ = 35 μ mol/l) (Kroes *et al.*, 1997) a rovněž má inhibiční účinek na produkci NO buňkami RAW 264.7 stimulovanými LPS (IC₅₀ = 0,05 mmol/l) (Park HY *et al.*, 2004).

Na klidové myší peritoneální makrofágy a buňky RAW 264.7 má však 18 β -glycyrrhetová kyselina (**XIX**) stimulační účinek – je aktivována tvorba NO a rovněž exprese iNOS (Jeong a Kim, 2002). U glycyrrhizinu (**XVIII**) byla pozorována inhibice tvorby NO LPS-stimulovanými buňkami RAW 264.7 ($IC_{50} = 90 \mu\text{mol/l}$) (Park HY *et al.*, 2004).

Jelikož se extrakt z lékořice využívá v Japonsku k léčbě chronické hepatitidy, byl podrobněji zkoumán mechanismus účinku glycyrrhizinu (**XVIII**) na myší jaterní dendritické buňky *in vitro* i *in vivo*. Hepatitida byla u myší indukována konkanavalinem A. Ukázalo se, že glycyrrhizin (**XVIII**) zvyšuje produkci IL-10 v jaterních dendritických buňkách, zatímco produkce IL-12 nebyla ovlivněna (Abe *et al.*, 2003). Stejný účinek byl objeven i u glycyrrhizinu (**XVIII**) ve formě diamonné soli. V tomto případě byla pozorována zvýšená tvorba jak IL-10, tak IL-6 (Feng *et al.*, 2007). Glycyrrhizin (**XVIII**) rovněž zvyšuje produkci IL-12 u myších peritoneálních makrofágů stimulovaných LPS *in vitro* i *in vivo* (Dai *et al.*, 2001). Dále byl studován inhibiční účinek glycyrrhizinu (**XVIII**) a jeho derivátů na tvorbu chemokinů IL-8 a eotaxinu 1 buněčnou linií HFL1. Glycyrrhizin (**XVIII**) inhibuje tvorbu IL-8 v buňkách stimulovaných TNF- α s $IC_{50} 449 \mu\text{mol/l}$. Jako nejúčinnější derivát se ukázal nenasycený alkohol **XX**, který inhibuje jak produkci IL-8 ($IC_{50} = 65,5 \mu\text{mol/l}$), tak tvorbu eotaxinu 1 ($IC_{50} = 15,8 \mu\text{mol/l}$) (Matsui *et al.*, 2004).

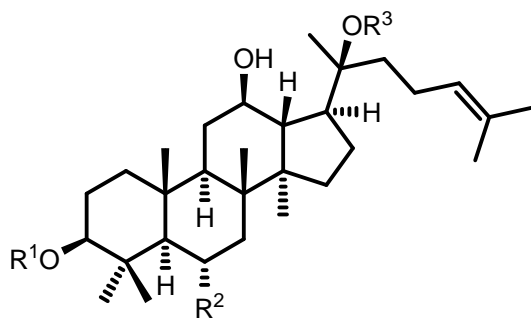


High-mobility group box 1 protein (HMGB1) je jaderný protein, který je součástí chromatinu. Extracelulárně však funguje jako mediátor zánětu. Uvolňují ho nekrotické buňky (signalizuje se tak poškození tkáně) stejně jako aktivované makrofágy, neutrofilly nebo dendritické buňky. Patogenní účinky HMGB1 se projevují při artritidě. Glycyrrhizin (**XVIII**) inhibuje chemotaktický a mitogenní účinek proteinu HMGB1. Pomocí NMR spektroskopie byla rovněž prokázána přímá vazba glycyrrhizinu (**XVIII**) na protein HMGB1 (Mollica *et al.*, 2007).

Ženšen pravý (*Panax ginseng*) je rostlina pocházející z Číny. Léčivé účinky jeho kořene jsou známy více než pět tisíc let. Využívá se buď kořen sušený (bílý ženšen), nebo kořen vařený v páře (červený ženšen). Za biologické aktivity ženšenu jsou odpovědné saponiny zvané ginsenosidy. Dosud jich bylo izolováno více než třicet. Rozdělujeme je do tří skupin podle aglykonu. Tím může být protopanaxadiol (**XXI**) či protopanaxatriol (**XXII**) s dammaranovým skeletem, nebo oleanolová kyselina (**X**) s oleananovým skeletem (Radad *et al.*, 2006).

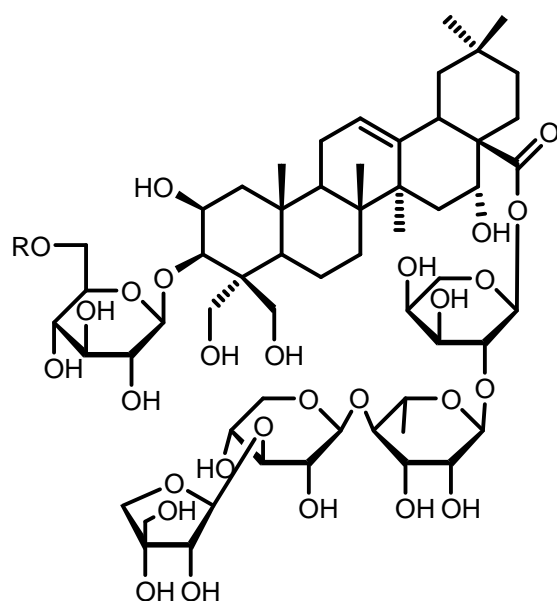
Podobně jako glycyrrhizin (**XVIII**) jsou i ginsenosidy štěpeny glykosidázami střevních bakterií. Hlavní saponinová složka kořene ženšenu, ginsenosid Rb1 (**XXIII**), je štěpen na tzv. sloučeninu K (anglicky compound K) (**XXIV**) (Yim *et al.*, 2004). Sloučenina K (**XXIV**) inhibuje tvorbu NO buněčnou linií RAW 264.7, která byla stimulována LPS, s hodnotou IC₅₀ 12 μmol/l. Za stejných podmínek má také inhibiční vliv na produkci PGE₂ (IC₅₀ = 4 μmol/l), COX-1 a COX-2 však nejsou přímo inhibovány. Bylo prokázáno, že sloučenina K (**XXIV**) snižuje expresi iNOS a COX-2. Stejnou metodou byl testován i mateřský ginsenosid Rb1 (**XXIII**), nevykázal však žádnou aktivitu (Park *et al.*, 2005). Podobnou aktivitu jako sloučenina K (**XXIV**) má i jiný protopanaxatriolový derivát, ginsenosid Rh1 (**XXV**), metabolit ginsenosidu Re (**XXVI**) (Bae *et al.*, 2005), a protopanaxadiolový ginsenosid Rh2 (**XXVII**), metabolit ginsenosidu Rg3 (**XXVIII**) (Park *et al.* 2003). U ginsenosidu Rh1 (**XXV**) i Rh2 (**XXVII**) byla objevena inhibice tvorby NO a PGE₂ u buněk RAW 264.7 stimulovaných LPS (Park EK *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2003). Mechanismus inhibice spočívá v ovlivnění funkce transkripčního faktoru NF-κB (Park EK *et al.*, 2004).

U hlavního saponinu červeného ženšenu, ginsenosidu Rg3 (**XXVIII**), byl mechanismus protizánětlivého působení prokázán i v *in vivo* experimentu. U myší, jejichž kůže byla ošetřena ginsenosidem Rg3 (**XXVIII**) a následně senzitivována PMA, byla exprese COX-2 i vazba NF-κB na DNA oproti kontrole signifikantně snížena (Keum *et al.*, 2003). Bylo rovněž zjištěno, že protopanaxadiolové ginsenosidy inhibují tvorbu TNF-α buňkami RAW 264.7 aktivovanými působením LPS. Pro ginsenosid Rb1 (**XXIII**) byla stanovena IC₅₀ 56,5 μmol/l (Cho *et al.*, 2001). Tento ginsenosid rovněž inhibuje produkci IL-6 stejnou aktivovanou buněčnou linií (Smolinski a Pestka, 2003).



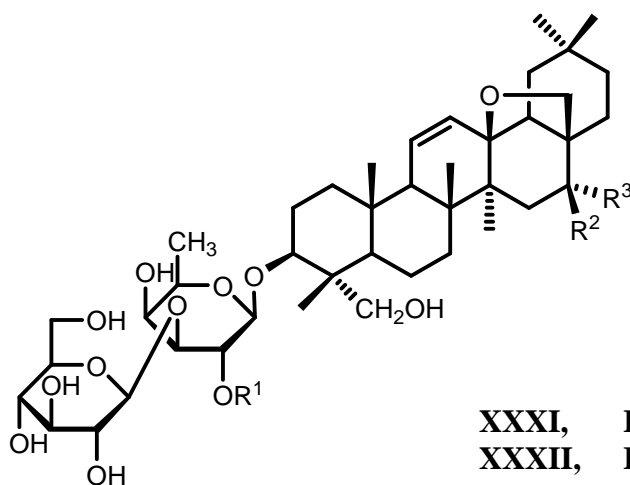
XXI,	R¹ = H R² = H R³ = H	XXV,	R¹ = H R² = O-β-Glc R³ = H
XXII,	R¹ = H R² = OH R³ = H	XXVI,	R¹ = H R² = O-(2-O-β-Glc)-β-Glc R³ = β-Glc
XXIII,	R¹ = 2-O-β-Glc-β-Glc R² = H R³ = 6-O-β-Glc-β-Glc	XXVII,	R¹ = β-Glc R² = H R³ = H
XXIV,	R¹ = H R² = H R³ = β-Glc	XXVIII,	R¹ = 2-O-β-Glc-β-Glc R² = H R³ = H

Několik saponinů se zajímavou protizánětlivou aktivitou bylo izolováno z kořene východoasijského boubelíku většího (*Platycodon grandiflorum*). Tato rostlina je používána v orientální medicíně k léčbě zánětlivých onemocnění očí a uší a také jako expektorans a antitusikum. Saponiny z boubelíku, tzv. platycodiny, obsahují ve své molekule kromě sacharidové složky vázané glykosidicky také sacharid vázaný esterovou vazbou. Bylo zjištěno, že neaktivnějším platycodinem je platycodin D (**XXIX**), který inhibuje produkci PGE₂ myšími peritoneálními makrofágy stimulovanými PMA (IC₅₀ = 10 μmol/l). Strukturně velmi blízký platycodin D₃ (**XXX**) na tvorbu PGE₂ vliv nemá. Aktivita enzymů COX-1 a COX-2 *in vitro* není inhibována ani platycodinem D (**XXIX**) ani platycodinem D₃ (**XXX**) (Kim *et al.*, 2001). Později byla rovněž testována inhibiční aktivita platycodinů na produkci NO v buňkách RAW 264.7 stimulovaných LPS a IFN-γ. Pro platycodin D (**XXIX**) byla stanovena IC₅₀ 15 μmol/l a pro platycodin D₃ (**XXX**) byla hodnota IC₅₀ 55 μmol/l (Wang *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že mechanismus inhibice tvorby NO a PGE₂ platycodinem D (**XXIX**) spočívá v inhibici degradace proteinu IκB, což vede k inhibici exprese iNOS a COX-2 (Ahn *et al.*, 2005). Ukázalo se také, že esterově vázaný oligosacharid obsažený v molekule platycodinu D (**XXIX**) je důležitý pro jeho biologickou aktivitu. Je-li z molekuly odstraněn, nemá získaná sloučenina žádný z účinků popsaných výše (Chung *et al.*, 2008).



XXIX, R = H
XXX, R = β -Glc

Z několika druhů prorostlíku (*Bupleurum sp.*), japonsky zvaného „saiko“, a krtičníku (*Scrophularia sp.*) byly izolovány tzv. saikosaponiny. Byla u nich prokázána protizánětlivá aktivita *in vivo* (Navarro *et al.*, 2001). Saikosaponin 1 (**XXXI**) v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ inhibuje tvorbu PGE_2 a LTC_4 myšími peritoneálními makrofágy stimulovanými ionoforem A23187 z 75,0 %, resp. 90,5 % (Bermejo Benito *et al.*, 1998). Velmi zajímavý je vliv saikosaponinu-d (**XXXII**) na aktivaci T-lymfocytů. Saikosaponin-d (**XXXII**) v koncentraci 5 - 20 $\mu\text{mol/l}$ signifikantně inhibuje expresi proteinů CD69 a CD71 na povrchu myších T-lymfocytů aktivovaných konkanavalinem A. Navíc saikosaponin-d (**XXXII**) inhibuje i produkci IL-2. Bylo zjištěno, že saikosaponin-d (**XXXII**) ovlivňuje signální dráhu T-buněk na několika místech. Jedná se o ovlivnění funkce proteinkinázy C, $\text{I}\kappa\text{B}$ a c-Jun terminální kinázy (Leung *et al.*, 2005).

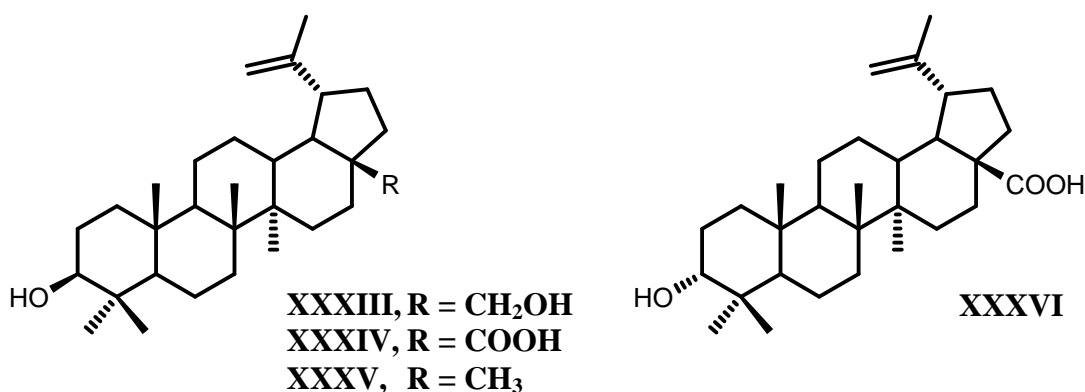


XXXI, R¹ = β -Glc, R² = OH, R³ = H
XXXII, R¹ = H, R² = H, R³ = OH

1.4 Betulin, betulinová kyselina a lupeol

Betulin (**XXXIII**) je diol s lupanovým skeletem, jenž byl izolován z celé řady vyšších rostlin. Jeho název je spojen s břízou (*Betula sp.*), neboť byl již v 18. století získán právě ze svrchních vrstev březové kůry (Lowitz, 1788), kde tvoří až 30 % suché hmotnosti. Stejně tak i rozšíření betulinové kyseliny (**XXXIV**) je poměrně široké. Je možné ji získat např. extrakcí kůry platanu (*Platanus hispanica*) (Urban *et al.*, 2004). Triterpenoidní alkohol lupeol (**XXXV**) můžeme najít v ovoci, například v jahodách, fíkách a mangu (Chaturvedi *et al.*, 2008). Vyskytuje se často spolu s betulinem (**XXXIII**) (Džubák *et al.*, 2006).

Protizánětlivá aktivita betulinu (**XXXIII**) a betulinové kyseliny (**XXXIV**) je mírná a projevuje se často až ve vyšších koncentracích, přesto však byla prokázána *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Cichewicz a Kouzi, 2004). Bylo zjištěno, že betulinová kyselina (**XXXIV**) v koncentraci 200 µg/ml (tj. 438 µmol/l) inhibuje enzymovou aktivitu hovězí cyklooxygenázy z 52 % (Dunstan *et al.*, 1998). Později se ukázalo, že betulin (**XXXIII**) i betulinová kyselina (**XXXIV**) mohou do metabolismu eikosanoidů zasáhnout také na úrovni fosfolipázy A₂. Tento enzym hydrolyzuje esterovou vazbu fosfolipidů v poloze sn-2 a může tak uvolnit arachidonovou kyselinu, prekurzor eikosanoidů. Betulin (**XXXIII**) a betulinová kyselina (**XXXIV**) v koncentraci 5 µmol/l inhibují fosfolipázu A₂ z 30 %, resp. 40 %. Pomocí bioinformatické studie bylo ověřeno, že se betulinová kyselina (**XXXIV**) může navázat do vazebného místa fosfolipázy A₂ (Bernard *et al.*, 2001).



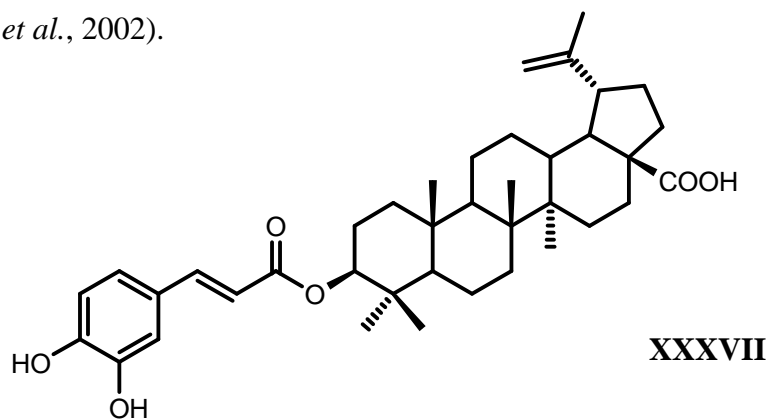
Betulin (**XXXIII**) v buňkách RAW 264.7 stimulovaných LPS inhibuje produkci PGE₂ (IC₅₀ = 12,9 µmol/l) a produkci NO (IC₅₀ = 5,0 µmol/l). Inhibice tvorby PGE₂ byla rovněž zjištěna u lupeolu (**XXXV**) (IC₅₀ = 18,0 µmol/l). Jako velmi aktivní se ukázala *epi*-betulinová kyselina (**XXXVI**), která inhibuje syntézu PGE₂ s IC₅₀ 0,6 µmol/l a tvorbu NO s IC₅₀ 0,7 µmol/l (Reyes *et al.*, 2005). V *in vivo* pokusu na myších byla u lupeolu

(XXXV) prokázána inhibice exprese COX-2 a iNOS po stimulaci PMA (Saleem *et al.*, 2004). Betulinová kyselina (XXXIV) má inhibiční vliv na aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B působením peroxidu vodíku, PMA, TNF a cigaretového kouře. Rovněž byla pozorována inhibice exprese COX-2 a exprese metaloproteinázy-9, jež jsou řízeny právě pomocí NF- κ B (Takada a Aggarwal, 2003). Při studiu účinku betulinové kyseliny (XXXIV) na buňky RAW 246.7 stimulované LPS bylo objeveno, že produkce NO je sice inhibována, ale dochází ke stimulaci tvorby prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β (Yun *et al.*, 2003). Pomocí buněčných kultur z plně lidské krve stimulovaných LPS a fytohemaglutininem bylo zjištěno, že také betulin (XXXIII) stimuluje tvorbu TNF- α . Naproti tomu betulinová kyselina (XXXIV) má na tento studovaný systém za použití stejného zkoumaného systému imunomodulační efekt, neboť inhibuje tvorbu IFN- γ a mírně stimuluje produkci IL-10 (Zdzisińska *et al.*, 2003).

Byl rovněž studován vliv betulinu (XXXIII), betulinové kyseliny (XXXIV) a lupeolu (XXXV) na produkci ROS v lidských neutrofilech po působení různých stimulů. Byl-li použit *N*-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin, inhibiční efekt na produkci superoxidových aniontů měl jak betulin (XXXIII), tak lupeol (XXXV). V případě použití PMA byl inhibiátorem pouze betulin (XXXIII), naopak při stimulaci arachidonovou kyselinou byl pozorován inhibiční účinek pouze u lupeolu (XXXV). Betulinová kyselina (XXXIV) neměla v žádném z případů na produkci ROS vliv (Yamashita *et al.*, 2002).

cAMP fosfodiesteráza D₄ (EC 3.1.4.53) je jedním z molekulárních cílů protizánětlivých léčiv. Její inhibice se uplatňuje například při léčbě astmatu a chronických obstrukčních plicních chorob. Betulinová kyselina (XXXIV) je mírným inhibiátorem fosfodiesterázy D₄ s hodnotou IC₅₀ 125,0 μ mol/l (Weniger *et al.*, 2005).

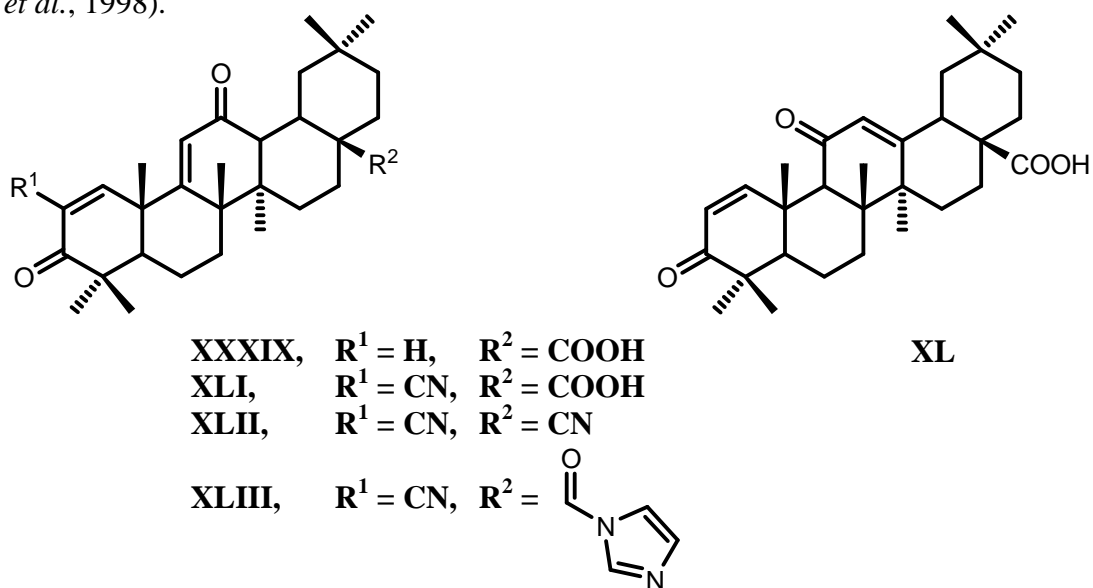
Z oleje z pupalky dvouleté (*Oenothera biennis*) byl získán ester XXXVII s velmi zajímavou biologickou aktivitou. Tento derivát má inhibiční efekt na lidskou leukocytární elastázu (IC₅₀ = 0,32 μ mol/l), dále inhibuje enzymovou aktivitu COX-1 s IC₅₀ 0,12 μ mol/l a COX-2 s IC₅₀ 2,5 μ mol/l. Zároveň se jedná o účinný zhášec volných radikálů (Hamburger *et al.*, 2002).



2. SYNTETICKÉ TRITERPENOIDNÍ DERIVÁTY

2.1 Oleananové a ursanové deriváty

Výsledky testování biologické aktivity ursolové kyseliny (**IX**) a oleanolové kyseliny (**X**) vedly k syntéze jejich dalších derivátů s výraznější protizánětlivou aktivitou. Vědci z americké Dartmouth College v Hanoveru připravili víc než 300 nových ursanových a oleananových derivátů a zajímali se o vztah mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou (Liby *et al.*, 2007). V první sérii derivátů byly připraveny kyseliny **XXXIX** a **XL**, které výrazně inhibují produkci NO myšimi peritoneálními makrofágy stimulovanými IFN- γ s IC_{50} 0,9 $\mu\text{mol/l}$, resp. 1,8 $\mu\text{mol/l}$. Ukázalo se, že enonové uspořádání na kruzích A a C zvyšuje aktivitu derivátů, a dále bylo zjištěno, že oleananové deriváty jsou aktivnější než deriváty s ursanovým skeletem (Honda *et al.*, 1997). Mechanismus účinku kyseliny **XL** spočívá v inhibici exprese proteinů iNOS a COX-2 (Suh *et al.*, 1998).



Derivatizací kyseliny **XXXIX** v poloze 2 byla získána kyselina **XLI**, zvaná též CDDO. Označení CDDO je zkratka názvu: 2-kyano-3,12-dioxoolea-1,9(11)-dien-28-ová kyselina. CDDO (**XLI**) silně inhibuje tvorbu NO stimulovanými myšimi peritoneálními makrofágy ($IC_{50} = 0,4 \text{ nmol/l}$) (Honda *et al.*, 1998). Také CDDO (**XLI**) inhibuje *de novo* syntézu iNOS a COX-2, a to jak v makrofázích, tak i ve stěvních fibroblastech. Současně bylo potvrzeno, že aktivita derivátů kyseliny **XL** závisí na charakteru funkční skupiny v poloze 2. Přítomnost elektronakceptorní skupiny jako je kyanoskupina nebo karboxylová

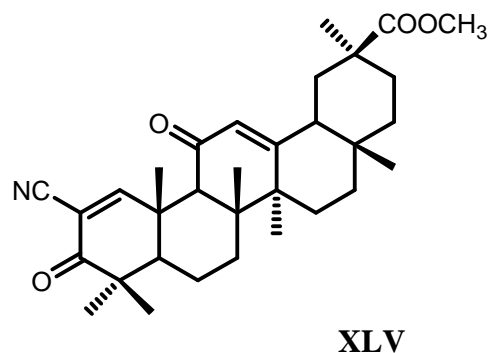
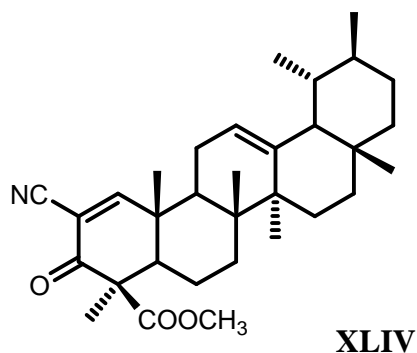
skupina aktivitu zvyšuje, naopak elektrondonorními skupinami (např. halogeny) je aktivita derivátu snížena (Honda *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 2000). CDDO (**XLI**) rovněž způsobuje diferenciaci leukemické buněčné linie LCDB na monocyty (Suh *et al.*, 1999).

Při artritidě a osteoartritidě dochází ke zvýšené produkci matrixové metaloproteinázy-1 a metaloproteinázy-13 v chrupavkové tkáni. Působením CDDO (**XLI**) v koncentraci 0,3 $\mu\text{mol/l}$ je exprese těchto enzymů v lidských chondrocytech stimulovaných IL-1 signifikantně snížena (Elliot *et al.*, 2003).

Pro své silné cytotoxické působení na široké spektrum nádorových linií je CDDO (**XLI**) v současnosti v první fázi klinického testování jako perspektivní protinádorové chemoterapeutikum (Liby *et al.*, 2007).

Další derivatizací CDDO (**XLI**) v poloze 28 byly získány dinitril **XLII** a imidazolid **XLIII**. Tyto deriváty jsou více než desetkrát aktivnější než CDDO (**XLI**). Hodnota IC_{50} pro inhibici tvorby NO myšími makrofágy po stimulaci $\text{IFN-}\gamma$ je u nitrilu **XLII** 3,5 pmol/l a u imidazolidu **XLIII** 14 pmol/l (Honda *et al.*, 2002). Inhibice exprese iNOS derivátem **XLIII** byla potvrzena i v *in vivo* pokusu na myších. Intraperitoneální podání 1 nmol imidazolidu **XLIII** snížilo expresi iNOS o 49 % (Place *et al.*, 2003). Derivát **XLIII** rovněž snižuje produkci prozánětlivých cytokinů $\text{TNF-}\alpha$ a IL-6 a také ROS v neutrofilech stimulovaných LPS. Ukázalo se, že imidazolid **XLIII** zvyšuje aktivitu transkripčního faktoru Nrf2, který spouští expresi řady genů s antioxidantním efektem (Thimmulappa *et al.*, 2006).

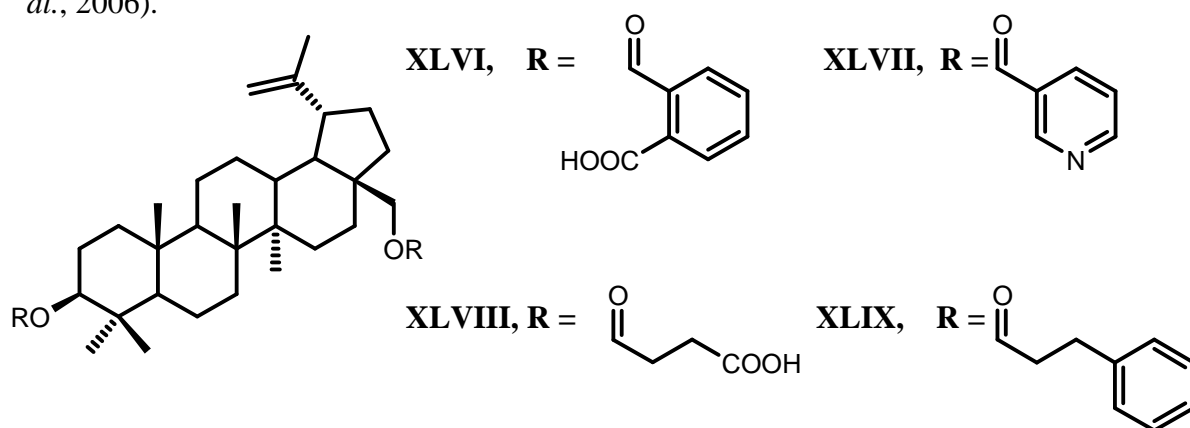
V nedávné době byly připraveny deriváty β -boswelové kyseliny (**II**) a glycyrrhetové kyseliny (**XIX**) nesoucí stejnou modifikaci kruhu A jako CDDO (**XLI**). Také u těchto derivátů byla zjištěna inhibice tvorby NO u myších makrofágů po stimulaci $\text{IFN-}\gamma$. U derivátu **XLIV**, odvozeného od β -boswelové kyseliny (**II**), byla naměřena IC_{50} 74 nmol/l , u derivátu **XLV**, odvozeného od glycyrrhetové kyseliny (**XIX**), byla hodnota IC_{50} 173 nmol/l (Subba Rao *et al.*, 2008).



2.2 Lupanové deriváty

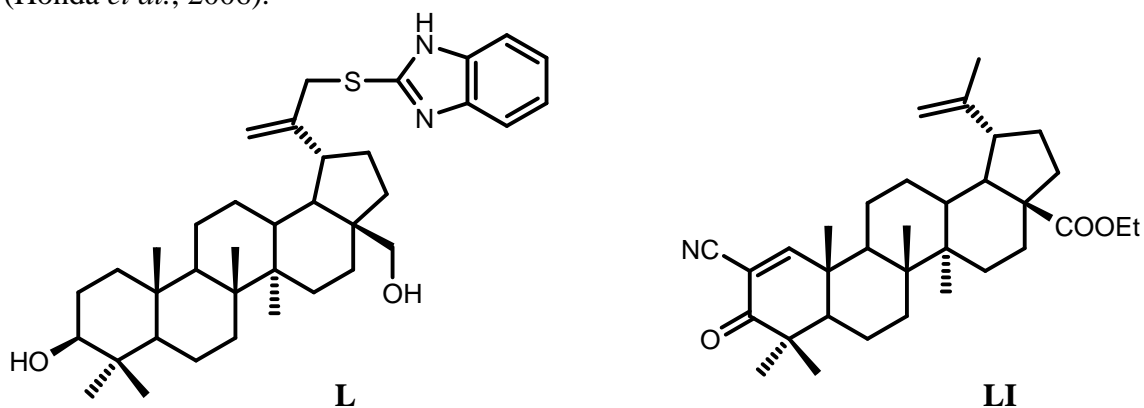
Zatímco protizánětlivé účinky syntetických ursanových a oleananových derivátů byly intenzivně zkoumány, lupanovým derivátům bylo věnováno jen několik prací.

Protizánětlivé účinky byly objeveny u některých esterů betulinu (**XXXIII**). Deriváty **XLVI** a **XLVII** chrání před tvorbou žaludečních vředů, stimulují imunitní odpověď a zvyšují počet fagocytů ve tkáni (Tolstikova *et al.*, 2006). U esterů **XLVIII** a **XLIX** byla zjištěna *in vivo* protizánětlivá aktivita srovnatelná s ortofenem (Tolstikova *et al.*, 2006).



Protizánětlivý účinek byl rovněž zjištěn u sirných derivátů betulinu (**XXXIII**). Aktivita derivátu **L** v testu inhibice edému tlapy u potkana je srovnatelná s diklofenakem. Derivát **L** inhibuje otok z 44,6 % a diklofenak z 48,5 % (Tolmacheva *et al.*, 2005).

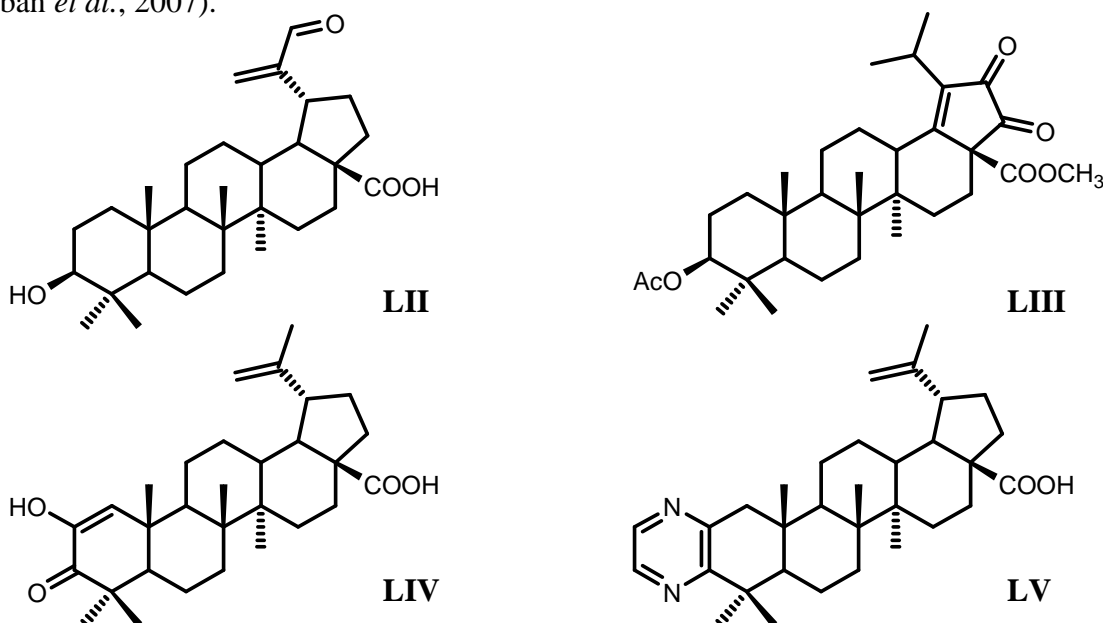
Enonové uspořádání na kruhu A, stejně jako zavedení kyanoskupiny do polohy 2, osvědčené ze syntézy CDDO (**XLI**) a příbuzných sloučenin, bylo použito i při přípravě nových derivátů odvozených od betulinové kyseliny (**XXXIV**). Ukázalo se, že u lupanových derivátů není pro jejich aktivitu nutná modifikace kruhu C a že různé deriváty karboxylové funkce v poloze 28 mají obdobnou účinnost. Jako nejaktivnější se ukázal ester **LI**, jehož aktivita stanovená pomocí inhibice produkce NO v buňkách RAW 264.7 stimulovaných IFN- γ je shodná s aktivitou CDDO (**XLI**) ($IC_{50} = 20$ nmol/l) (Honda *et al.*, 2006).



2.3 Betulininy

Jako betulininy jsou označovány látky pocházející ze Skupiny přírodních látek Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Tyto triterpenoidní sloučeniny s lupanovým, des-E-lupanovým a oleananovým skeletem byly připraveny derivatizací betulinu (**XXXIII**) a betulinové kyseliny (**XXXIV**). U betulininů byla objevena *in vitro* cytotoxická aktivita vůči širokému spektru nádorových linií (Šarek *et al.*, 2003).

Mezi lupanovými deriváty mají nejvýraznější cytotoxickou aktivitu kyselina **LII** a diketon **LIII** s hodnotou IC_{50} 4 $\mu\text{mol/l}$, resp. 4,4 $\mu\text{mol/l}$ vůči buněčné linii CEM (Šarek *et al.*, 2003). Byly připraveny rovněž aktivní deriváty s modifikovaným kruhem A. Patří mezi ně diosfenol **LIV** (IC_{50} = 4 $\mu\text{mol/l}$) (Urban *et al.*, 2004) a pyrazin **LV** (IC_{50} = 8 $\mu\text{mol/l}$) (Urban *et al.*, 2007).



Zástupcem aktivních oleananových derivátů je aminoalkohol **LVI** (IC_{50} = 5 $\mu\text{mol/l}$) (Urban, 2005). Nejvýraznější cytotoxická aktivita byla zaznamenána u β -ketokyseliny **LVII**, která má des-E-lupanový skelet (IC_{50} = 1 $\mu\text{mol/l}$) (Šarek *et al.*, 2003). Látky s velmi zajímavou cytotoxicitou byly nalezeny i mezi 2-deoxyglykosidy a kvartérními amoniovými solemi betulininů (Spáčilová, 2008; Biedermann, 2008). U několika derivátů ze skupiny betulininů byla nalezena inhibice produkce NO u buněk B10R stimulovaných LPS (Spáčilová, 2007).



3. TESTOVÁNÍ PROTIZÁNĚTLIVÝCH ÚČINKŮ

3.1 Testování inhibice tvorby NO

Enzym NO syntáza katalyzuje reakci, při níž vzniká z L-argininu a dvou molekul kyslíku L-citrulin a jedna molekula oxidu dusnatého. Existuje několik podrodin NO syntáz. Obecně je však můžeme rozdělit do dvou skupin – konstitutivní NO syntázy a indukovatelné NO syntázy. Indukovatelná NO syntáza (iNOS) je enzym, který je exprimován například v makrofázích, mikroglíích, keratinocytech a hepatocytech. Signálem k expresi iNOS jsou bakteriální produkty a prozánětlivé cytokiny. Oxid dusnatý je iNOS produkován v koncentraci v řádu $\mu\text{mol/l}$ (Murakami a Ohigashi, 2007). Oxid dusnatý má antimikrobiální účinek, reguluje produkci cytokinů a jeho působením dochází k dilataci cév a vzniku otoku. Oxid dusnatý však může rovněž způsobovat destrukci tkáně. Vysoké koncentrace dosahuje NO u pacientů s astmatem, revmatoidní artritidou, osteoartritidou a ulcerózní kolitidou (Tripathi *et al.*, 2007). Testování inhibice produkce NO makrofágy *in vitro* je proto důležitou metodou pro hledání potenciálních léčiv.

Sledování inhibice produkce NO *in vitro* spočívá v kultivaci peritoneálních makrofágů nebo makrofágových buněčných linií s LPS, který stimuluje toll-like receptor 4, či IFN- γ po dobu 24 až 72 hodin. Vzhledem k tomu, že NO je reaktivní sloučenina, která se snadno za přítomnosti kyslíku ve vodném prostředí oxiduje na dusitanový (nitritový) anion (NO_2^-), je možné stanovit množství uvolněného NO pomocí Griessova činidla (Green *et al.*, 1994). Griessovo činidlo je roztok sulfanilamidu a *N*-(1-naftyl)ethylendiaminu ve vodné kyselině fosforečné. Za přítomnosti dusitanů dochází sledem dvou reakcí ke vzniku růžově zbarvené azosloučeniny (Schéma 1) (Ivanov, 2004). Obsah dusitanů je následně stanoven spektrofotometricky při 540 nm.

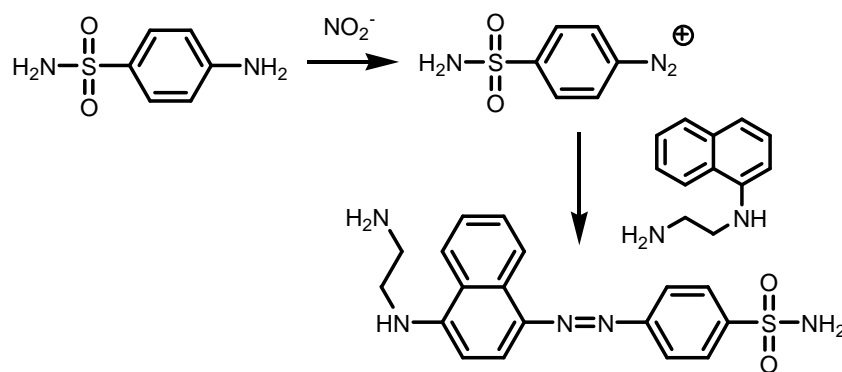


Schéma 1: Stanovení dusitanů Griessovým činidlem

3.2 Testování inhibice tvorby ROS

Při fagocytóze dochází v buňkách imunitního systému jako jsou neutrofilů a makrofágy k respiračnímu (oxidativnímu) vzplanutí. Při tomto procesu fagocyty produkují značné množství ROS, které slouží jako toxické agens k likvidaci patogenů. Při fagocytóze dochází k aktivaci enzymu NADPH oxidázy (EC 1.6.3.1), která katalyzuje jednoelektronovou redukci kyslíkové molekuly na superoxidový anion-radikál ($O_2^{\cdot-}$). Vzniká rovněž peroxid vodíku a kyselina chlorná. Katalytická podjednotka NADPH oxidázy gp91^{phox} je membránově vázaná (Lambeth *et al.*, 2007). Nedostatečná, nebo naopak nadměrná aktivita NADPH oxidázy vede k závažným onemocněním. U pacientů s chronickou granulomatózou nejsou fagocyty schopny likvidovat mikroorganismy, neboť jejich NADPH oxidáza je defektní (Bilitewski, 2008). Naopak u roztroušené sklerózy, autoimunitního onemocnění nervové soustavy, dochází k fagocytóze myelinu a nadměrné produkci ROS (Liu *et al.*, 2006).

Respirační vzplanutí u fagocytů lze vyvolat *in vitro* jejich inkubací s živými, či usmrcenými mikroorganismy, jako jsou bakterie a kvasinky, nebo zymosanem, polysacharidem kvasinkové buněčné stěny, či latexovými perličkami. Obvykle se využívá inkubace po dobu 10 až 120 minut. Produkci ROS při fagocytóze lze sledovat několika metodami. Je možné například sledovat fluorescenci ethidiového kationtu vzniklého oxidací hydroethidinu superoxidovými anionty. Superoxidový anion rovněž může předat svůj nepárový elektron oxidované formě cytochromu c (Fe^{3+}). Vzniká cytochrom c (Fe^{2+}), který je možno stanovit spektrofotometricky při 550 nm. Na podobném principu je založeno i stanovení ROS pomocí tetrazoliových solí. K testování produkce ROS se rovněž využívá chemiluminiscence, tedy chemická reakce, při které vzniká světlo. Chemiluminiscenční metody vynikají nízkým detekčním limitem, specifita reakce mezi luminiscenční sondou (např. luminolem) a superoxidovými anionty však není úplná, neboť k luminiscenci dochází i za přítomnosti jiných ROS. Emitované záření je kvantifikováno pomocí luminometru (Bilitewski, 2008; Bartosz, 2006).

3.3 Testování zhášení radikálů v bezbuněčném systému

Z výsledků testování inhibice produkce NO a ROS v buňkách není možno určit, zda testovaná látka ovlivňuje metabolismus buňky, nebo pouze interaguje s NO a ROS (např. superoxidovým aniontem) a snižuje tak jejich koncentraci. Jak NO,

tak superoxidový anion jsou radikály a z toho vyplývá i jejich vysoká reaktivita. Zhášeče neboli scavengery s radikály ochotně reagují a chrání tak okolní biomolekuly před jejich neblahým působením.

Při testování zhášení radikálů v bezbuněčném systému jsou radikály generovány pomocí chemických reakcí. K tvorbě NO se užívá nitroprusid sodný (pentakyanonitrosylželezitan sodný, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), který samovolně uvolňuje NO. Superoxidové anionty bývají generovány enzymaticky pomocí xanthin oxidázy (EC 1.17.3.2) a jejich substrátů xanthinu nebo hypoxanthinu, či reakcí fenazin methosulfátu se vzdušným kyslíkem za přítomnosti NADH (Magalhães *et al.*, 2008). K detekci NO a superoxidových aniontů se následně mohou využít metody zmíněné v kapitolách 3.1 a 3.2.

3.4 Testování cytotoxického účinku pomocí MTT testu

Při dlouhodobější inkubaci buněk s testovanou látkou je třeba vzít v úvahu, že testovaný derivát může mít cytotoxický efekt a může tak zkreslovat výsledky prováděného testu. Například zjistíme-li snížení produkce NO oproti kontrole, není možno určit, zdali je tento výsledek způsoben inhibičním působením testovaného derivátu na iNOS či další proteiny signální kaskády způsobující její indukci, nebo cytotoxicitou testované sloučeniny. Proto je vhodné provádět paralelně test viability buněk.

MTT test se používá k *in vitro* stanovení rezistence primárních nádorových buněk k cytostatikům a ke stanovení cytotoxicity nových sloučenin vůči nádorovým buněčným liniím. Buňky jsou nejprve inkubovány s testovaným derivátem. Délka inkubace bývá 24 hodin až 4 dny v závislosti na typu použité buněčné linie. Následně je přidáno MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). MTT je žlutě zbarvená tetrazoliová sůl, která je v mitochondriích živých buněk redukována na fialový formazan pomocí NADH a NADPH (Schéma 2). Inkubace s MTT by měla trvat minimálně 1,5 h. Vzniklý formazan je nerozpustný ve vodě, a proto musí být rozpuštěn pomocí roztoku isopropanolu nebo dodecylsulfátu sodného. Používá se také dimethylsulfoxid. Obsah formazanu je následně stanoven spektrofotometricky při 540 nm. MTT test může být prováděn také v 96-jamkových panelech a vyhodnocován pomocí ELISA readeru (Hayon *et al.*, 2003). Z naměřených hodnot absorbance je možné vypočítat hodnotu IC_{50} , což je koncentrace testované sloučeniny, která usmrtí právě 50 % buněk.

Mezi výhody použití MTT testu oproti jiným metodám stanovení viability buněk je jednoduchost provedení, které nevyžaduje speciální vybavení, a možnost otestovat poměrně velké množství derivátů v relativně krátkém čase. Pomocí MTT testu je rovněž možné zjistit viabilitu buněk, které se nedělí. Problémy naopak může způsobit nedostatek glukózy, NADH či NADPH v kultivačním médiu. K redukci MTT také může docházet i v časných stádiích apoptózy, pokud jsou mitochondrie stále intaktní. Některé deriváty ovlivňují aktivitu mitochondrií a mohou tak zkreslovat výsledky MTT testu (Hayon *et al.*, 2003).

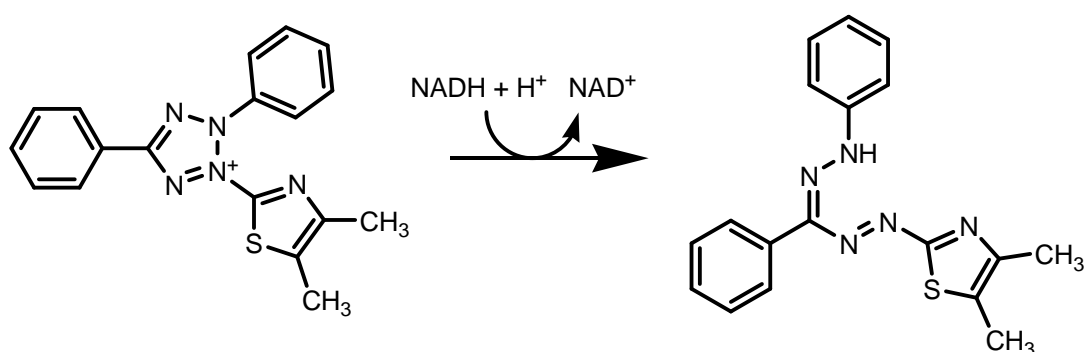


Schéma 2: Redukce žlutého MTT na fialový formazan

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. METODIKA

4.1 Obecné poznámky k experimentální části

Pro screening *in vitro* biologických aktivit vybraných sloučenin byla použita buněčná linie myších makrofágů B10R (Barrera *et al.*, 1994), získaná od Dr. Danuty Radzioch (Montreal, Kanada), a RAW 264.7 (ATCC[®] number: TIB-71TM). Buňky B10R byly pěstovány v plastových kultivačních lahvích (80 cm²) v kultivačním médiu DMEM s glukózou (5 g/l), L-glutaminem (2 mmol/l), penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), 10% fetálním hovězím sérem a NaHCO₃. Buňky RAW 264.7 byly pěstovány v plastových kultivačních lahvích (80 cm²) v kultivačním médiu RPMI-1640 s L-glutaminem (2 mmol/l), penicilinem (100 U/ml), streptomycinem (100 µg/ml), 10% fetálním hovězím sérem a NaHCO₃. Buňky byly pěstovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Absorbance byly měřeny na přístroji Labsystem iEMS Reader MF (Velká Británie), luminiscence byla měřena na luminometru DiGene DCR-1 (USA). Ke zpracování naměřených hodnot byl použit software Chemorezist (verze 2.0.1) (Regner *et al.*, 2000).

Testované sloučeniny byly získány ze Skupiny přírodních látek Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. MTT, LPS (katalogové číslo L4391), luminol, fenazin methosulfát a NADH byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (ČR). Griessovo činidlo (*N*-(1-naftyl)ethylendiamin 0,1% (hmot.), sulfanilamid 1% (hmot.), kyselina fosforečná 2% (obj.) v deionizované vodě) bylo připravováno čerstvé. Testované látky byly rozpuštěny v 10% roztoku dimethylsulfoxidu ve fyziologickém roztoku tak, aby byl získán zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l. Další roztoky testovaných látek byly získány ředěním zásobního roztoku kultivačním médiem nebo pufrem.

Opsonizovaný zymosan byl připravován podle následujícího postupu. Lidské sérum bylo získáno z plné krve zdravých dobrovolníků. Byla připravena suspenze zymosanu v deionizované vodě v koncentraci 10 mg/ml. Tato suspenze byla nejprve 20 minut zahřívána k varu na vodní lázni a následně sterilizována v autoklávu. Sterilní suspenze zymosanu pak byla zcentrifugována a peleta byla dvakrát promyta fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS) a naředěna na koncentraci 10 mg/ml. Suspenze zymosanu v PBS (10 mg/ml) byla smíchána se sérem v poměru 2:1 a byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Následně byla směs zcentrifugována a peleta byla dvakrát promyta PBS. Opsonizovaný zymosan byl pak naředěn PBS na konečnou koncentraci

10 mg/ml. Získaná suspenze byla uschovávána v lednici. Nikdy nebyl použit opsonizovaný zymosan starší jednoho týdne.

4.2 Testování inhibice produkce NO a MTT test

Byla připravena suspenze buněk B10R o koncentraci $3,75 \times 10^5$ buněk/ml v kultivačním médiu DMEM se suplementy (viz kapitola 4.1) a s LPS (konečná koncentrace LPS 5 $\mu\text{g/ml}$). Do 96-jamkového panelu byl napipetován roztok testované látky (20 μl) v kultivačním médiu v šesti koncentracích (nejvyšší koncentrace 1,25 mmol/l, roztoky s nižší koncentrací byly získány čtyřnásobným zředěním předchozího roztoku). Do jamek panelu byla přidána buněčná suspenze (80 μl). Nejvyšší konečná koncentrace testované sloučeniny byla 250 $\mu\text{mol/l}$. Každá koncentrace byla testována v dubletu. Jako pozitivní kontrola byla použita buněčná suspenze (80 μl) s přídatkem kultivačního média (20 μl). Jako blank bylo použito kultivační médium (100 μl). Nákres panelu je na Schématu 3. Panel byl inkubován 24 hodin v CO_2 termostatu při 37 °C a v atmosféře 5% CO_2 . Po inkubaci byl panel zcentrifugován (7 minut, 300 \times g) a 50 μl supernatantu z jednotlivých jamek bylo odpipetováno do prázdného 96-jamkového panelu. Do všech jamek se supernatantem bylo přidáno Griessovo činidlo (50 μl). Panel byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě a následně byly na ELISA readeru změřeny absorbance při 540 nm. Do všech jamek panelu s buňkami a zbylým supernatantem byl přidáno 5 μl roztoku MTT (5 mg/ml) a panely byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 5% CO_2 další 4 hodiny. Žlutá tetrazoliová sůl byla redukována na modrý formazan pouze živými buňkami. Formazanové krystaly byly rozpuštěny pomocí 50 μl 10% vodného roztoku dodecylsulfátu sodného (pH = 5,5) přes noc při 37 °C. Následně byly na ELISA readeru změřeny absorbance při 540 nm. Testování bylo prováděno ve třech opakováních, a to na buňkách z různých pasáží. Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru Chemorezist a byly vypočteny hodnoty IC_{50} .

Stejný postup testování byl použit i pro testování vlivu derivátů na produkci NO a MTT test bez LPS. Rozdílná byla pouze výchozí buněčná suspenze, do které nebyl přidán LPS.

4.3 Testování inhibice produkce ROS

Byla připravena suspenze buněk RAW 264.7 o koncentraci $1,0 \times 10^6$ buněk/ml v kultivačním médiu RPMI-1640 se suplementy (viz kapitola 4.1). Buněčná suspenze

(0,5 ml) byla napipetována do luminiscenční zkušavky a inkubována 15 minut v CO₂ termoboxu při 37 °C v atmosféře 5% CO₂, aby buňky mohly přisednout. Pak bylo v čase t = 0 min k buněčné suspenzi přidáno 10 µl roztoku testované látky v kultivačním médiu (2,55 mmol/l a dále byly testovány další dvě koncentrace vzniklé čtyřnásobným a šestnáctinásobným ředěním tohoto roztoku). Konečné koncentrace testované látky byly 50 µmol/l, 12,5 µmol/l a 3,13 µmol/l. Buňky byly inkubovány s testovanou sloučeninou v termoboxu a inkubace byla přerušena přidáním 100 µl 1,24 mM roztoku luminolu v PBS a 100 µl suspenze opsonizovaného zymosanu v PBS (10 mg/ml) v čase t = 30 min. Konečná koncentrace luminolu činila $1,75 \times 10^{-4}$ mol/l a konečná koncentrace opsonizovaného zymosanu byla 1,41 mg/ml. Dále byly buňky inkubovány s opsonizovaným zymosanem v termoboxu 20 minut a pak byla měřena luminiscence v časech t = 50, 56 a 62 min. Měření trvalo vždy 30 s. Pro výpočet byla použita nejvyšší naměřená hodnota luminiscence. Každá z testovaných koncentrací byla testována v dubletu. Kontrolní pokus byl prováděn podle stejného postupu, místo roztoku testované látky však bylo přidáno pouze kultivační médium. Testování bylo prováděno ve třech opakováních, a to na buňkách z různých pasáží. Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru MS Excel a byly vypočteny hodnoty IC₅₀.

	látka 1		látka 2		látka 3		látka 4		látka 5			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			250									
C			62,5									
D			15,6									
E			3,91									
F			0,98									
G			0,24									
H												

Schéma 3: Schéma panelu pro testování inhibice NO a MTT test. Bílá – prázdné jamky; tmavá šedá – blank; střední šedá – pozitivní kontrola; světlá šedá – jamky s testovanými látkami (jedna testovaná látka je pipetována vždy do dvou sloupců, pořadí konečných koncentrací testované látky v µmol/l je uvedeno ve sloupci 3, koncentrace testovaných látek v dalších sloupcích jsou identické)

4.4 Testování zhášení NO[•] radikálů

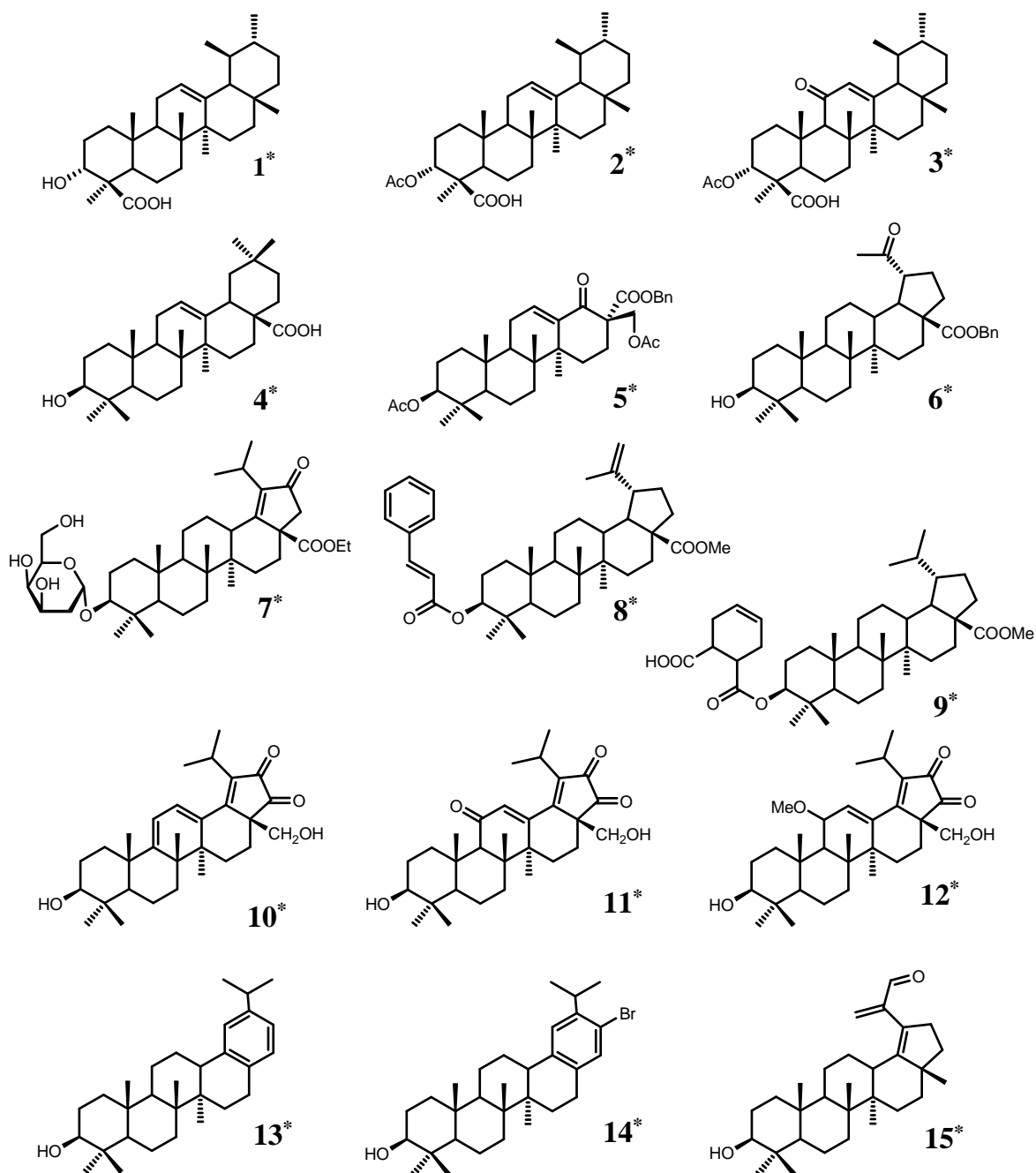
K testování zhášení NO[•] radikálů byla použita upravená metodika z literatury (Kumar *et al.*, 2005). Do 96-jamkového panelu bylo pipetováno 50 μ l roztoku testované látky ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4) v šesti různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace byla 500 μ mol/l, další koncentrace byly získány vždy čtyřnásobným zředěním předchozího roztoku. K roztokům testované sloučeniny bylo přidáno 50 μ l 20 mM roztoku nitroprusidu sodného ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4). Nejvyšší konečná koncentrace testované sloučeniny byla 250 μ mol/l, konečná koncentrace nitroprusidu sodného činila 10 mmol/l. Jako kontrola sloužil 10 mM roztok nitroprusidu sodného (100 μ l) ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4), jako blank byl použit 100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4) (100 μ l). Panel byl inkubován 6 hodin za laboratorní teploty. Poté bylo do všech jamek panelu přidáno Griessovo činidlo (100 μ l) a panel byl inkubován dalších 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly na ELISA readeru změřeny absorbance při 540 nm. Každá látka byla testována v tripletu. Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru Chemorezist a byly vypočteny hodnoty IC₅₀.

4.5 Testování zhášení O₂^{•-} radikálů

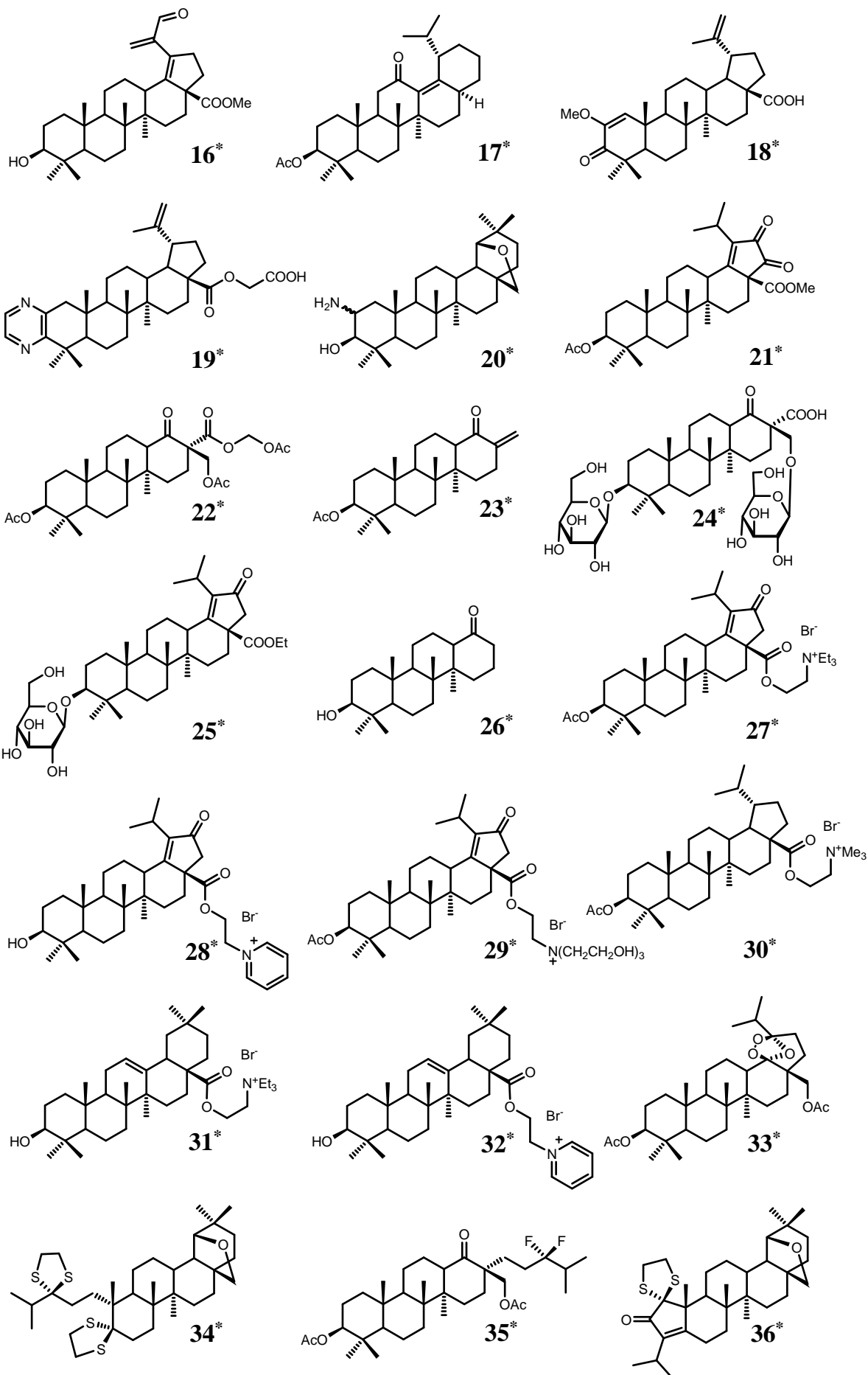
Pro testování zhášení superoxidových radikálů byla využita upravená metodika z literatury (Kumar *et al.*, 2005). Do luminometrické zkumavky bylo napipetováno 500 μ l roztoku testované látky (50 μ mol/l, 12,5 μ mol/l nebo 3,13 μ mol/l) ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4). K roztoku bylo přidáno 100 μ l roztoku luminolu (1,24 mmol/l) ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4) a 100 μ l roztoku NADH (486 μ mol/l) ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4). Naposled bylo přidáno 10 μ l roztoku fenazin methosulfátu (60 μ mol/l) ve 100 mM fosfátovém pufru (pH = 7,4), roztok byl 10 s důkladně promícháván a pak byla okamžitě změřena jeho luminiscence. Délka měření byla 30 s. Jako kontrola byl místo roztoku testované látky použit 100 mM fosfátový pufr o pH = 7,4 (500 μ l). Každá látka byla testována v tripletu. Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru MS Excel a byly vypočteny hodnoty IC₅₀.

5. STRUKTURY TESTOVANÝCH SLOUČENIN

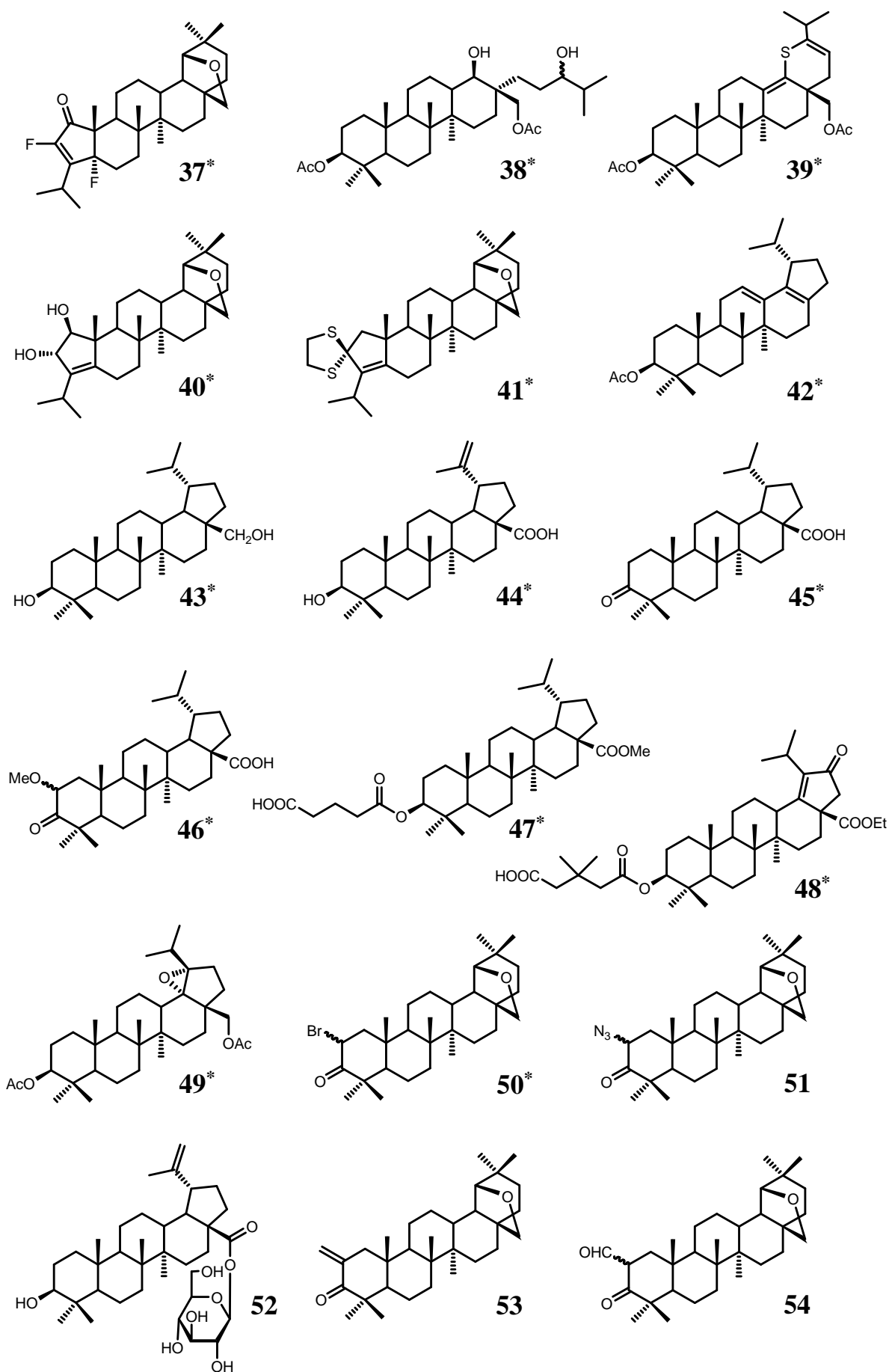
Pro testování byla vybrána rozmanitá skupina betulininů obsahující zástupce všech strukturálních typů, které byly dosud připraveny. Kritériem pro výběr byla pokud možno slabá cytotoxická aktivita vůči buněčné linii CEM. Do testování byly rovněž zařazeny sloučeniny strukturálně blízké aktivním derivátům z předchozí práce (Spáčilová, 2007). U derivátů **1*** - **4***, **43*** a **44*** byla protizánětlivá aktivita popsána již dříve (viz kapitola 1.1, 1.2 a 1.4).



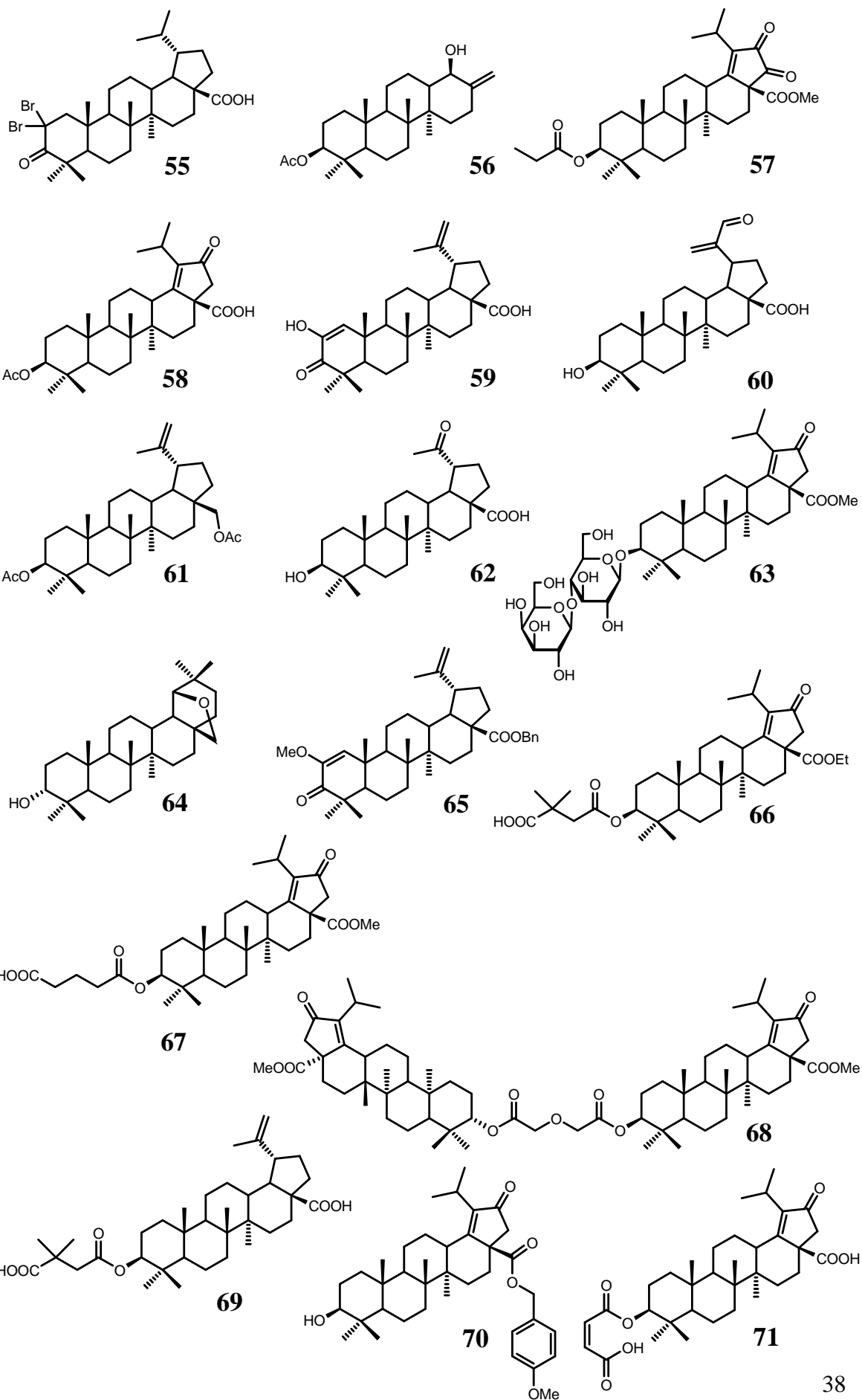
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



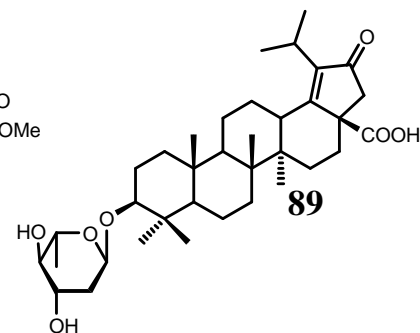
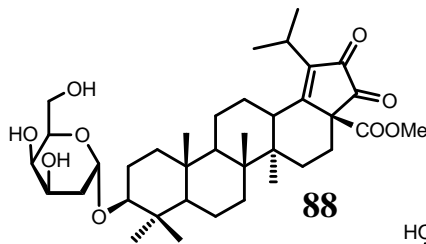
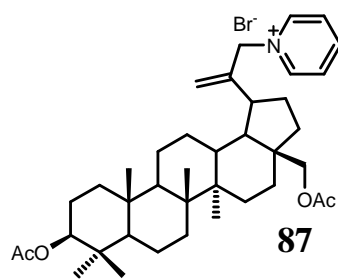
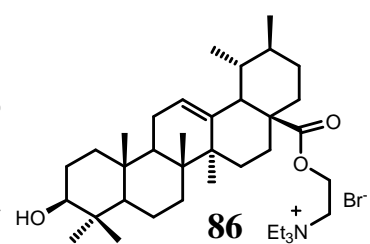
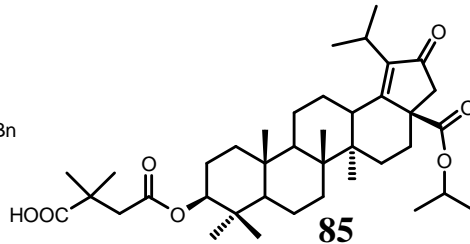
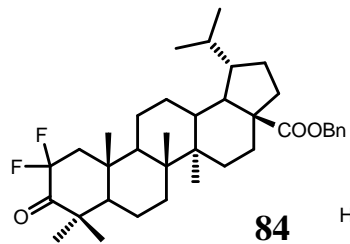
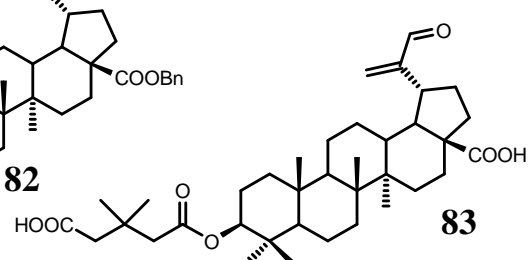
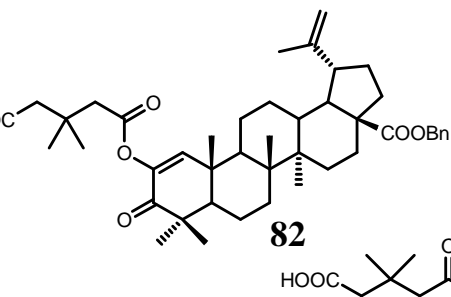
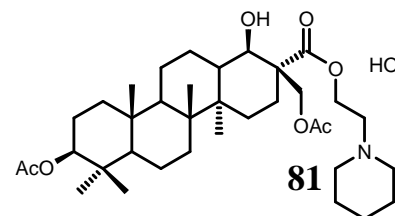
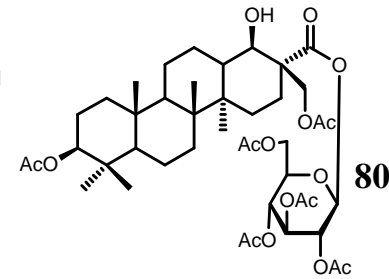
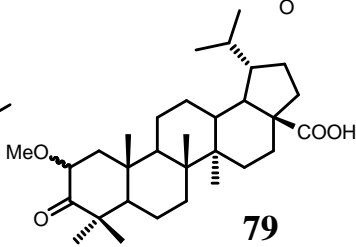
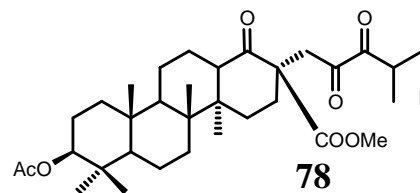
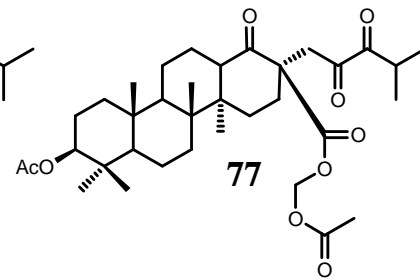
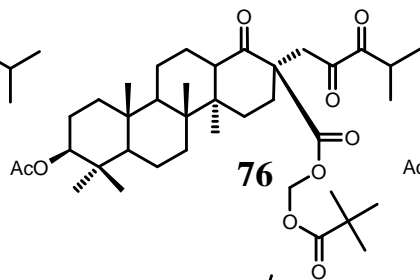
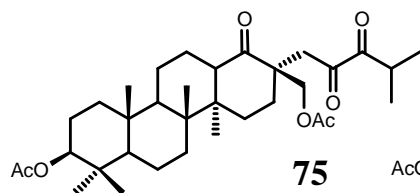
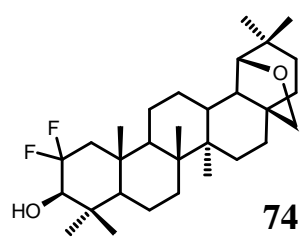
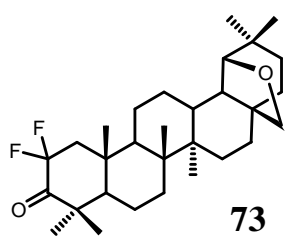
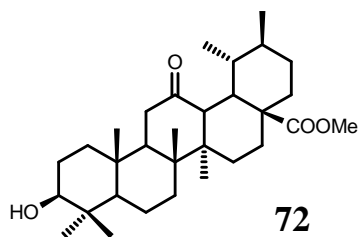
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



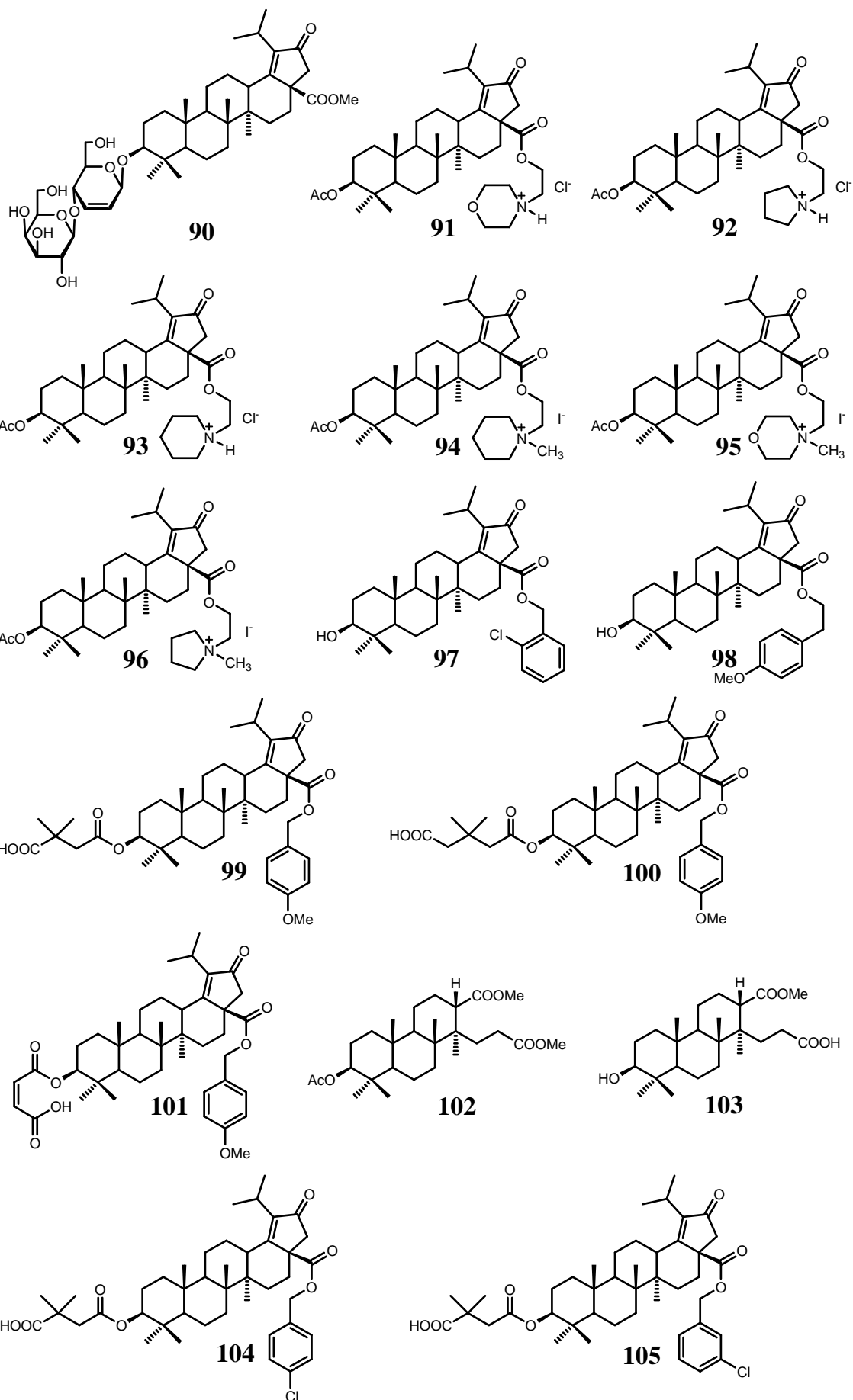
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



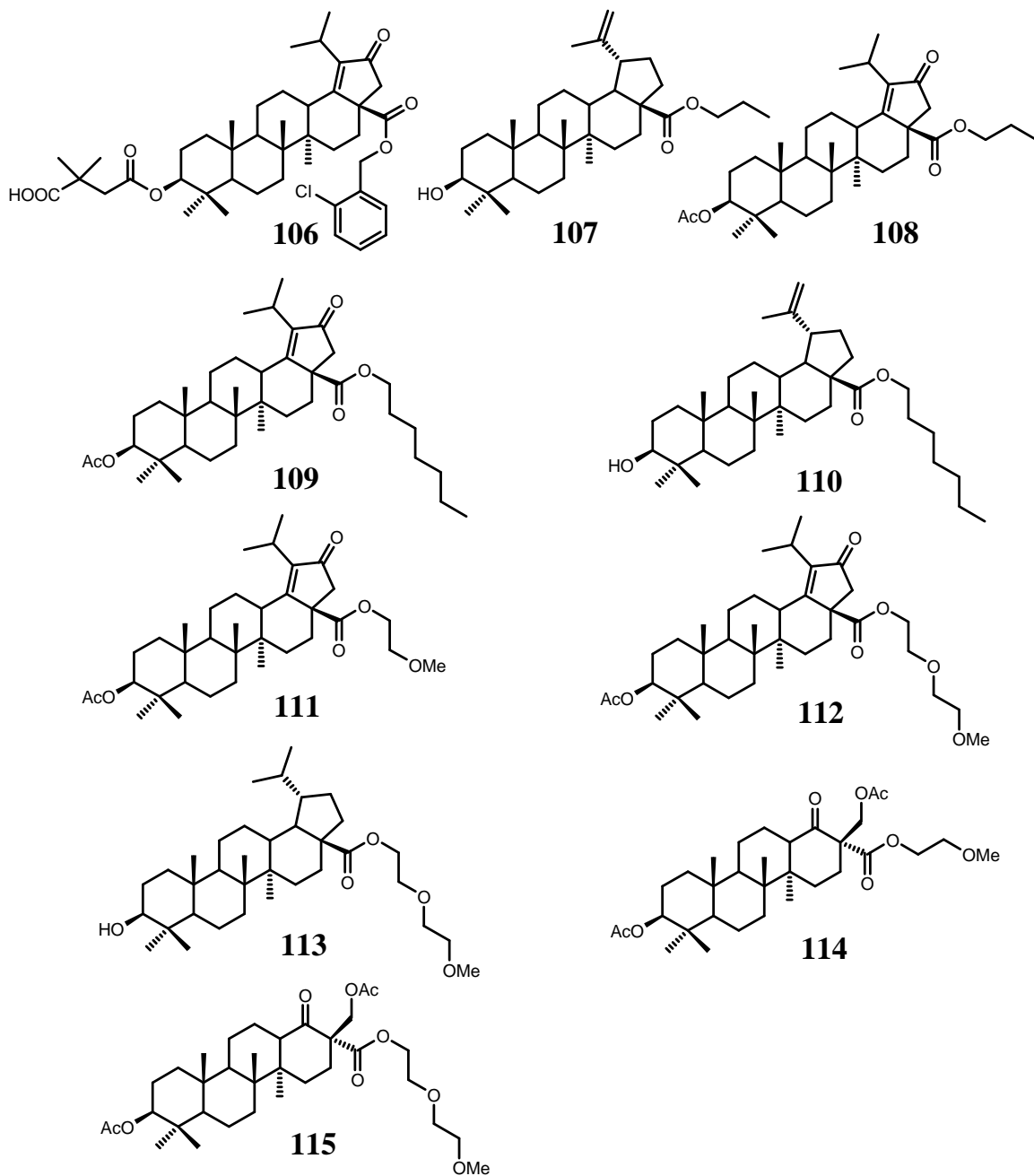
Struktury testovaných sloučenin - pokračování



Struktury testovaných sloučenin - pokračování



Struktury testovaných sloučenin - pokračování



6. TABULKY VÝSLEDKŮ TESTOVÁNÍ

Tabulka 1 obsahuje výsledky testování inhibice produkce NO a MTT testu. Všechny hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Sloupec „Produkce NO“ představuje výsledky testování inhibice tvorby NO za přítomnosti LPS. Sloupec „MTT test s LPS“ obsahuje výsledky MTT testu za přítomnosti LPS. Sloupec „MTT test“ obsahuje výsledky MTT testu bez přítomnosti LPS. Sloupce SD vyjadřují hodnoty směrodatné odchylky v $\mu\text{mol/l}$. Hodnota „>250“ značí, že hodnota IC_{50} je vyšší než 250 $\mu\text{mol/l}$ a že její přesná hodnota nemohla být pomocí použité metodiky zjištěna. Sloupec „Index“ představuje terapeutický index (TI), tj. podíl IC_{50} (MTT test s LPS) a IC_{50} („Produkce NO“). Hodnoty $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ a hodnoty $TI > 4$ jsou vyznačeny tučně. Testované sloučeniny nestimulovaly produkci NO při testování bez LPS.

Tabulka 1: Testování inhibice produkce NO a MTT test

Sloučenina	Produkce NO		MTT test s LPS		MTT test		Index
	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	
51	48,26	3,9	58,68	2,2	46,50	2,0	1,22
52	242,44	16,9	>250		209,03	17,3	1,03
53	81,08	6,4	114,58	7,4	101,16	6,8	1,41
54	25,91	1,4	48,44	3,9	45,71	3,1	1,87
55	2,69	0,3	12,11	0,5	9,29	0,9	4,50
56	30,19	2,2	159,49	9,3	44,55	3,5	5,28
57	42,33	3,3	163,37	6,8	86,15	7,9	3,86
58	201,20	18,5	>250		25,51	1,9	1,24
59	33,14	2,1	129,47	8,4	46,91	3,7	3,91
60	9,76	0,6	41,66	2,9	26,82	2,2	4,27
61	>250		>250		>250		1,00
62	185,62	16,4	248,22	4,2	152,93	12,3	1,34
63	159,22	9,6	248,46	3,8	172,95	7,0	1,56
64	>250		>250		>250		1,00
65	78,92	2,7	>250		240,82	12,9	3,17

Tabulka 1: pokračování

Sloučenina	Produkce NO		MTT test s LPS		MTT test		Index
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	
66	15,39	1,2	44,50	3,1	35,34	1,9	2,89
67	22,77	1,1	30,96	2,6	10,37	0,8	1,36
68	227,15	18,1	>250		>250		1,10
69	28,19	1,3	45,35	1,3	40,61	2,8	1,61
70	13,32	1,1	171,97	13,7	37,21	3,0	12,91
71	10,74	1,7	42,44	3,5	23,99	2,0	3,95
72	21,84	1,6	39,08	3,8	25,71	1,1	1,79
73	248,47	3,7	166,40	10,5	63,91	3,7	0,67
74	>250		>250		39,76	0,9	1,00
75	156,06	12,2	>250		56,83	4,2	1,60
76	42,93	3,6	225,27	5,9	169,78	6,7	5,25
77	10,07	1,1	48,81	4,1	34,87	3,2	4,85
78	58,04	3,9	216,34	16,4	55,40	1,8	3,73
79	30,85	2,5	145,05	9,2	44,88	1,8	4,70
80	43,20	3,2	24,92	1,5	12,64	0,6	0,58
81	36,27	1,1	40,50	3,0	13,10	1,2	1,12
82	23,17	1,9	117,55	9,9	52,77	3,9	5,07
83	7,93	0,7	44,91	1,7	39,44	3,6	5,66
84	50,57	3,8	>250		157,91	10,3	4,94
85	12,36	1,0	51,61	2,2	38,98	2,0	4,18
86	37,48	1,0	32,56	0,9	35,30	2,4	0,87
87	34,39	1,9	36,64	1,2	32,95	2,8	1,07
88	31,63	1,6	41,06	0,6	39,11	2,4	1,30
89	25,88	2,4	125,60	9,8	57,35	3,3	4,85
90	35,59	1,0	51,36	3,4	42,29	3,4	1,44

Tabulka 1: pokračování

Sloučenina	Produkce NO		MTT test s LPS		MTT test		Index
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	
91	45,95	4,5	50,12	2,9	48,62	3,3	1,09
92	118,55	9,9	91,80	3,8	56,76	3,7	0,77
93	35,60	3,2	50,58	3,1	50,94	3,8	1,42
94	54,79	4,4	129,49	11,2	46,83	2,2	2,36
95	159,77	11,4	177,31	12,5	178,73	7,4	1,11
96	31,28	2,7	59,23	4,1	56,41	3,5	1,89
97	42,78	2,5	173,66	13,0	186,96	16,1	4,06
98	50,69	3,1	176,50	14,4	144,09	7,6	3,48
99	12,86	1,2	46,61	4,2	44,46	0,4	3,62
100	18,13	1,6	50,52	3,3	46,78	2,4	2,79
101	10,61	0,9	45,93	4,3	39,77	1,1	4,33
102	149,56	10,7	46,50	3,4	32,47	2,3	0,31
103	226,84	14,4	>250		>250		1,10
104	18,46	1,3	48,88	2,6	43,07	1,4	2,65
105	12,07	1,2	49,11	4,1	44,80	3,1	4,07
106	24,10	2,3	63,27	4,5	51,49	4,8	2,63
107	54,09	3,0	35,11	1,4	21,56	2,9	0,65
108	>250		>250		237,80	20,3	1,00
109	>250		>250		>250		1,00
110	>250		>250		>250		1,00
111	>250		>250		>250		1,00
112	>250		>250		244,39	12,5	1,00
113	149,24	12,2	53,41	4,4	33,93	2,2	0,36
114	>250		42,93	2,6	14,22	0,6	0,17
115	>250		73,56	5,8	41,67	2,1	0,29

Tabulka 2 shrnuje výsledky testování inhibice produkce ROS a testování zhášení radikálů. Všechny hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. Sloupec „Produkce ROS“ obsahuje výsledky testování inhibice tvorby ROS. V sloupci „Zhášení $O_2^{\cdot-}$ “ jsou výsledky testování zhášení superoxidových radikálů v bezbuněčném systému. Sloupce SD vyjadřují hodnoty směrodatné odchylky v $\mu\text{mol/l}$. Hodnota „>50“ znamená, že hodnota IC_{50} je vyšší než 50 $\mu\text{mol/l}$ a že její přesná hodnota nemohla být pomocí použité metodiky zjištěna. Hodnoty $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ jsou vyznačeny tučně. Testované sloučeniny nezhášely NO^{\cdot} radikály tvořené v bezbuněčném systému.

Tabulka 2: Testování inhibice produkce ROS a zhášení superoxidových radikálů

Látka	Produkce ROS		Zhášení $O_2^{\cdot-}$		Látka	Produkce ROS		Zhášení $O_2^{\cdot-}$	
	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD		IC_{50}	SD	IC_{50}	SD
1*	>50		>50		21*	>50		>50	
2*	>50		>50		22*	>50		>50	
3*	32,30	2,1	>50		23*	32,33	2,8	>50	
4*	>50		>50		24*	36,89	2,1	>50	
5*	>50		>50		25*	>50		>50	
6*	>50		>50		26*	>50		>50	
7*	>50		>50		27*	>50		>50	
8*	>50		>50		28*	>50		30,12	1,6
9*	>50		>50		29*	>50		>50	
10*	29,76	1,5	>50		30*	>50		>50	
11*	>50		>50		31*	>50		>50	
12*	>50		>50		32*	21,58	1,6	33,62	2,3
13*	>50		>50		33*	>50		>50	
14*	>50		>50		34*	>50		>50	
15*	>50		>50		35*	>50		>50	
16*	>50		>50		36*	>50		>50	
17*	>50		>50		37*	>50		>50	
18*	31,54	1,8	>50		38*	>50		>50	
19*	10,42	0,7	>50		39*	>50		>50	
20*	>50		>50		40*	>50		>50	

Tabulka 2: pokračování

Látka	Produkce ROS		Zhášení O ₂ ^{•-}		Látka	Produkce ROS		Zhášení O ₂ ^{•-}	
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD		IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD
41 [*]	>50		>50		66	>50		>50	
42 [*]	>50		>50		67	>50		>50	
43 [*]	>50		>50		68	>50		>50	
44 [*]	>50		>50		69	>50		>50	
45 [*]	>50		>50		70	>50		>50	
46 [*]	>50		>50		71	9,62	0,6	>50	
47 [*]	>50		>50		72	>50		>50	
48 [*]	>50		>50		73	>50		>50	
49 [*]	>50		>50		74	>50		>50	
50 [*]	>50		>50		75	>50		>50	
51	>50		>50		76	>50		>50	
52	>50		>50		77	37,09	3,3	>50	
53	>50		>50		78	>50		>50	
54	>50		>50		79	>50		>50	
55	>50		>50		80	>50		>50	
56	>50		>50		81	>50		20,64	0,8
57	>50		>50		82	>50		>50	
58	>50		>50		83	30,64	1,1	>50	
59	27,38	2,0	>50		84	>50		>50	
60	>50		26,49	1,1	85	35,09	2,7	>50	
61	>50		>50		86	10,72	0,7	>50	
62	>50		>50		87	17,48	1,3	>50	
63	>50		>50		88	44,08	3,5	>50	
64	>50		>50		89	12,50	1,0	>50	
65	>50		>50		90	>50		>50	

Tabulka 2: pokračování

Látka	Produkce ROS		Zhášení O ₂ ^{•-}	
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD
91	>50		>50	
92	>50		>50	
93	>50		>50	
94	>50		>50	
95	>50		>50	
96	>50		>50	
97	>50		>50	
98	>50		>50	
99	>50		>50	
100	>50		>50	
101	6,04	1,4	>50	
102	>50		>50	
103	>50		>50	
104	>50		>50	
105	>50		>50	
106	>50		>50	
107	>50		>50	
108	>50		>50	
109	>50		>50	
110	>50		>50	
111	>50		>50	
112	>50		>50	
113	>50		>50	
114	>50		>50	
115	>50		>50	

DISKUZE

Inhibice produkce NO lupanovými deriváty

Kritériem k posouzení aktivity testované sloučeniny je hodnota IC_{50} inhibice produkce NO a terapeutický index (TI), tedy poměr mezi inhibičním působením a cytotoxicitou derivátu. O aktivním derivátu hovoříme v případě, že je hodnota IC_{50} tohoto derivátu nižší než $10 \mu\text{mol/l}$. Naopak terapeutický index, zde vyjádřený jako poměr IC_{50} zjištěné při MTT testu s LPS a IC_{50} inhibice produkce NO, by měl být co nejvyšší.

Inhibice produkce NO byla testována u 47 lupanových derivátů. Na základě testování inhibice produkce NO v buňkách stimulovaných LPS můžeme jednotlivé deriváty rozdělit do čtyř skupin podle hodnoty zjištěného terapeutického indexu.

Do první skupiny náleží deriváty, jež neměly inhibiční efekt na produkci NO a zároveň nepůsobily na buňky B10R cytotoxicky. Do této skupiny patří betulín-diacetát (**61**) a skupina esterů s alifatickými alkoholy a polyethery **108 - 112**.

Druhou skupinu tvoří tři sloučeniny, kvartérní amoniová sůl **92** a estery **107** a **113**. Tyto sloučeniny mají TI nižší než 1. To znamená, že u těchto sloučenin je cytotoxický efekt větší než inhibice NO. Tuto zdánlivě nelogickou skutečnost je možné vysvětlit například tím, že tyto deriváty mohou interagovat s metabolismem mitochondrií tak, že zamezí redukci MTT v buňkách. V MTT testu jsou pak tyto buňky mylně vyhodnoceny jako mrtvé buňky.

Do třetí, a nejpočetnější, skupiny patří deriváty s hodnotou TI 1 až 4. Výsledek testování inhibičního efektu na tvorbu NO je u těchto sloučenin ovlivněn jejich cytotoxickým působením. I tak je inhibice produkce NO u těchto derivátů jen mírná. Za výjimku lze považovat pouze maleinát **71** s IC_{50} $10,47 \mu\text{mol/l}$.

Do poslední skupiny můžeme zařadit ty sloučeniny, jejichž TI je vyšší než 4. Patří sem 13 látek: **55, 56, 60, 70, 79, 82 – 85, 89, 97, 101** a **105**. U esteru **70** byla zjištěna nejvyšší hodnota TI, a to 12,91. Hodnota IC_{50} je však u tohoto derivátu $13,31 \mu\text{mol/l}$, a proto nemůže být považován za slibnou sloučeninu. Naopak kyselina **55** silně inhibuje produkci NO s IC_{50} $2,69 \mu\text{mol/l}$ (TI = 4,50), aktivní je rovněž kyselina **83** s IC_{50} $7,93 \mu\text{mol/l}$ (TI = 5,66) a kyselina **60** s IC_{50} $9,76 \mu\text{mol/l}$ (TI = 4,27).

Žádný z testovaných derivátů neměl vliv na produkci NO v bezbuněčném systému a je tedy zřejmé, že inhibice tvorby NO v buňkách B10R je způsobena interakcí

s buněčným metabolismem či signálními kaskádami. Testované sloučeniny nestimulovaly produkci NO při testování bez LPS.

Na základě analýzy vztahu struktury a aktivity bylo u testovaných lupanových derivátů nalezeno několik strukturních charakteristik, které mají vliv na aktivitu sloučeniny a její terapeutický index.

V předchozí práci (Spáčilová, 2007) byla popsána silná inhibice produkce NO v buňkách B10R u methylesteru **16*** ($IC_{50} = 4,80 \mu\text{mol/l}$), jenž je v poloze 30 modifikován karbonylovou funkcí. Tento derivát má však TI jen 1,71. Nyní byly testovány příbuzné deriváty, kyseliny **60** a **83**. Obě tyto sloučeniny jsou silnými inhibitory tvorby NO ($IC_{50} = 9,76 \mu\text{mol/l}$ resp. $7,93 \mu\text{mol/l}$) a zároveň mají vyšší TI (4,27 resp. 5,66). To svědčí o vhodnosti kombinace karbonylové skupiny v poloze 30 a karboxylové skupiny v poloze 28. Tuto skutečnost dokládá i fakt, že derivát **15*** nesoucí v poloze 28 methylovou skupinu je neaktivní (Spáčilová, 2007).

Vliv substituce v poloze 2 lupanového skeletu byl sledován ve skupině šesti látek: **55**, **56**, **65**, **79**, **82** a **84**. V předchozím testování (Spáčilová, 2007) bylo zjištěno, že derivát **46*** má vysoký TI (10,25) a relativně nízkou hodnotu $IC_{50} = 11,61 \mu\text{mol/l}$. Přestože příbuzné sloučeniny **56**, **65**, **79** a **82**, jež také nesou v poloze 2 funkční skupinu vázanou přes kyslík, mají relativně uspokojivé hodnoty TI, není jejich inhibiční efekt na produkci NO dostatečný. Jediným silným inhibitorem tvorby NO modifikovaným v poloze 2 je dibromderivát **55** ($IC_{50} = 2,69 \mu\text{mol/l}$, TI = 4,50). Difluorderivát **84** má slibnou hodnotu TI (4,94), jeho IC_{50} je však vysoká – $50,57 \mu\text{mol/l}$.

Při testování se ukázalo, že 21-oxokyselina **58** má velmi slabý inhibiční účinek na tvorbu NO ($IC_{50} = 201 \mu\text{mol/l}$). Esterifikace této kyseliny dlouhými alifatickými zbytky vede k neaktivním sloučeninám **108**, **109**, **111** a **112**. Naopak estery **70** a **97** se stericky náročnými benzylovými substituenty vykazují mírnou inhibici tvorby NO a TI vyšší než 4,5. *p*-Methoxybenzylester **70** má hodnotu $IC_{50} 13,32 \mu\text{mol/l}$ a TI 12,91. Aktivita homologního *p*-methoxyfenylethylesteru **98**, který obsahuje o jednu methylenovou skupinu více, je několikanásobně nižší ($IC_{50} = 50,69 \mu\text{mol/l}$). Z porovnání aktivit různě substituovaných benzylesterů, které byly shodně acylovány v poloze 3 β kyselinou 3',3'-dimethyljantarovou, je zřejmé, že nejlepší aktivity dosáhl *m*-chlorbenzylester **105** ($IC_{50} = 12,07 \mu\text{mol/l}$, TI = 4,07) následovaný *p*-methoxybenzylesterem **99** ($IC_{50} = 12,86 \mu\text{mol/l}$, TI = 3,62), *p*-chlorbenzylesterem **104** ($IC_{50} = 18,46 \mu\text{mol/l}$, TI = 2,65) a *o*-chlorbenzylesterem **106** ($IC_{50} = 24,10 \mu\text{mol/l}$, TI = 2,63). Tyto výsledky můžeme shrnout do tvrzení, že aktivita benzylesterů závisí na elektronové hustotě na aromatickém

jádře. Nejvyšší aktivitu lze očekávat u derivátů nesoucích deaktivující skupinu (například Cl) v poloze meta nebo aktivující skupinu (například methoxy) v poloze para.

Z předchozího testování (Spáčilová, 2007) je známo, že esterifikací 3 β -hydroxylové skupiny betulínové kyseliny (**44**^{*}), která nemá vliv na produkci NO v buňkách B10R, dikyselinami nebo jejich funkčními deriváty lze získat hemiestery (např. **47**^{*} a **48**^{*}) s hodnotami IC₅₀ v řádu desítek $\mu\text{mol/l}$. Tato skutečnost byla potvrzena i v případě 3',3'-dimethylsukcinátu **69** (IC₅₀ = 28,19 $\mu\text{mol/l}$). Ze srovnání aktivity hemiesterů odvozených od esterů 21-oxokyseliny **58** vyplývá, že nejvhodnější je volit maleináty (**71** a **101**), jejichž IC₅₀ se pohybuje mezi 10 a 11 $\mu\text{mol/l}$ a terapeutický index je přibližně 4. Tuto skutečnost potvrzuje i srovnání inhibice produkce NO *p*-methoxybenzylestery **99** - **101**. V pořadí vhodnosti derivatizace hydroxylové skupiny v poloze 3 β je první maleinát **101** (IC₅₀ = 10,61 $\mu\text{mol/l}$, TI = 4,33), následuje 3',3'-dimethylsukcinát **99** (IC₅₀ = 12,86 $\mu\text{mol/l}$, TI = 3,62) a 3',3'-dimethylglutarát **100** (IC₅₀ = 18,13 $\mu\text{mol/l}$, TI = 2,79). Vezmeme-li v úvahu fakt, že esterifikace v poloze 28 má rovněž vliv na inhibici produkce NO, dojdeme k závěru, že kombinací vlivů esterifikace 21-oxokyseliny **58** v poloze 28 a acylace v poloze 3 β lze získat sloučeniny s relativně nízkou hodnotou IC₅₀ a dostatečným terapeutickým indexem, o čemž svědčí aktivita derivátu **101** (IC₅₀ = 10,61 $\mu\text{mol/l}$, TI = 4,33).

Inhibice produkce ROS lupanovými deriváty

Inhibice produkce ROS (IC₅₀ < 50 $\mu\text{mol/l}$) buňkami RAW 264.7 byla pozorována u jedenácti lupanových derivátů: **10**^{*}, **18**^{*}, **19**^{*}, **59**, **71**, **83**, **85**, **87** – **89** a **101**. Hodnot IC₅₀ menších než 10 $\mu\text{mol/l}$ bylo dosaženo u derivátů **71** a **101** (IC₅₀ = 9,62, resp. 6,04 $\mu\text{mol/l}$).

Společným strukturním rysem všech sloučenin, u nichž byla zaznamenána inhibice produkce ROS, je přítomnost konjugovaných dvojných vazeb v molekule. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u maleinátů **71** a **101**. Inhibiční aktivitu mají i sloučeniny obsahující v molekule aromatický heterocyklus, pyrazin **19**^{*} (IC₅₀ = 10,42 $\mu\text{mol/l}$) a pyridiniová sůl **87** (IC₅₀ = 17,48 $\mu\text{mol/l}$), u pyridiniové soli **28**^{*} však inhibice ROS nebyla zjištěna. Mezi sloučeninami schopnými inhibovat produkci ROS jsou rovněž dva zástupci 2-deoxyglykosidů: 2-deoxygalaktosid **88** (IC₅₀ = 44,08 $\mu\text{mol/l}$) a 2-deoxyrhamnosid **89** (IC₅₀ = 12,50 $\mu\text{mol/l}$). U 2-deoxygalaktosidu **7**^{*} je však hodnota IC₅₀ vyšší než 50 $\mu\text{mol/l}$. Z testování nevyplývala žádná další výraznější závislost mezi strukturou a aktivitou.

Při testování zhášení ROS v bezbuněčném systému se ukázaly všechny testované lupanové deriváty, u kterých byl pozorován inhibiční efekt na produkci ROS v buňkách RAW 264.7, jako neaktivní. Z toho vyplývá, že u těchto derivátů inhibice produkce ROS v buňkách RAW 264.7 nesouvisí se zhášením superoxidových radikálů, ale je způsobena interakcí derivátů s buněčným metabolismem nebo signálními kaskádami. Naproti tomu deriváty **28*** a **60** inhibují produkci ROS v bezbuněčném systému s hodnotami IC_{50} 30,12 $\mu\text{mol/l}$, resp. 26,49 $\mu\text{mol/l}$. V buňkách RAW 264.7 však tyto deriváty produkci ROS neovlivňují a je tedy možno předpokládat, že v buněčném systému dochází ke vzniku komplexů těchto derivátů např. se složkami kultivačního média či buněčnými proteiny. Tyto komplexy však superoxidové radikály nezháší.

Inhibice produkce NO a ROS des-E-lupanovými, oleananovými a ursanovými deriváty

Na inhibici produkce NO buňkami B10R bylo testováno osm des-E-lupanových derivátů. Dva z nich, triketony **76** a **77**, vykázaly TI vyšší než 4 (5,25 resp. 4,85). Hodnota IC_{50} je však dostatečná pouze u derivátu **77** ($IC_{50} = 10,07 \mu\text{mol/l}$), sloučenina **76** má jen slabý účinek na inhibici produkce NO ($IC_{50} = 42,93 \mu\text{mol/l}$). Ze srovnání aktivity triketonů **75** – **78** vyplývá, že u derivátů s uhlíkem 28 v oxidačním stupni karboxylové kyseliny se hodnoty IC_{50} pohybují v řádu desítek $\mu\text{mol/l}$ a jsou tedy aktivnější než derivát **75** s uhlíkem 28 v oxidačním stupni alkoholu ($IC_{50} = 156,06 \mu\text{mol/l}$). Nejnížší hodnota IC_{50} byla zjištěna u acetoxymethylesteru **77** ($IC_{50} = 10,07 \mu\text{mol/l}$, $TI = 4,85$), slabou aktivitu mají pivaloyloxymethylester **76** ($IC_{50} = 42,93 \mu\text{mol/l}$, $TI = 5,25$) a methylester **78** ($IC_{50} = 58,04 \mu\text{mol/l}$, $TI = 3,73 \mu\text{mol/l}$).

Slabá inhibice produkce ROS v buňkách RAW 264.7 byla zjištěna u tří des-E-lupanových derivátů: methylenketonu **23*** ($IC_{50} = 32,33 \mu\text{mol/l}$), glukosidu **24*** ($IC_{50} = 36,89 \mu\text{mol/l}$) a triketonu **77** ($IC_{50} = 37,09 \mu\text{mol/l}$). Žádný z těchto derivátů nezháší superoxidové radikály produkované v bezbuněčném systému. Naopak derivát **81** vykázal aktivitu při zhášení ROS v bezbuněčném systému ($IC_{50} = 20,64 \mu\text{mol/l}$). Produkce ROS v buňkách RAW 264.7 tímto derivátem není ovlivněna, což může být vysvětleno tak, že derivát **81** interaguje s některou ze složek kultivačního média či buněčným proteinem za vzniku komplexu, který nezháší superoxidové radikály.

Testováním skupiny osmi oleananových derivátů na inhibici produkce NO v buňkách B10R nebyla zjištěna žádná sloučenina s TI vyšším než 2. Rovněž inhibice

produkce NO byla u těchto derivátů jen slabá až zanedbatelná, o čemž svědčí nejnižší hodnota $IC_{50} = 25,91 \mu\text{mol/l}$, naměřená u derivátu **54**. Je zajímavé, že u 2-substituovaných derivátů **50**, **51**, **53**, **54**, **73** a **74** nedošlo k výraznějšímu zlepšení hodnot TI a IC_{50} jako tomu bylo u lupanových derivátů.

Inhibice produkce tvorby ROS buňkami RAW 264.7 byla zaznamenána pouze u jediného oleananového derivátu, pyridiniové soli **32*** ($IC_{50} = 21,58 \mu\text{mol/l}$), která inhibuje produkci ROS také v bezbuněčném systému ($IC_{50} = 33,62 \mu\text{mol/l}$). Není proto možné s jistotou určit, zda je aktivita tohoto derivátu v buňkách způsobena interakcí s buněčným metabolismem či signálními kaskádami, nebo dochází pouze ke zhášení superoxidových radikálů v buňce.

Přestože testování inhibice produkce NO ursanovými deriváty nepřineslo žádné sloučeniny s TI vyšším než 2 a rovněž hodnoty IC_{50} nebyly dostatečné, byla u dvou ursanových derivátů zjištěna inhibice produkce ROS v buňkách RAW 264.7. Jedná se o 3-acetoxy-11-oxo- β -boswellovou kyselinu (**3***) ($IC_{50} = 32,30 \mu\text{mol/l}$) a kvartérní amoniiovou sůl **86** ($IC_{50} = 10,72 \mu\text{mol/l}$). Ani jeden z těchto derivátů nezháší superoxidové radikály generované v bezbuněčném systému.

Je třeba dodat, že u betulininů dosud nebyla nalezena žádná obecná uskupení funkčních skupin, jejichž přítomnost v molekule by zaručovala biologickou aktivitu (např. cytotoxicitu) derivátu. Vzhledem k tomu, že betuliny jsou velmi málo rozpustné ve vodě, má pro odhad účinnosti daného derivátu velký význam jeho polárnost. Nejčastěji platí, že nepolární deriváty nemají biologickou aktivitu a že s rostoucí polárností sloučenin aktivita stoupá. Proto často nalézáme aktivní sloučeniny mezi karboxylovými kyselinami a jejich estery. S rostoucí polaritou sloučenin roste i jejich rozpustnost ve vodě. Pouhá závislost biologické aktivity na polárnosti molekuly však neumožňuje např. ladit cytotoxicitu derivátu tak, aby měl co nejvyšší terapeutický index. Jedinou cestou ke sloučenině s vhodnými vlastnostmi je v současnosti srovnávání biologických aktivit strukturně velmi blízkých derivátů.

Z výsledků testování provedených v rámci této práce vyplývá, že bylo nalezeno několik derivátů se slibnou *in vitro* aktivitou. Jedná se o kyseliny **55**, **60** a **83**, které silně inhibují produkci NO v buňkách makrofágové buněčné linie stimulovaných LPS a zároveň mají TI vyšší než 4, a o maleináty **71** a **101**, které silně inhibují produkci ROS v aktivovaných buňkách linie RAW 264.7 a rovněž se osvědčily při testování inhibice

produkce NO v buňkách B10R, kdy se jejich IC₅₀ pohybovala v rozmezí 10 a 11 μmol/l a hodnota TI byla přibližně 4. Tyto sloučeniny si zaslouží další pozornost, a to jak na poli syntézy jejich derivátů s ještě lepšími aktivitami, tak na poli biologického testování, neboť mechanismus účinku těchto sloučenin není znám. Zakončením těchto snah by mělo být i případné testování protizánětlivých účinků těchto sloučenin *in vivo*.

ZÁVĚR

1. Byla provedena literární rešerše protizánětlivých účinků přírodních i syntetických triterpenoidů.
2. U šedesáti pěti triterpenoidních derivátů bylo provedeno testování inhibice produkce NO v aktivovaných buňkách myší makrofágové linie. Bylo nalezeno patnáct triterpenoidních sloučenin, které mají terapeutický index vyšší než 4, z toho jedna sloučenina (**70**) měla terapeutický index vyšší než 12. U sloučenin **55**, **60** a **83** je hodnota IC₅₀ pro inhibici produkce NO nižší než 10 μmol/l a zároveň je jejich terapeutický index vyšší než 4.
3. Byla připravena metodika pro testování inhibice tvorby reaktivních forem kyslíku v aktivovaných buňkách myší makrofágové linie. Pomocí této metodiky byla testována inhibice produkce ROS v aktivovaných buňkách myší makrofágové linie u sto patnácti triterpenoidních derivátů. Bylo nalezeno sedmáct derivátů, které inhibují tvorbu reaktivních forem kyslíku v aktivovaných buňkách myší makrofágové linie. Hodnota IC₅₀ pro inhibici produkce ROS je u sloučenin **71** a **101** nižší než 10 μmol/l.
4. U sto patnácti sloučenin bylo testováno, zda dochází ke zhášení NO[•] generovaného v bezbuněčném systému. Působením žádného z testovaných derivátů nedošlo ke zhášení NO[•].
5. Sto patnáct triterpenoidních derivátů bylo testováno na inhibici produkce O₂^{•-} generovaného v bezbuněčném systému. Čtyři testované sloučeniny slabě zhášejí O₂^{•-}.
6. Celkem bylo nalezeno pět lupanových derivátů perspektivních pro další výzkum. Jedná se o kyseliny **55**, **60** a **83** a maleináty **71** a **101**.

LITERATURA

- Abe M, Akbar F, Hasebe A, Horiike N, Onji M: Glycyrrhizin enhances interleukin-10 production by liver dendritic cells in mice with hepatitis. *J. Gastroenterol.*: **38**, 962 (2003)
- Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS: Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.*: **76**, 2315 (2005)
- Akamatsu H, Komura J, Asada Y, Niwa Y: Mechanism of Anti-Inflammatory Action of Glycyrrhizin: Effect on Neutrophil Functions Including Reactive Oxygen Species Generation. *Planta Med.*: **57**, 119 (1991)
- Ali MS, Ibrahim SA, Jalil S, Choudhary MI: Ursolic Acid: A Potent Inhibitor of Superoxides Produced in the Cellular System. *Phytother. Res.*: **21**, 558 (2007)
- Altmann A, Fischer L, Schubert-Zsilavecz M, Steinhilber D, Werz O: Boswellic acids activate p42(MAPK) and p38 MAPK and stimulate Ca(2+) mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **290**, 185 (2002)
- Altmann A, Poeckel D, Fischer L, Schubert-Zsilavecz M, Steinhilber D, Werz O: Coupling of boswellic acid-induced Ca²⁺ mobilisation and MAPK activation to lipid metabolism and peroxide formation in human leucocytes. *Br. J. Pharmacol.*: **141**, 223 (2004)
- Ammon HPT, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J: Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *J. Ethnopharmacol.*: **38**, 113 (1993)
- Asl MN, Hosseinzadeh H: Review of Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza* sp. and its Bioactive Compounds. *Phytother. Res.*: **22**, 709 (2008)
- Bae EA, Shin J, Kim DH: Metabolism of Ginsenoside Re by Human Intestinal Microflora and Its Estrogenic Effect. *Biol. Pharm. Bull.*: **28**, 1903 (2005)
- Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D: Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN- γ and infection with BCG. *Immunology*: **82**, 457 (1994)

- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A: Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*: **75**, 125 (2001)
- Bartosz G: Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin. Chim. Acta*: **368**, 53 (2006)
- Bermejo Benito P, Abad Martínez MJ, Silván Sen AM, Sanz Gómez A, Fernández Matellano L, Sánchez Contreras S, Díaz Lanza AM.: In vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sci.*: **63**, 1147 (1998)
- Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY: Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry*: **58**, 865 (2001)
- Biedermann D: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2008
- Bilitewski U: Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of innate immune system. *Anal. Bioanal. Chem.*: **391**, 1545 (2008)
- Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakula Y, Fujiwara H, Ito M: Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology*: **103**, 235 (2001)
- Díaz AM, Abad MJ, Fernández L, Recuero C, Villaescusa L, Silván AM, Bermejo P: In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol. Pharm. Bull.*: **23**, 1307 (2000)
- Dunstan CA, Liu B, Welch CJ, Perera P, Bohlin L: Alphitol, a phenolic substance from *Alphitonia zizyphoides* which inhibits prostaglandin biosynthesis *in vitro*. *Phytochemistry*: **48**, 495 (1998)
- Džubák P, Hajdúch M, Vydra D, Húšťová A, Kvasnica M, Biedermann D, Marková L, Urban M, Šarek J: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.*: **23**, 394 (2006)
- Elliott S, Hays E, Mayor M, Sporn M, Vincenti M: The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.*: **5**, R285 (2003)

- Feng C, Wang H, Yao C, Zhang J, Tian Z: Diammonium glycyrrhizinate, a component of traditional Chinese medicine Gan-Cao, prevents murine T-cell-mediated fulminant hepatitis in IL-10- and IL-6-dependent manners. *Int. Immunopharmacol.*: **7**, 1292 (2007)
- Fernandes AMS, Baker EA, Martin JT: Studies on plant cuticle VI. Isolation and fractionation of cuticular waxes. *Ann. Appl. Biol.*: **53**, 43 (1964)
- Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner RM, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL: Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur. J. Pharmacol.*: **428**, 137 (2001)
- Green SJ, Anigolu J, Raney JJ: Oxidative Metabolism of Murine Macrophages. *In Current Protocols in Immunology*, Unit 14.5, supplement 12 (1994)
- Hajdúch M, Šarek J: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190136, 23 May 2001
- Hamburger M, Riese U, Graf H, Melzig MF, Ciesielski S, Baumann D, Dittmann K, Wegner C: Constituents in Evening Primrose Oil with Radical Scavenging, Cyclooxygenase, and Neutrophil Elastase Inhibitory Activities. *J. Agric. Food Chem.*: **50**, 5533 (2002)
- Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I: Appraisal of the MTT-based Assay as a Useful Tool for Predicting Drug Chemosensitivity in Leukemia. *Leuk. Lymphoma*: **44**, 1957 (2003)
- Honda T, Finlay HJ, Gribble GW, Suh N, Sporn MB: New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **7**, 1623 (1997)
- Honda T, Honda Y, Favalaro FG, Gribble GW, Suh N, Place AE, Rendi MH, Sporn MB: A Novel Dicyanotriterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-nitrile, Active at Picomolar Concentrations for Inhibition of Nitric Oxide Production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **12**, 1027 (2002)
- Honda T, Liby KT, Su X, Sundararajan C, Honda Y, Suh N, Risingsong R, Williams CR, Royce DB, Sporn MB, Gribble GW: Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both in vitro and in vivo of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **16**, 6306 (2006)

- Honda T, Rounds BV, Bore L, Favalaro FG, Gribble GW, Suh N, Wang Y, Sporn MB: Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **9**, 3429 (1999)
- Honda T, Rounds BV, Bore L, Finlay HJ, Favalaro FG, Suh N, Wang Y, Sporn MB, Gribble GW: Synthetic Oleanane and Ursane Triterpenoids with Modified Rings A and C: A Series of Highly Active Inhibitors of Nitric Oxide Production in Mouse Macrophages. *J. Med. Chem.*: **43**, 4233 (2000)
- Honda T, Rounds BV, Gribble GW, Suh N, Wang Y, Sporn MB: Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **8**, 2711 (1998)
- Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y: Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.*: **263**, 1 (2008)
- Chevrier MR, Ryan AE, Lee DYW, Zhongze M, Wu-Yan Z, Via CS: *Boswellia carterii* Extract Inhibits TH1 Cytokines and Promotes TH2 Cytokines In Vitro. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*: **12**, 575 (2005)
- Cho JY, Yoo ES, Baik KU, Park MH, Han BH: In vitro inhibitory effect of protopanaxadiol ginsenosides on tumor necrosis factor (TNF)-alpha production and its modulation by known TNF-alpha antagonists. *Planta Med.*: **67**, 213 (2001)
- Choi CY, You HJ, Jeong HG: Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Production by Oleanolic Acid via Nuclear Factor- κ B Activation in Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **288**, 49 (2001)
- Chung JW, Noh EJ, Zhao HL, Sim SJ, Ha YW, Shin EM, Lee EB, Cheong CS, Kim YS: Anti-inflammatory Activity of Prosapogenin Methyl Ester of Platycodin D via Nuclear Factor-kappaB Pathway Inhibition. *Biol. Pharm. Bull.*: **31**, 2114 (2008)
- Ikeda Y, Murakami A, Fujimura Y, Tachibana H, Yamada K, Masuda D, Hirano K, Yamashita S, Ohigashi H: Aggregated Ursolic Acid, a Natural Triterpenoid, Induces IL-1 β Release from Murine Peritoneal Macrophages: Role of CD36. *J. Immunol.*: **178**, 4854 (2007)
- Ikeda Y, Murakami A, Nishizawa T, Ohigashi H: Ursolic Acid Enhances Cyclooxygenases and Tumor Necrosis Factor- α Expression in Mouse Skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*: **70**, 1033 (2006)

- Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H: Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.*: **70**, 1497 (2005)
- Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H: Strain differences regarding susceptibility to ursolic acid-induced interleukin-1 β release in murine macrophages. *Life Sci.*: **83**, 43 (2008)
- Ivanov VM: The 125th Anniversary of the Griess Reagent. *J. Anal. Chem.*: **59**, 1002 (2004)
- Jeong HG, Kim JY: Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18 β -glycyrrhetic acid in macrophages. *FEBS Lett.*: **513**, 208 (2002)
- Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ: Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF- κ B activation and tumor promotion. *Mutat. Res.*: **523–524**, 75 (2003)
- Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB: Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.*: **7**, 344 (2007)
- Kim YP, Lee EB, Kim SY, Li D, Ban HS, Lim SS, Shin KH, Ohuchi K: Inhibition of Prostaglandin E₂ Production by Platycodin D Isolated from the Root of *Platycodon grandiflorum*. *Planta Med.*: **67**, 362 (2001)
- Kroes BH, Beukelman CJ, Van Den Berg AJJ, Wolbink GJ, Van Dijk H, Labadie RP: Inhibition of human complement by β -glycyrrhetic acid. *Immunology*: **90**, 115 (1997)
- Kumar RS, Sivakumar T, Sunderam RS, Gupta M, Mazumdar UK, Gomathi P, Rajeshwar Y, Saravanan S, Kumar MS, Muruges K, Kumar KA: Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Braz. J. Med. Biol. Res.*: **38**, 1015 (2005)
- Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B: Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic. Biol. Med.*: **43**, 319 (2007)
- Lee SM, Park JG, Lee YH, Lee CG, Min BS, Kim JH, Lee HK: Anti-complementary Activity of Triterpenoides from Fruits of *Zizyphus jujuba*. *Biol. Pharm. Bull.*: **27**, 1883 (2004)

- Leung CY, Liu L, Wong RNS, Zeng YY, Li M, Zhou H: Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC θ , JNK, and NF- κ B transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **338**, 1920 (2005)
- Liby KT, Yore MM, Sporn MB: Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nature Rev. Cancer*: **7**, 357 (2007)
- Liu J: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*: **49**, 57 (1995)
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K: Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J. Neurosci.*: **26**, 12904 (2006)
- Lowitz: Ueber eine neue, fast benzoeartige, Substanz der Birken; vom hrn Lowitz. *Crells annalen*: **1**, 312 (1788)
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL: Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*: **613**, 1 (2008)
- Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, Ando K, Aizu-Yokota E, Sato T, Kasahara T: Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int. Immunopharmacol.*: **4**, 1633 (2004)
- Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, Agresti A, Trisciuglio L, Musco G, Bianchi ME: Glycyrrhizin Binds to High-Mobility Group Box 1 Protein and Inhibits Its Cytokine Activities. *Chem. Biol.*: **14**, 451 (2007)
- Murakami A, Ohigashi H: Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer*: **121**, 2357 (2007)
- Murphy G, Nagase H: Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.*: **29**, 290 (2008)
- Najid A, Simon A, Cook J, Chable-Rabinovitch H, Delage C, Chulia AJ, Rigaud M: Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Lett.*: **299**, 213 (1992)

- Navarro P, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL: In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sci.*: **68**, 1199 (2001)
- Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH: Ginsenoside Rh1 Possesses Antiallergic and Anti-Inflammatory Activities. *Int. Arch. Allergy Immunol.*: **133**, 113 (2004)
- Park EK, Choo MK, Kim EJ, Han MJ, Kim DH: Antiallergic Activity of Ginsenoside Rh2. *Biol. Pharm. Bull.*: **26**, 1581 (2003)
- Park HY, Park SH, Yoon HK, Han MJ, Kim DH: Anti-Allergic Activity of 18 β -Glycyrrhetic acid-3-O- β -D-glucuronide. *Arch. Pharm. Res.*: **27**, 57 (2004)
- Park EK, Shin YW, Lee HU, Kim SS, Lee YC, Lee BY, Kim DH: Inhibitory Effect of Ginsenoside Rb1 and Compound K on NO and Prostaglandin E2 Biosyntheses of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.*: **28**, 652 (2005)
- Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CWW, Fong HHS, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Das Gupta TK, Pezzuto JM: Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.*: **1**, 1046 (1995)
- Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble GW, Leesnitzer LM, Stimmel JB, Willson TM, Rosen E, Sporn MB: The Novel Synthetic Triterpenoid, CDDO-Imidazolide, Inhibits Inflammatory Response and Tumor Growth *in Vivo*. *Clin. Cancer Res.*: **9**, 2798 (2003)
- Poeckel D, Tausch L, Kather N, Jauch J, Werz O: Boswellic Acids Stimulate Arachidonic Acid Release and 12-Lipoxygenase Activity in Human Platelets Independent of Ca²⁺ and Differentially Interact with Platelet-Type 12-Lipoxygenase. *Mol. Pharmacol.*: **70**, 1071 (2006)
- Radad K, Gille G, Liu L, Rausch WD: Use of Ginseng in Medicine With Emphasis on Neurodegenerative Disorders. *J. Pharmacol. Sci.*: **100**, 175 (2006)
- Ramachandran S, Prasad NR: Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.*: **176**, 99 (2008)
- Rao YK, Fang SH, Tzeng YM: Antiinflammatory Activities of Flavonoids and a Triterpene Caffeate Isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother. Res.*: **22**, 957 (2008)

- Regner B, Dušek L, Hajdúch M: Software chemorezist (verze 1.0) - komplexní nástroj pro analýzu dat a management testů chemorezistence nádorů. *Klin. Onkol.*: **13**, 30 (2000)
- Reyes CP, Núñez MJ, Jiménez IA, Busserolles J, Alcaraz MJ, Bazzocchi IL: Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂. *Bioorg. Med. Chem.*: **14**, 1573 (2006)
- Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L: Ursolic Acid from *Plantago major*, a Selective Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Catalyzed Prostaglandin Biosynthesis. *J. Nat. Prod.*: **61**, 1212 (1998)
- Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HP: Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: **261**, 1143 (1992)
- Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HPT: Inhibition by Boswellic Acids of Human Leukocyte Elastase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: **281**, 460 (1997)
- Sailer ER, Schweizer S, Boden S, Ammon HPT, Safayhi H: Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur. J. Biochem.*: **256**, 364 (1998)
- Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HPT, Safayhi H: Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br. J. Pharmacol.*: **117**, 615 (1996)
- Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H: Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*: **23**, 5203 (2004)
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB: Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Res.*: **63**, 4375 (2003)
- Siemoneit U, Hofmann B, Kather N, Lamkemeyer T, Madlung J, Franke L, Schneider G, Jauch J, Poeckel D, Werz O: Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. *Biochem. Pharmacol.*: **75**, 503 (2008)

- Schweizer S, von Brocke AFW, Boden SE, Bayer E, Ammon HPT, Safayhi H: Workup-Dependent Formation of 5-Lipoxygenase Inhibitory Boswellic Acid Analogues. *J. Nat. Prod.*: **63**, 1058 (2000)
- Shen T, Lou HX: Bioactive Constituents of Myrrh and Frankincense, Two Simultaneously Prescribed Gum Resins in Chinese Traditional Medicine. *Chem. Biodivers.*: **5**, 540 (2008)
- Smolinski AT, Pestka JJ: Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food Chem. Toxicol.*: **41**, 1381 (2003)
- Spáčilová P: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2007
- Spáčilová P: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2008
- Subba Rao GSR, Kondaiah P, Singh SK, Ravanan P, Sporn MB: Chemical modifications of natural triterpenes - glycyrrhetic and boswellic acids: evaluation of their biological activity. *Tetrahedron*: **64**, 11541 (2008)
- Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ: Ursolic Acid Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription in Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.*: **60**, 2399 (2000)
- Suh N, Honda T, Finlay HJ, Barchowsky A, Williams C, Benoit NE, Xie Q, Nathan C, Gribble GW, Sporn MB: Novel Triterpenoids Suppress Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages. *Cancer Res.*: **58**, 717 (1998)
- Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, Maue RA, Place AE, Porter DM, Spinella MJ, Williams CR, Wu G, Dannenberg AJ, Flanders KC, Letterio JJ, Mangelsdorf DJ, Nathan CF, Nguyen L, Porter WW, Ren RF, Roberts AB, Roche NS, Subbaramaiah K, Sporn MB: A Novel Synthetic Oleanane Triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid, with Potent Differentiating, Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity. *Cancer Res.*: **59**, 336 (1999)
- Syrovets T, Büchele B, Krauss C, Laumonier Y, Simmet T: Acetyl-Boswellic Acids Inhibit Lipopolysaccharide-Mediated TNF- α Induction in Monocytes by Direct Interaction with I κ B Kinases. *J. Immunol.*: **174**, 498 (2005)

- Šarek J, Klinot J, Džubák P, Klinotová E, Nosková V, Křeček V, Kořínková G, Thomson JO, Janošťáková A, Wang S, Parsons S, Fisher PM, Zhelev NZ, Hajdúch M: New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*: **46**, 5402 (2003)
- Takada Y, Aggarwal BB: Betulinic Acid Suppresses Carcinogen-Induced NF- κ B Activation Through Inhibition of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation: Abrogation of Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloprotease-9. *J. Immunol.*: **171**, 3278 (2003)
- Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, Sporn MB, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S: Nrf2 dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **351**, 883 (2006)
- Thuong PT, Min BS, Jin WY, Na MK, Lee JP, Seong RS, Lee YM, Song KS, Seong YH, Lee HK, Bae KH, Kang KS: Anti-complementary Activity of Ursane-Type Triterpenoids from *Weigela subsessilis*. *Biol. Pharm. Bull.*: **29**, 830 (2006)
- Tolmacheva IA, Shelepen'kina LN, Vikharev YB, Anikina LV, Grishko VV, Tolstikov AG: Synthesis and biological activity of S-containing betulin derivatives. *Chem. Nat. Compd.*: **41**, 701 (2005)
- Tolstikova TG, Sorokina IV, Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB: Biological Activity and Pharmacological Prospects of Lupane Terpenoids: II. Semisynthetic Lupane Derivatives. *Russ. J. Bioorganic Chem.*: **32**, 261 (2006)
- Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V: The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*: **51**, 443 (2007)
- Urban M: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005
- Urban M, Šarek J, Klinot J, Kořínková G, Hajdúch M: Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.*: **67**, 1100 (2004)
- Urban M, Šarek J, Kvasnica M, Tišlerová I, Hajdúch M: Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.*: **70**, 526 (2007)
- Wang C, Schuller Levis GB, Lee EB, Levis WR, Lee DW, Kim BS, Park SY, Park E: Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- α in activated RAW 264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.*: **4**, 1039 (2004)
- Weniger B, Lobstein A, Um BH, Vonthron-Sénéchau C, Anton R, Jiménez Usuga N, Basaran H, Lugnier C: Bioactive Triterpenoids from *Vochysia pacifica* Interact with Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozyme PDE4. *Phytother. Res.*: **19**, 75 (2005)

- Yamashita K, Lu H, Lu J, Chen G, Yokoyama T, Sagara Y, Manabe M, Kodama H: Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta*: **325**, 91 (2002)
- Yang ZG, Li HR, Wang LY, Li YH, Lu SG, Wen XF, Wang J, Daikonya A, Kitanaka S: Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and Their Nitric Oxide Production - Inhibitory and DPPH Radical-Scavenging Activities. *Chem. Pharm. Bull.*: **55**, 15 (2007)
- Yim JS, Kim YS, Moon SK, Cho KH, Bae HS, Kim JJ, Park EK, Kim DH: Metabolic Activities of Ginsenoside Rb1, Baicalin, Glycyrrhizin and Geniposide to Their Bioactive Compounds by Human Intestinal Microflora. *Biol. Pharm. Bull.*: **27**, 1580 (2004)
- Ying QL, Rinehart AR, Simon RR, Cheronis JC: Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. *Biochem. J.*: **277**, 521 (1991)
- You HJ, Choi CY, Kim JY, Park SJ, Hahm KS, Jeong HG: Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.*: **509**, 156 (2001)
- Yun Y, Han S, Park E, Yim D, Lee S, Lee CK, Cho K, Kim K: Immunomodulatory Activity of Betulinic Acid by Producing Pro-Inflammatory Cytokines and Activation of Macrophages. *Arch. Pharm. Res.*: **26**, 1087 (2003)
- Zdzisińska B, Rzeski W, Paduch R, Szuster-Ciesielska A, Kaczor J, Wejksza K, Kandfer-Szerszeń M: Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Pol. J. Pharmacol.*: **55**, 235 (2003)

PODĚKOVÁNÍ

Závěrem je mou milou povinností poděkovat všem těm, bez jejichž pomoci bych se při mém bádání a sepisování neobešla.

Můj největší dík patří mému školiteli doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D., za rady a konzultace, za to, že mi umožnil pracovat na vynikajícím pracovišti, a hlavně za to, že se mnou měl svatou trpělivost. Svému školiteli-konzultantovi doc. RNDr. Janu Černému, Ph.D., děkuji za cenné připomínky a za pomoc v nouzi.

Dále děkuji RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D., a doc. Ing. Michalu Hockovi, DrSc., že mi vždy ochotně vyšli vstříc, když jsem se potřebovala věnovat práci v Olomouci.

Děkuji rovněž Bc. Anně Janošťákové za velkou pomoc a rady při práci v laboratoři. Můj dík patří také Mgr. Jiřímu Novotnému, Ph.D., za zapůjčení luminometru. Janě Opluštilové a MUDr. Michaele Špenerové vděčím za skvělou a bezbolestnou práci při odebírání krve. Velmi děkuji také Zuzaně Cibulkové, DiS., za perfektní zajišťování všeho potřebného k mým olomouckým stážím. Můj dík náleží i všem dalším kolegům z Laboratoře experimentální medicíny, kteří mi vždy byli ochotni poradit a podat pomocnou ruku a vytvářeli příjemnou pracovní atmosféru.

Kolegům ze Skupiny přírodních látek děkuji za ochotu podělit se o jejich pracně připravené produkty, za podporu v mém činění i za neúnavný zájem o mou práci. Dík patří Bc. Mgr. Tomáši Kubelkovi, Mgr. Davidu Biedermannovi, Ph.D., RNDr. Karlu Berkovi, Mgr. Jiřímu Křížanovi a dalším, kdo si mou práci přečetli a cennými poznámkami přispěli k jejímu zlepšení.

Nemohu rovněž opomenout mé rodiče, kteří mi poskytli zázemí, podporovali mě a měli pochopení pro mé bláznivé nápady.