

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Natálie Živná

SYNTÉZA NOVÝCH LÁTEK S POTENCIÁLNÍM RADIOPROTEKTIVNÍM ÚČINKEM

Synthesis of novel compounds as potential radioprotectives

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Školitel konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, případně jinou instituci, kde byla vlastní práce v rámci spolupráce vykonána, je možné pouze po souhlasném stanovisku těchto institucí.

V Praze dne 3. června 2021

.....

Abstrakt

Škodlivé vlivy v životním prostředí, mezi něž se řadí i ionizující záření, a nezdravý životní styl vedou k rozšíření rakoviny v populaci po celém světě. Predikce pro následující dvě desetiletí odhadují, že dojde k 63% nárůstu nových diagnostikovaných případů rakoviny ročně. Radioterapie je jednou z nejúčinnějších a nejpoužívanějších léčebných metod rakoviny, kterou podstoupí až 50 % diagnostikovaných pacientů. I přes neustálé snahy radioterapii zefektivnit a omezovat její negativní vedlejší účinky, kvalita života vyléčených pacientů je stále snižována následky radioterapie. Radioprotektivní látky se zdají být jedním z klíčů ke zlepšení kvality jejich života.

Cílem této práce bylo připravit sérii aromatických látek obsahujících 1-(2-hydroxyethyl)piperazin, které mají potenciálně radioprotektivní účinky a fungují jako inhibitory vnitřní cesty apoptózy, čímž může dojít k ochraně radiosenzitivních zdravých tkání při radioterapii.

Klíčová slova: radioprotekce; apoptóza; syntéza; hydroxyethylpiperazin;

Abstract

Harmful substances polluting the environment, including ionizing radiation, and an unhealthy lifestyle are responsible for the increased incidence of cancer. The projected outlook for the next ten to twenty years suggests an increase of 63% in newly diagnosed cases of cancer annually. Radiotherapy is an important component of cancer treatment, given approximately to 50% of all cancer patients. Despite ongoing advances in the methods of radiotherapy, quality of life continues to be lowered as a result of the radiation treatment. Novel strategies towards improvement need to be adapted, such as the use of radioprotective substances.

The goal of this thesis is to synthesize novel radioprotective agents based on the 1-(2-hydroxyethyl)piperazine moiety targeting the intrinsic apoptotic pathway, therefore protecting healthy tissue from ionizing radiation.

Key words: radioprotection; apoptosis; synthesis; hydroxyethylpiperazine;

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě podporovali při zpracovávání této práce.

Děkuji všem, kteří se podíleli na vypracování této diplomové práce. Za vedení diplomové práce bych tímto ráda poděkovala svému školiteli konzultantovi PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. z Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové, a svému školiteli RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové, doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D., a jeho kolegům, kteří mi umožnili vypracování diplomové práce na jejich pracovišti. V neposlední řadě patří velké poděkování PharmDr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. za pomoc při analýzách připravených látek.

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Ionizující záření	11
2.2	Apoptóza	11
2.2.1	Bel-2 proteiny	12
2.3	Role buněčné signalizace při radioprotekci	14
2.3.1	NFκB signalizace	15
2.3.2	MAPK signalizace	17
2.3.3	PI3k/Akt signalizace	18
2.3.4	STAT3 signalizace	18
2.3.5	p53 signalizace	18
2.4	Radioprotektiva	19
2.4.1	Radioprotektivní látky přírodního původu	20
2.4.2	Syntetická radioprotektiva obsahující thiolovou skupinu	21
2.4.3	Syntetická radioprotektiva neobsahující thiolovou skupinu	22
3	Cíl práce	24
4	Experimentální část	25
4.1	Použitý materiál a přístrojové vybavení	25
4.1.1	Chemikálie pro organickou syntézu	25
4.1.2	Instrumentální vybavení	26
4.1.3	Analýza produktů	26
4.2	Obecný postup syntéz	28
4.2.1	Příprava 1-(4-methoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (1b)	31
4.2.2	Příprava 1-(3,4-dimethoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (2b)	32
4.2.3	Příprava 1-(4-ethoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (3b)	33
4.2.4	Příprava 1-(2-methoxy-4-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (4b)	34
4.2.5	Příprava 1-(3-chlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (5b)	35
4.2.6	Příprava 1-(3,4-dichlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (6b)	37
4.2.7	Příprava 1-(2,4,5-trichlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (7b)	38

4.2.8	Příprava 1-(4-fluorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (8b).....	39
4.2.9	Příprava 1-(4-fluor-2-chlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (9b).....	40
4.2.10	Příprava 1-(3,4,5-trifluorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (10b).....	41
4.2.11	Příprava 1-[4-(4-fluorfenoxy)fenoxy]-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (11b).....	42
4.2.12	Příprava 1-(2-fluor-4-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (12b).....	43
4.2.13	Příprava 1-(3-fluor-4-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (13b).....	44
4.2.14	Příprava 1-(2,3-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (14b).....	46
4.2.15	Příprava 1-(2,5-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (15b).....	47
4.2.16	Příprava 1-(4-chlor-3-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (16b).....	48
4.2.17	Příprava 1-(4-methoxy-2-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (17b).....	49
4.2.18	Příprava 1-(3,4-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (18b).....	50
4.2.19	Příprava 1-(3-methoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (19b).....	51
5	Výsledky a diskuze.....	52
6	Závěr.....	60
7	Bibliografie.....	61

Seznam zkratek a symbolů

Akt	proteinkinasa B (z angl. Thymomas of <u>AKR</u> mice)
Apaf-1	faktor 1 aktivující apoptickou proteasu (z angl. Apoptotic Protease Activating Factor 1)
Bad	z angl. Bcl-2 Associated Death Promoter
Bak	z angl. Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	z angl. Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2	B-buňky lymfomu 2 (z angl. B-Cell Lymphoma 2)
Bcl-xL	z angl. Bcl-2-Extra Large
Bcl-xS	z angl. Bcl-2-Extra Small
BH	Bcl-2 homologie
Bid	z angl. BH3 Interacting-Domain Death Agonist
Bik	z angl. Bcl-2-Interacting Killer
Bim	z angl. Bcl-2-Like Protein 11
C	Celsius
CD	software ChemDraw
c-IAP	buněčné inhibitory proteinu apoptózy (z angl. Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein)
clogP	kalkulovaný logaritmus rozdělovacího koeficientu P
DNA	deoxyribonukleová/é kyselina/y
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ERCC1	opravný protein excize DNA (z angl. DNA Excision Repair Protein)
ERK	extracelulárně regulované kinasy
FADD	z angl. Fas-Associated Protein with Death Domain
Fas	z angl. FS-7-Associated Surface Antigen
G fáze	růstová fáze (z angl. Growth Phase)
g	gram
Gy	Gray
HESI	vyhříváný ionizační elektrosprej
IZ	ionizující záření
IκB	inhibitor NFκB

JNK	c-Jun N-terminální kinasy
M	molární (mol/l)
Ma	software Marvin
M fáze	mitóza (z angl. Mitosis Phase)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
MAPKK	mitogenem aktivované proteinkinasy kinasy
Mcl-1	z angl. Myeloid Cell Leukemia 1
ml	mililitr
mmol	milimol
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
NFκB	nukleární faktor κ B
NK	přírození zabíječi (z angl. Natural Killer)
NMR	nukleární magnetická rezonance
Noxa	z angl. Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
OP	obecný postup
P	rozdělovací koeficient
PDK	fosfatidylinositol-dependentní kinasa
PI3k	fosfatidylinositol 3-kinasa
PUMA	z angl. P53-Upregulated Modulator of Apoptosis
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
S fáze	fáze syntézy (z angl. Synthesis Phase)
SAPK	stresem aktivované proteinkinasy
SOD	superoxid dismutasa
STAT	signálový převodník a aktivátor transkripčního faktoru
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin-Layer Chromatography)
TNF	faktor nádorové nekrózy (z angl. Tumor Necrosis Factor)
TNFR	receptor faktoru nádorové nekrózy
Wip1	wild-type p53-indukovaná fosfatasa 1 (z angl. Wild-Type p53-Induced Phosphatase 1)
XRCC1	rentgenově opravný křížově se doplňující protein 1 (z angl. X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1)

1 Úvod

V roce 2018 bylo diagnostikováno 17 milionů nových případů rakoviny po celém světě a je předpoklad, že v roce 2040 bude ročně přibývat až 27,5 milionu nových případů^{1,2}. Počet přeživších pacientů rakoviny stoupá díky brzké diagnostice a zlepšování léčby³, přesto mnozí pacienti trpí následky léčby rakoviny. Přibližně 50 % pacientů trpících rakovinou je léčeno radioterapií⁴⁻⁷. Pro některé druhy rakoviny je úspěšnost léčby vysoká, např. u brzkého stádia rakoviny hrtanu, pro jiné druhy rakoviny tak vysoká úspěšnost není⁸. Zvýšením účinnosti radioterapie je možné zlepšit vyhlídky na uzdravení pro mnohé pacienty. S vývojem radioterapie je nyní možné podat přesnou dávku nádorovým buňkám, a zároveň snížit nechtěnou dávku, které jsou vystavené zdravé buňky⁹. I přes veškeré snahy o zlepšování radioterapie, pacienti stále postihují výrazné negativní vedlejší účinky, které ovlivňují a snižují kvalitu jejich života. Navíc je nutné pečovat o pacienty trpící následky radioterapie¹⁰, což je i z ekonomického hlediska nevýhodné. Jedním ze způsobů dalšího zlepšení terapie je zavedením radioprotektivních látek.

Radioprotektivní látky by měly mít vysoký stupeň protekce, vhodný způsob podání, nízkou toxicitu a kompatibilitu s jinými léčivy pacienta. Vychytávání a eliminace volných radikálů jsou hlavním mechanismem dosud známých a používaných radioprotektiv¹¹. V posledních letech je snaha najít i jiné možné mechanismy, mezi něž patří i reverzibilní a dočasná inhibice apoptózy^{12,13}. Apoptóza je převážně regulována proteinem p53 (cit. ¹⁴), který při stresových podmínkách zvyšuje expresi různých proteinů, mezi nimi i proteinu PUMA, který má nejvýraznější vliv na průběh apoptózy¹⁵. Inhibitory proteinu PUMA by mohly být látky s potenciálním radioprotektivním účinkem.

2 Teoretická část

2.1 Ionizující záření

Ionizující záření (IZ) se skládá z elektromagnetických vln (rentgenové paprsky a γ -záření) nebo z částic (α , β nebo neutronů)^{16,17}. Expozice IZ je spojována s výskytem leukemie, rakoviny prsu, rakoviny štítné žlázy a dalších nádorů¹⁸, což bylo prokázáno při dlouhodobé studii přeživších po druhé světové válce v Japonsku¹⁹.

IZ má okamžitě měřitelné účinky na buňky, kdy dochází ke zvýšení množství reaktivních forem kyslíku (ROS)²⁰, tvorbě jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů deoxyribonukleové kyseliny (DNA)^{21,22}. Přesto jsou některé vlastnosti IZ používány v průmyslu, zemědělství, a především v medicíně pro diagnostické a léčebné účely²³. IZ způsobuje v živých systémech buněčnou smrt, což je pro léčbu malignit efekt žádoucí²⁴.

Nádorová buňka je poškozena a smrt je vyvolána skrz několik drah buněčné smrti²⁵. Zdravá tkáň je při poškození IZ vedena především k řízené buněčné smrti, tzv. apoptóze²⁶, což bylo prokázáno při experimentech na radiosenzitivních tkáních, jako je např. gastrointestinální epitel²⁷. Tato apoptóza se jeví jako převážně p53-dependentní (viz Kap. 2.3.5), což prokazují experimenty na p53-deficientních myších, které vykazovaly rezistenci vůči IZ v porovnání s nemutovanými myši (wild-type)²⁸.

IZ interaguje s tkáněmi přímo i nepřímo. Nepřímé IZ využívá volných radikálů k poškození biomolekul²⁹. Při přímé interakci IZ poškozuje biomolekuly, jako jsou proteiny, lipoidy a obzvláště DNA, při jejichž poškození je ukončeno buněčné dělení a proliferace, to pak vede k nekróze nebo apoptóze³⁰. Dlouhodobým studiem procesu regulace apoptózy bylo zjištěno, že mnohé patologické děje souvisí právě s dysregulací programované smrti³¹. Vysoké dávky IZ vedou k akutnímu radiačnímu syndromu, zejména v hematopoetickém, gastrointestinálním a centrálním nervovém systému³².

2.2 Apoptóza

Buněčná smrt je programovaný proces definovaný morfologickými změnami, kterým se hromadně říká apoptóza³³. Tento termín byl v tomto významu poprvé publikován Kerrem a kol. v roce 1972 (cit. ³⁴). V mnohobuněčných organismech má programovaná buněčná smrt velký význam. Např. u embryí jsou pomocí apoptózy odstraněny

přebytečné buňky mezi vznikajícími prsty³⁵.

Apoptóza byla nejprve detekována pomocí morfologických změn^{36,37}. V první fázi se buňka smršťuje kvůli ztrátám vody. Chromatin se shromažďuje v půlměsíkových útvarech na okraji jaderné membrány. Výše popsany proces se označuje jako pyknóza³³. Následně se buňka rozpadne na menší fragmenty oddělené od okolí buněčnou membránou. Tyto fragmenty bývají následně pohlceny makrofágy^{36,37}.

Proces programované buněčné smrti je běžnou součástí organismů k regulaci buněčné populace, a tedy slouží k zachování homeostázy³³. Kromě této funkce je apoptóza využívána jako obranný mechanismus v imunitních reakcích při poškození buňky škodlivou látkou nebo mikrobiální nákazou^{37,38}. Novější výzkumy ukazují, že apoptózu je možné spustit vnější a vnitřní cestou. Igney a kol. popsali ve své publikaci z roku 2002 principy, které nasvědčují tomu, že tyto dvě cesty se mohou navzájem ovlivňovat³⁹.

Vnější cesta u mnohobuněčných organismů je ovlivňována signály k přežití nebo ke smrti. Deficit signálů přežití automaticky spouští apoptózu. Dalším zdrojem buněčné smrti mohou být spouštěcí faktory, jako je např. poškození DNA, vypuštění faktoru nádorové nekrózy (TNF) nebo aktivace Fas receptorů⁴⁰ (z angl. FS-7-Associated Surface Antigen), které patří do rodiny TNF receptorů (TNFR). Cytotoxické T lymfocyty a NK buňky (z angl. Natural Killer) přes tento receptor spouštějí apoptózu u cílových buněk^{41,42}. Po navázání správného ligandu na Fas receptor dojde k jeho trimerizaci. Některé receptory, včetně Fas receptoru, obsahují cytoplazmatickou doménu smrti, proto se jim říká receptory smrti⁴³. Přes doménu smrti interaguje Fas receptor s adaptorovým proteinem FADD (z angl. Fas-Associated Protein with Death Domain), což vede ke spuštění některých proteas a konečně k apoptóze⁴⁴.

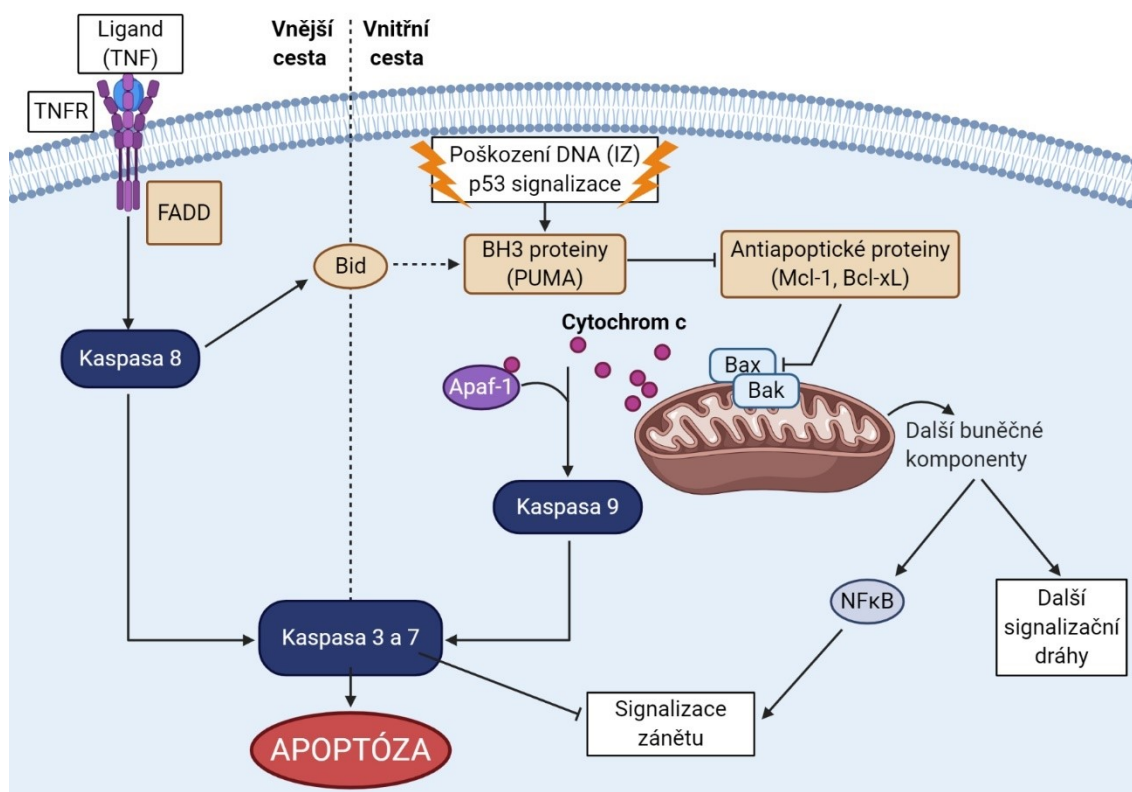
Vnitřní cesta může být spuštěna různými signály, mezi nimi i poškození DNA způsobené IZ⁴⁵. Následná apoptóza je regulována proapoptickými a antiapoptickými⁴⁶ proteiny z rodiny Bcl-2 (z angl. B-Cell Lymphoma 2)⁴⁷. Funkce těchto proteinů je určována Bcl-2 homologií (BH) domén⁴⁸. Antiapoptické proteiny obsahují BH1, BH2, BH3 a BH4 domény, proapoptické mají BH3 doménu.

2.2.1 Bcl-2 proteiny

Proteiny z této rodiny se dělí do třech podrodin. První podrodina zahrnuje proteiny s následujícími názvy uvedenými v angličtině: Bcl-2-Associated X Protein (Bax)⁴⁹, Bcl-2

Homologous Antagonist Killer (Bak)⁴⁵ nebo Bcl-2-Extra Small (Bcl-xS)⁵⁰, které interagují s póry nebo kanály ve vnější mitochondriální membráně a podporují apoptózu^{51,52}.

Druhá podrodina obsahuje proteiny s názvy v angličtině: Bcl-2-Extra Large (Bcl-xL)^{53,54} nebo Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1)⁵⁵. Omezují uvolnění cytochromu c vychytáváním proapoptických faktorů⁵⁶. Jsou zakotvené ve vnitřních membránách a interagují s dalšími členy rodiny Bcl-2, např. Bax nebo Bak.



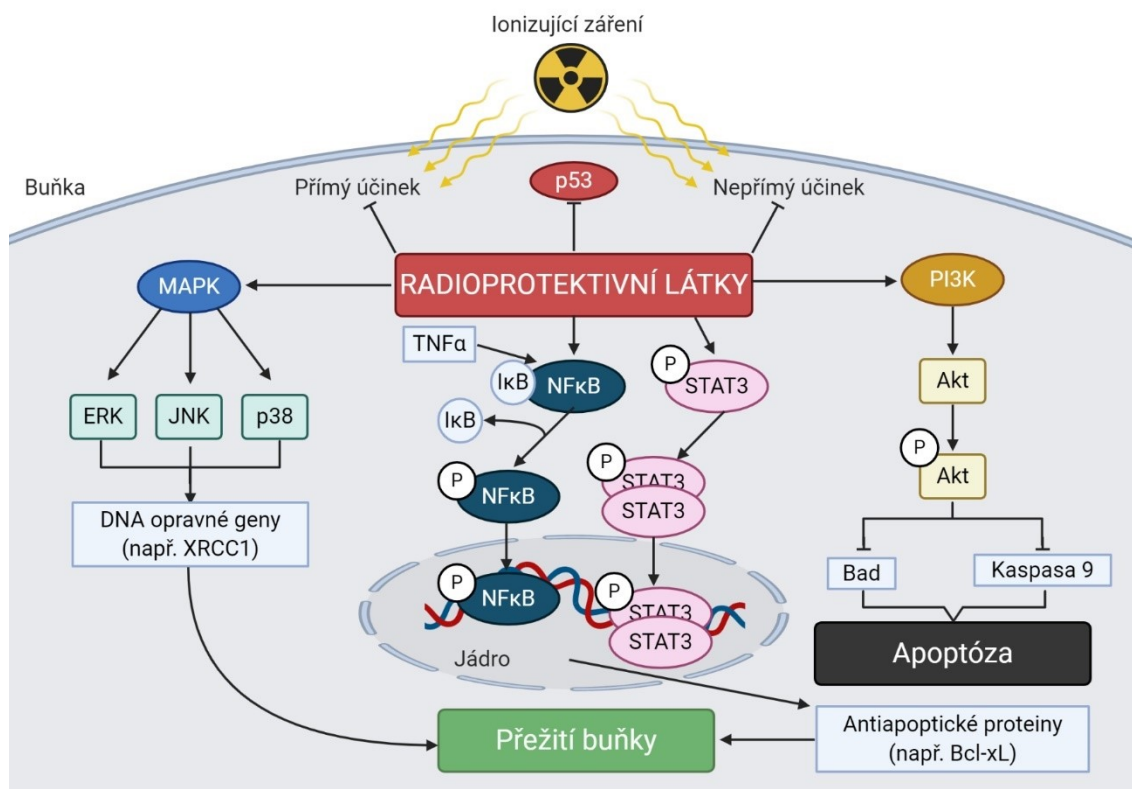
Obr. 2.1: Schéma kaspasové kaskády při apoptóze probíhající vnější a vnitřní cestou. Po navázání faktoru nádorové nekrózy (TNF) na TNF receptor (TNFR) dojde skrz protein FADD (z angl. Fas-Associated Protein with Death Domain) k aktivaci kaspasy 8. Kaspasa 8 aktivuje kaspasy 3 a 7, které vedou k apoptóze. Kaspasa 8 aktivuje pomocí proteinu Bid (z angl. BH3 Interacting-Domain Death Agonist) proteiny s Bcl-2 homologií 3 (BH3). Tyto proteiny jsou u vnitřní apoptózy exprimované při poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a inaktivují antiapoptické proteiny, které inhibují proteiny Bax (z angl. Bcl-2-Associated X Protein) a Bak (z angl. Bcl-2 Homologous Antagonist Killer). Po vypuštění Bax a Bak dojde k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a k uvolnění cytochromu c a dalších buněčných komponent. Cytochrom c se naváže na faktor 1 aktivující apoptickou proteasu (Apaf-1) a následně aktivují kaspasu 9. Kaspasa 9 aktivuje kaspasy 3 a 7, které kromě apoptózy také inhibují signalizaci zánětu, kterou může vyvolávat např. signalizace nukleárního faktoru κ B (NF κ B). Převzato a upraveno podle cit. ⁵⁷ v BioRenderu.

Třetí podrodina se skládá z proteinů s anglickými názvy: Bcl-2-Associated Death Promoter (Bad)⁵⁸, BH3 Interacting-Domain Death Agonist (Bid)⁵⁹, Bcl-2-Like Protein 11 (Bim)⁶⁰, Bcl-2-Interacting Killer (Bik)⁶¹, Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 (Noxa)⁶² a P53-Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA)^{63,64}. S ostatními proteiny z jiných podrodin sdílejí pouze BH3 doménu. Běžně jsou inertní, aktivují se až vhodným stimulem. Poté inaktivují antiapoptické faktory, které interferují s proapoptickými faktory. Následně dochází vlivem Bax a Bak ke zvýšení propustnosti vnější mitochondriální membrány a uvolnění faktorů apoptózy, jako je cytochrom c (cit. ⁶⁵). Poté se cytochrom c naváže na faktor 1 aktivující apoptickou proteasu (Apaf-1)⁶⁶ (viz Obr. 2.1). Podle studie Segala a kol. z roku 2007 má konkrétně protein Bid klíčovou roli v propojení vnější a vnitřní cesty apoptózy⁶⁷.

Spojením s prokaspasou 9 vznikne proteinový komplex zvaný apoptozom. Apoptozom štěpí prokaspasu na její aktivní formu kaspasu 9 (cit. ⁶⁸). Ta má za úkol štěpit prokaspasu 3 na kaspasu 3 (cit. ⁶⁹⁻⁷¹). Schéma je zobrazeno na Obr. 2.1. V rámci kaspasové kaskády dochází k aktivaci dalších specifických proteas. Ty mají s apoptózou několik souvisejících vlastností jako např. rozklad jaderných lamin^{72,73} nebo štěpení specifických proteinů, které např. drží inaktivní DNAsu, kterou tak uvolní pro štěpení DNA^{74,75}. Buňka se sama rozloží na menší části – apoptická tělíška, která jsou následně pozřena jinou buňkou.

2.3 Role buněčné signalizace při radioprotekci

Expozice IZ spouští několik buněčných signalizací, které vyvolávají buněčnou odpověď, jako je apoptóza, buněčná senescence, aktivace restrikčních bodů a oprava DNA⁷⁶. U radioprotekce hrají roli signalizace nukleárního faktoru κ B (NF κ B), signalizace mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK), signalizace fosfatidyl-inositol-3 kinas (PI3k/Akt), signalizace signálového převodníku a aktivátoru transkripčního faktoru 3 (STAT3) a signalizace p53 (viz Obr. 2.2). Předpokládáme, že cílem látek připravených v této práci budou právě signalizační dráhy p53.



Obr. 2.2: Schéma buněčné signalizace při radioprotekci. Buňka je vystavena ionizujícímu záření (IZ), radioprotektivní látky blokují signalizace p53. Je spuštěna signalizace mitogenem aktivovaných proteinkinaz (MAPK), která zvyšuje expresi opravných genů deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jako je např. rentgenově opravný křížově se doplňující protein 1 (XRCC1), což vede k přežití buňky. Radioprotektivní látky spouští signalizaci nukleárního faktoru κ B (NF κ B) přes faktor nádorové nekrózy α (TNF α), dojde k odstupu inhibitoru κ B (I κ B) a NF κ B se fosforyluje. Následně dojde k jeho přenosu do jádra, kde spouští transkripci antiapoptických proteinů, jako je např. protein Bcl-2-Extra Large (Bcl-xL), to vede k přežití buňky. Aktivace STAT3 vede k transkripci cílových genů, které mají na starost přežití buňky a proliferaci. PI3K při aktivaci IZ aktivuje Akt, která následně inhibuje proapoptické proteiny, jako je Bcl-2-Associated Death Promoter (Bad) nebo např. kaspasu 9, čímž blokuje apoptózu. Převzato a upraveno podle cit. ⁷⁷ v BioRenderu.

2.3.1 NF κ B signalizace

Nukleární faktor κ B (NF κ B) se v buňkách podílí na buněčné proliferaci⁷⁸, apoptóze⁷⁹, při imunitních⁸⁰ a zánětlivých reakcích^{81,82}. U savčích buněk je známých pět NF κ B proteinů: c-Rel, Rel A (p65), Rel B, NF κ B1 (p105/p50) a NF κ B2 (p100/p52).

Zdravé nedělicí se buňky mají NF κ B v cytoplasmě v neaktivní formě. Aktivita je kontrolována skupinou regulačních proteinů, kterým se říká inhibitory NF κ B (I κ B). Signalizace NF κ B se ukázala jako radioprotektivní při aktivaci např. TNF α . Tento faktor se naváže na TNFR a přes několik mezikroků dojde k interakci s I κ B kinasovým komplexem, k fosforylaci I κ B, což následně vede k ubiquitinaci a degradaci této

molekuly^{83,84}. Poté dojde k translokaci NFκB do jádra^{85,86}.

NFκB obsahuje nukleární lokalizační sekvenci, která označuje protein pro transport k jádru⁸¹. Při vazbě NFκB a IκB je tato sekvence maskovaná a proteinový komplex zůstává v cytoplazmě. K DNA se NFκB váže v podobě homodimeru nebo heterodimeru a působí jako transkripční aktivátor⁸⁷. Selektivita je závislá na kompozici dimeru, časování a typu buňky⁸⁸.

Při mitotickém buněčném dělení buňka opouští klidovou fázi G₀ a pokračuje do fáze DNA syntézy (S) a mitózy (M)^{89,90}. Dvě růstové fáze, G₁ a G₂, se nachází před a po S fázi. Aby se buňka mohla dělit, musí projít restrikcími body. První z nich se nachází na konci G₁ fáze. Průchod tímto restrikcími bodem je podporován antiapoptickou aktivitou cyklinů (např. skupina D, cyklin E a cyklin A)⁹¹.

NFκB interferuje s apoptickými signály na různých úrovních⁹². TNFR1 je propojen FADD adaptorem ke kaspasové kaskádě, která zahrnuje iniciační kaspasy 8 a 10 (cit. ⁹³). V mnohých buňkách ale TNF nemá žádný apoptický efekt, což je způsobeno paralelní signalizací spuštěnou TNF, která aktivuje NFκB pomocí adaptorových proteinů. Tím dojde k indukci antiapoptických proteinů, jako jsou buněčné inhibitory proteinů apoptózy 1 a 2 (c-IAP-1 a c-IAP-2), které přímo blokují funkci kaspas nebo spouští jejich degradaci ubiquitin-proteasomovou dráhou⁹⁴. Dochází i k expresi faktorů asociovaných s TNFR, které amplifikují NFκB a blokují kaspasovou kaskádu na úrovni TNFR1 (cit. ⁹⁵).

Druhá signální cesta apoptózy, která je NFκB ovlivněna, vede skrz mitochondrie. Změny transmembránového potenciálu vedou k uvolnění cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c v koordinaci s Apaf-1 a deoxyadenosin trifosfátem spouštějí iniciační kaspasu 9 (cit. ⁹⁶). Tato signalizace je kontrolována na obou mitochondriálních membránách pomocí proteinů z rodiny Bcl-2 (obsahuje proapoptické i antiapoptické zástupce).

NFκB přepisuje z genů několik antiapoptických proteinů, např. Bcl-xL, které brání uvolnění cytochromu c, a tedy aktivaci apoptózy skrze kaspasu 9 (cit. ⁹⁷). NFκB a p53 mají opačné funkce, kdy p53 indukuje proapoptické proteiny^{98,99}, a často soutěží o interakce s transkripčními kofaktory¹⁰⁰. V některých případech je NFκB nutná k proapoptické aktivitě p53, což dokazuje, že interakce mezi těmito dvěma signalizacemi je velmi komplexní¹⁰¹.

2.3.2 MAPK signalizace

Mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) se dělí do třech rodin. U savců se jedná o extracelulárně regulované kinasy (ERK), c-Jun N-terminální kinasy (JNK) a stresem aktivované proteinkinasy (p38/SAPK) (cit. ¹⁰²). MAPK regulují procesy typu buněčné proliferace, diferenciaci a buněčné smrti^{103–105}. MAPK nejbližší k signálnímu zdroji se označuje jako MAP kinasa kinasa kinasa, která je součástí trojitě kaskády¹⁰⁶, po aktivaci fosforyluje MAP kinasu kinasu (MAPKK). MAPKK poté fosforyluje třetí vrstvu kaskády MAPK^{107,108}. Aktivace těchto kinas transkripčními faktory vede k expresi cílových genů a buněčné odpovědi. MAPK mohou být aktivovány různými stimuly, např. IZ, cytokiny nebo růstovými faktory. IZ u tumorových buněk spouští řadu signalizací, které jsou regulovány MAPK. IZ aktivuje všechny tři rodiny MAPK^{106,109}.

Amorino a kol. ve své studii z roku 2002 popisují, že IZ aktivuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), který následně spouští ERK signalizaci¹¹⁰. Klinicky významné dávky IZ v rozmezí jednoho až pěti Gy (Gray) napodobují efekt epidermálního růstového faktoru, čímž dojde k aktivaci EGFR^{110,111}. ERK signalizace přímo inhibuje proapoptické proteiny Bad, Bim a kaspasu 9 (cit. ¹¹²) a reguluje expresi antiapoptických proteinů, např. Bcl-xL nebo Mcl-1¹¹³. Zvýšením exprese opravných proteinů DNA, konkrétně rentgenově opravného křížově se doplňujícího proteinu 1 (XRCC1) nebo opravného proteinu excize DNA (ERCC1), podporuje tato signalizace opravu DNA¹¹⁰.

Aktivita JNK signalizace je vyvolána faktory, které poškozují DNA, jako např. IZ, cytotoxické látky a ROS¹¹⁴. Studie Potapové a kol. z roku 1997 ukazuje, že tato signální dráha se spouští při DNA poškození vyvolané cis-platinou¹¹⁵.

Signalizace přes p38 MAPK může být spuštěna různými stresovými a zánětlivými faktory. Většina studií o této kinase se soustředí na jednu z jejích isoform, p38 α . Z článku Cuenda a kol. z roku 2007 vyplývá, že některé isoformy tohoto enzymu by mohly působit proonkogenicky, a některé jako tumorové supresory¹¹⁶. Není jasné, zda IZ může mít vliv na regulaci aktivity p38 MAPK. Dle studie Wanga a kol. z roku 2000 má isoforma p38 γ vliv na restrikční bod v G2/M fázi¹¹⁷.

2.3.3 PI3k/Akt signalizace

Stejně jako NFκB a MAPK signalizace se tato dráha řadí do tzv. „signalizace přežití“¹¹⁸. Proteinkinasa B (Akt) je serin/threonin specifická proteinkinasa, která se podílí na průběhu buněčného cyklu, utlumení apoptózy a na metabolismu glukosy^{119,120}. Akt indukují růstové faktory, jako EGFR ligandy, nebo IZ skrze EFGR aktivaci fosfatidylinositol 3-kinasy (PI3k)^{121,122}. Po aktivaci PI3k její katalytická podjednotka (p110) spustí fosfatidylinositol-dependentní kinasu (PDK) 1, fosforylací threoninu dojde k počáteční aktivaci. PDK2 poté fosforyluje serin, což vede k plné aktivaci Akt¹²³. Akt signalizuje přežití buňky inhibicí proapoptických proteinů Bax, Bad, Bim a kaspasy 9 (cit. ^{124–126}), a zároveň podporuje transkripci genů pro antiapoptické proteiny, např. Bcl-xL (cit. ¹²⁶).

2.3.4 STAT3 signalizace

Signálový převodník a aktivátor transkripčního faktoru (STAT) je aktivován různými růstovými faktory, cytokiny a během stresu. Z rodiny STAT jsou významné STAT3 a STAT5, které podporují proliferaci rakovinotvorných buněk. Konkrétně STAT3 napomáhá progresi tumoru skrze buňky imunitního systému¹²⁷, kde podporuje expresi imunosupresivních faktorů a blokuje imunostimulační molekuly¹²⁸. Podíl STAT3 při onkogenní signalizaci z něj dělá ideální cíl pro vývoj léčiv při imunoterapii¹²⁸. Mimo jiné Liang a kol. ve své práci z roku 2012 zjistili, že STAT3 podporuje regeneraci vlasových buněk přes aktivaci kmenových buněk, jejich dělení a diferenciaci, obzvláště u pacientů po radioterapii^{129,130}, což by mohlo vést ke zlepšení kvality života pacientů.

2.3.5 p53 signalizace

Protein p53 je tumor supresorový protein¹³¹. Ztráta nebo mutace tohoto proteinu je spojená se zvýšeným výskytem rakoviny¹⁴. Přibližně 50 % těchto malignit nese mutaci pro p53 a zbývajících 50 % má p53 neaktivní¹³². P53 působí jako transkripční faktor, který může negativně i pozitivně ovlivňovat expresi cílových genů. Vlivem jejich působení je vyvolána buněčná odpověď, jako je zastavení buněčného cyklu a buněčná smrt¹⁴.

Koncentrace p53 je silně regulována pomocí ubiquitin ligas, protože se jedná o silného

mediátora apoptózy, který se běžně v buňkách vyskytuje v nízké koncentraci. Při buněčné odpovědi na stres je p53 stabilizován pomocí posttranslačních modifikací, které ovlivňují vazbu p53 na ubiquitin ligasu a vytváří tak sérii zpětných vazeb. Následně p38 MAPK fosforyluje p53 na serinu 33 a 46, což napomáhá stabilizaci a aktivaci p53 (cit. ^{105,133}). Aktivovaný p53 indukuje expresi wild-type p53-indukované fosfatasy 1 (Wip1), která vytváří regulační negativní zpětnou vazbu na p38 MAPK/p53 signalizaci¹³⁴.

Bcl-2 rodina proteinů s pouze BH3 doménou je přímým transkripčním cílem p53 (cit. ⁶³). Protein Noxa zastává pouze minoritní roli při spouštění apoptické kaskády. Protein PUMA je zodpovědný za většinu proapoptických aktivit vyvolaných p53 (cit. ¹⁵). Zatímco nádorové buňky u radioterapie umírají skrze několik signalizací buněčné smrti, zdravé buňky umírají především apoptózou, což dělá z PUMA skvělý cíl pro vývoj potenciálních léčiv^{135,136}. Mnohé studie potvrdily, že dočasná a reverzibilní inhibice p53 chrání radiosenzitivní tkáň, jako gastrointestinální^{12,137} a hematopoetický^{13,138} systém, a není spojená s nárůstem karcinogenity.

2.4 Radioprotektiva

S objevem negativních účinků IZ bylo nutné zahájit vývoj látek s radioprotektivním účinkem, které by bylo možné použít při plánované expozici nebo jaderných havárií pro ochranu zdravé tkáně¹³⁹. Např. účinek radioterapie je omezen radiorezistencí tumorových buněk a rozsahem poškození zdravé tkáně, které se projevuje v podobě buněčné smrti, genetických mutací a karcinogeneze^{24,140,141}. Pomocí látek, které by senzitivizovaly tumorové buňky nebo pomocí radioprotektivních látek, které by chránily zdravou tkáň, je možné rozšířit terapeutické okno radioterapie. Protože IZ indukuje apoptózu skrze buněčnou odpověď na poškození DNA, potenciální radioprotektivní látky mohou být mezi signálními molekulami této buněčné odpovědi. Proapoptické faktory vnitřní cesty apoptózy se zdají být vhodným cílem pro radioprotekci. Bcl-2 proteiny, které mají více BH domén se nezdají jako vhodný cíl. Např. Bak a Bax jsou schopni svoji funkci navzájem nahradit. V práci Wei a kol. z roku 2001 bylo prokázáno, že pouze buňky, kterým chybí Bak i Bax jsou odolné vůči stimulům z vnitřní apoptické cesty. Buňky, kterým chybí pouze jeden z těchto proteinů, rezistentní nejsou¹⁴².

Třetí podrodina Bcl-2 rodiny, která obsahuje pouze BH3, se zdá být vhodným cílem. Garrison a kol. ve svém článku z roku 2012 uvádí, že přítomnost PUMA a Bim proteinů

významně zvyšuje toxicitu během radioterapie a chemoterapie v kostní dřeni a gastrointestinálním traktu¹⁴³. Jejich odstranění nebo blokování zvyšuje radiorezistenci systému. Samotná ztráta Bim k přežití modelového organismu nepřispívá, ale zesiluje radiorezistenci, pokud chybí i PUMA¹⁴³. Mustata a kol. ve své publikaci z roku 2011 identifikovali a testovali *in vitro* 13 potenciálních PUMA inhibitorů. Deset z těchto sloučenin redukovalo apoptózu indukovanou adenovirem. Tři z těchto látek byly dále testovány na rakovinných buněčných liniích, kde radioprotektivní účinky vykazovaly pouze dvě látky²⁵. Výzkum této diplomové práce je proto zaměřen na inhibitory proapoptického proteinu PUMA, které rozrušují interakci mezi PUMA a antiapoptickými členy Bcl-2 rodiny^{144,145}.

2.4.1 Radioprotektivní látky přírodního původu

Buněčná radioprotektiva se nachází v téměř všech živých buňkách a jejich exprese je vyvolána buněčným stresem. Mitochondriální superoxid dismutasa (SOD) a glutathion poskytují radioprotekci přeměňováním škodlivých ROS na méně škodlivé látky¹⁴⁶. SOD přeměňuje superoxidové anionty, které vznikají např. při oxidativní fosforylaci, na peroxid vodíku, který je následně katalasou přeměněn na vodu a kyslík¹⁴⁷. Studie Robbinse a kol. z roku 2014 poukazuje na souvislost mezi ztrátou enzymatické aktivity SOD a zvýšením citlivosti buněk ke genotoxickým podmínkám a rakovině¹⁴⁸. Glutathion je tripeptid, který se účastní mnoha buněčných funkcí, zejména je využíván při obraně buněk před nebezpečnými následky IZ¹⁴⁹. Většinou se vyskytuje ve své redukované formě a pomocí glutathionperoxidasy přeměňuje peroxid vodíku na vodu.

Antioxidanty jsou obecně uznávané jako radioprotektiva, protože blokují propagační řetězec reakcí vyvolaných volnými radikály¹⁵⁰. Do této skupiny se především řadí vitamíny A, C, E, a selen. Vitamín A i C fungují i proti vnitřním radionuklidům^{151,152}, jako je jod-131, který se používá např. k léčbě rakoviny štítné žlázy¹⁵³. Vitamín C redukuje chromozomální aberace vycytáváním volných radikálů¹⁵⁴. Srinivasan a kol. vydali v roce 1992 studii, kde vitamín E samotný, i v kombinaci s radioprotektivem WR-3689, zvyšuje životnost ozářených myší¹⁵⁵. Steinbrenner a kol. a Tinggi zase ve svých pracích poukazují na antioxidační roli selenoproteinu P při obraně proti ROS a reaktivním formám dusíku^{156,157}.

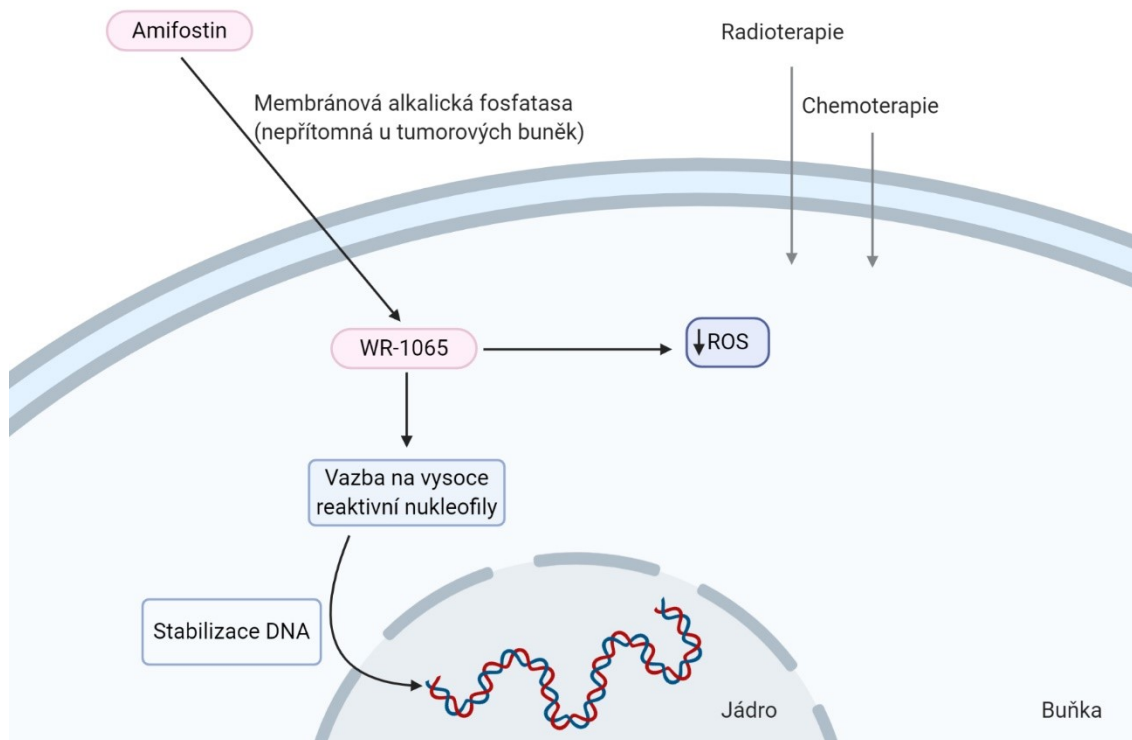
Melatonin je hormon šišinky, který je schopný vycytávat hydroxylové a peroxidové

volné radikály¹⁵⁸. Také stimuluje imunitní systém, díky čemuž snižuje negativní účinky IZ na organismus¹⁵⁹. Antitumorové a radiosensitizující účinky melatoninu mohou také zvýšit negativní účinky IZ na tumory¹⁶⁰.

2.4.2 Syntetická radioprotektiva obsahující thiolovou skupinu

Již v roce 1949 Patt a kol. zjistili, že aminokyselina cystein, která obsahuje thiolovou skupinu, má radioprotektivní účinky¹⁶¹. Na základě těchto poznatků byly syntetizovány radioprotektivní látky s thiolovou skupinou, zejména amifostin a také PrC-210. Amifostin se začal jako radioprotektivum používat v roce 1995 (cit. ¹⁶²). Z preklinických studií vyplývá, že amifostin selektivně chrání zdravé buňky zastavením řetězce reakcí spuštěných volnými radikály, zrychluje obnovu poškozené DNA a indukuje buněčnou hypoxii^{163,164}. Amifostin sám nemá radioprotektivní účinky, mění se na aktivní metabolit WR-1065 pomocí alkalických fosfatů¹⁶⁵ (viz Obr. 2.3). Selektivní protekce je dána vyšší akumulací WR-1065 ve zdravých tkáních než v tumorových buňkách, což je způsobeno nedostatečným prokrvením tumorové tkáně^{163,164}, nízkým intersticiálním pH a redukovanou expresí alkalických fosfatů¹⁶⁶. Huang a kol. prokázali, že amifostin alespoň částečně funguje 53-dependentním mechanismem¹⁶⁷. Jeho použití v klinické praxi je ale omezené kvůli vedlejším účinkům a toxicitě^{168,169}.

PrC-210 je novější aminothioloový analog, u kterého bylo prokázáno, že zabraňuje druhému až třetímu stupni radiodermatitidy, která je následkem radioterapie. Peebles a kol. ve své práci z roku 2012 píše, že myši, kterým byl podán PrC-210 intraperitonálně/orálně, prokazovaly 100% přežití¹⁷⁰. Dle navazující práce Sorefa a kol. z roku 2012 při experimentech na myších nebyly prokázány vedlejší účinky jako nevolnost, zvracení nebo hypotenze¹⁷¹. Tyto vlastnosti PrC-210 z něj dělají vhodného kandidáta pro vývoj nových radioprotektiv.



Obr. 2.3: Schéma radioprotekce vyvolané amifostinem. Amifostin se vlivem membránových alkalických fosfatas, které nejsou přítomné u karcinogenních buněk, mění na svůj radioprotektivní metabolit WR-1065, který chrání DNA zdravých buněk před toxickými účinky radioterapie a chemoterapie. Převzato a upraveno podle cit. ¹⁷² v BioRenderu.

2.4.3 Syntetická radioprotektiva neobsahující thiolovou skupinu

Stabilní nitroxidové radikály o nízké molekulové hmotnosti vykazují radioprotektivní účinky. Preklinické studie *in vitro*¹⁷³ a *in vivo*¹⁷⁴ ukazují, že oxidovaná forma nitroxidů chrání buňky před IZ. Redukovaný metabolit nitroxidů, hydroxylamin, může působit jako antioxidant, ale nechrání buňky od poškození radiací¹⁷³. Hlavním zástupcem této skupiny je Tempol, se systematickým názvem 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (cit. ¹⁷⁵). V preklinických studiích na morčatech, kdy byl Tempol podáván lokálně, bylo prokázáno, že zabraňuje alopecii způsobené radioterapií¹⁷⁶. Při první fázi klinických testů na pacientech, kteří podstoupili ozařování mozku, bylo potvrzeno, že Tempol může zabraňovat alopecii u lidí se zanedbatelnými vedlejšími účinky¹⁷⁷. Následná preklinická studie potvrdila, že Tempol chrání slinné žlázy od škodlivých účinků IZ a nechrání tumorové buňky. Bylo vypořádováno, že intracelulární redukce Tempolu na jeho neradioprotektivní hydroxylamin probíhá dvakrát rychleji v nádorových buňkách¹⁷⁸.

Bisbenzimidazoly jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, které nasedají na malý žlábek DNA a vykazují radioprotektivní účinky¹⁷⁹. DNA ligandy odvozené od bisbenzimidazolů jako H-342 nebo H-258 snižují tvorbu mikrojader vyvolanou IZ¹⁸⁰. Mikrojádra se většinou nachází u rakovinových buněk a vznikají z chromozomálních fragmentů, které nejsou začleněny do jádra dceřiných buněk při buněčném dělení. Martin a kol. ve své práci z roku 2004 připravili a otestovali nový analog H-343 (methylproamin), který má až 100x vyšší potenciál než aktivní metabolit amifostinu WR-1065 (cit. ¹⁸¹).

3 Cíl práce

Cílem práce bylo připravit sérii aromatických derivátů obsahujících 1-(2-hydroxyethyl)piperazin.

- 1) Syntéza prekurzorů na bázi 1-brom-3-fenoxypropan-2-olu substituovaných na aromatickém kruhu alkoxylovými skupinami, nitro skupinami nebo halogeny, případně jejich kombinací.
- 2) Syntéza 1-(R-fenoxy)-3-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)propan-2-olů z příslušných prekurzorů připojením 1-(2-hydroxyethyl)piperazinové skupiny a převedení látek na rozpustnější hydrochloridové soli.
- 3) Osvojit si metodiku přípravy látek a purifikačních procesů, naučit se interpretovat spektrální analýzy látek.

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie pro organickou syntézu

- 1-(2-hydroxyethyl)piperazin 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,3-dinitrofenol min. 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,4,5-trichlorfenol 95 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,5-dinitrofenol 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-fluor-4-nitrofenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-chlor-4-fluorfenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-methoxy-4-nitroanilin 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-methoxy-5-nitrofenol 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3,4,5-trifluorfenol min. 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3,4-dichlorfenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3,4-dimethoxyfenol 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3,4-dinitrofenol min. 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3-fluor-4-nitrofenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3-chlorfenol 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 3-methoxyfenol 96 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-(4-fluorfenoxy)fenol 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-ethoxyfenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-fluorfenol 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-chlor-3-nitrofenol 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-methoxy-2-nitrofenol 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-methoxyfenol min. 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- 4-nitroguaiacol 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Amoniak vodný roztok 25-29% p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Anilin min. 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dimethylformamid p.a. (VWR International)

- Epibromhydrin 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol absolutní p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Ethylacetát p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Heptan p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Hydroxid sodný, perličky, p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Chloroform p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Jodid draselný, p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Methanol p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Piperidin p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)
- Silikagel 60 (Merck, Německo)
- Toluén bezvodý p.a. (VWR International, Spojené státy americké)
- Uhličitan draselný p.a. (Penta Chemicals, Česká republika)
- Uhličitan sodný p.a. (VWR International, Spojené státy americké)

4.1.2 Instrumentální vybavení

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Brand, Německo)
- Bodotávek (Intaco Micro spol. s.r.o., Česká republika)
- Magnetická míchačka s topením AREA (Velp Scientifica, Česká republika)
- Váhy elektrické předvažovací (Denver Instrument, Spojené státy americké)
- Rotační vakuová odparka (Heidolph, Německo)
- Silica Gel Aluminium Plate 60 F₂₅₄ (Merck, Německo)

4.1.3 Analýza produktů

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Struktura látek byla potvrzena pomocí ¹H NMR a ¹³C NMR na přístroji Varian VNMR S500, od firmy Varian Comp. (Palo Alto, USA). Pracovní frekvence byla 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C. Chemický posun (δ) je v jednotkách „parts per million“, ppm, a je vztažen k tetramethylsilanu, který se používá jako interní standard. Analýza byla

provedena pracovníky Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Výsledky byly interpretovány v programu MestreNova (Mestrelab Research, verze 12.0.0-20080).

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Látky byly potvrzeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s hmotnostním spektrometrem (MS). HPLC systém použitý pro měření byl Dionex Ultimate 3000 UHPLC: RS pumpa, RS kolonový kompartment, RS autosampler, detektor diodového pole řízený softwarem Chromeleon 6.80. Hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus Orbitrap byl propojen pomocí HESI (z angl. Heated Electrospray Ionization) zdroje a byl ovládán softwarem Thermo Xcalibur 3.1.66.10. Analýzu provedl PharmDr. Lukáš Prchal, Ph.D. z Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pro výpočet m/z jednotlivých látek byl použit software ChemDraw Ultra 12.0.2 (CD). Pro získání hodnot logaritmu rozdělovacího koeficientu (P) byl použit software CD Ultra 12.0.2. a software Marvin verze 14.9.8.0 (Ma).

4.2 Obecný postup syntéz

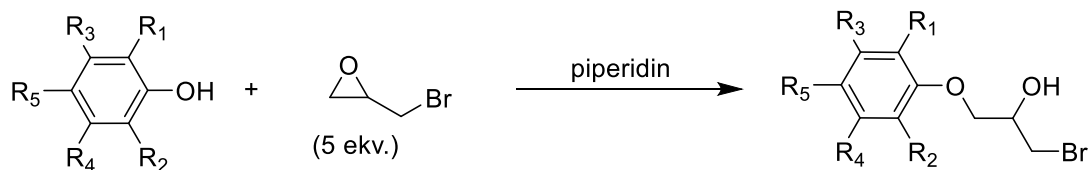
Obecný postup 1 (OP1) – první krok syntézy

Tento postup byl modifikován dle publikace Marek a kol. z roku 2020 (cit. ¹⁴⁵). Epibromhydrin (5 ekv.) byl zahřát na teplotu refluxu, tzn. 135 °C. (viz Tab. 4.1). Následně byl přidán odpovídající substituovaný fenol (1 ekv.) (viz Tab. 4.1) a jako katalyzátor byla přidána jedna kapka piperidinu. Reakce probíhala za stálého míchání po dobu tří hodin. Pro monitorování reakce byla použita silikagelová tenkovrstvá chromatografie (TLC), mobilní fáze byla vybírána pro každou reakci zvlášť a je uvedena u konkrétních reakcí. Po zchladnutí byla reakční směs čištěna pomocí sloupcové chromatografie (50 cm). Jako stacionární fáze byl zvolen silikagel 60. Mobilní fáze byla zvolena na základě TLC detekce (viz Kap. 4.2.1-19). Vybrané frakce byly odpařeny do konstantní hmotnosti. Struktura látek byla potvrzena pomocí MS analýzy.

Tab. 4.1: Přehled označení látek a jejich substituenty v konkrétních lokantech

Látky	-R1	-R2	-R3	-R4	-R5
1a	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃
2a	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
3a	-H	-H	-H	-H	-OCH ₂ CH ₃
4a	-OCH ₃	-H	-H	-H	-NO ₂
5a	-H	-H	-Cl	-H	-H
6a	-H	-H	-Cl	-H	-Cl
7a	-Cl	-H	-H	-Cl	-Cl
8a	-H	-H	-H	-H	-F
9a	-Cl	-H	-H	-H	-F
10a	-H	-H	-F	-F	-F
11a	-H	-H	-H	-H	-(4-fluorfenoxy)
12a	-F	-H	-H	-H	-NO ₂
13a	-H	-H	-F	-H	-NO ₂
14a	-NO ₂	-H	-NO ₂	-H	-H
15a	-NO ₂	-H	-H	-NO ₂	-H
16a	-H	-H	-NO ₂	-H	-Cl
17a	-NO ₂	-H	-H	-H	-CH ₃
18a	-H	-H	-NO ₂	-H	-NO ₂
19a	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H

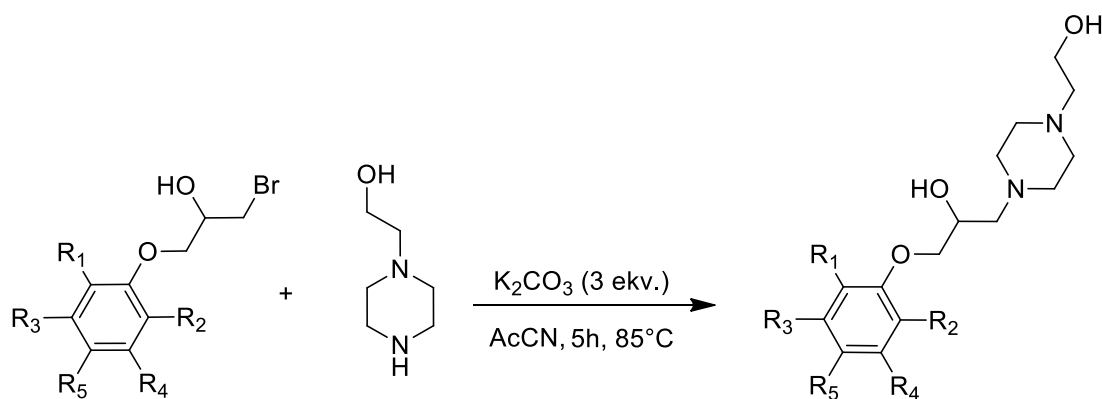
Obecné reakční schéma OP1:



Obecný postup 2 (OP2) – druhý krok syntézy

Tento postup byl modifikován dle publikace Filipova a kol. z roku 2020 a dle publikace Marek a kol. z roku 2020 (cit. ^{144,145}). K 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (1,5 ekv.) v 30 ml acetonitrilu byl přidán příslušný prekurzor (1 ekv.) z prvního kroku spolu s uhlíčitanem draselným (3 ekv.). Reakce byla míchána po dobu 5 hodin za refluxu (85 °C). Po zchladnutí byla směs přefiltrována na fritě s velikostí pórů S4. Směs byla poté odpařena do konstantní hmotnosti. Následně byla provedena sloupcová chromatografie se silikagelem 60 jako stacionární fází. Mobilní fáze byla zvolena na základě analýzy TLC pro každou reakci zvlášť a je uvedena u každé látky (viz Kap. 4.2.1-19). Vhodné frakce byly odpařeny do konstantní hmotnosti. Struktura látek byla potvrzena pomocí MS analýzy a pomocí NMR analýzy.

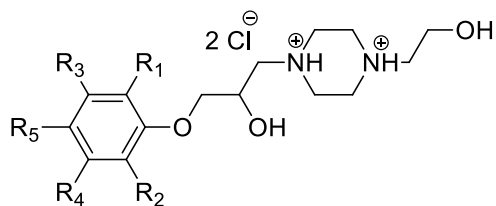
Obecné reakční schéma OP2:



Obecný postup 3 (OP3) – převod produktu na hydrochloridovou sůl

Vysušená látka byla rozpuštěna v 10 ml methanolu. Následně byla přidána jedna kapka 35% kyseliny chlorovodíkové. Směs byla míchána po dobu 24 hodin za pokojové teploty. Poté byla směs odpařena. Byly přidány 4 ml absolutního ethanolu a směs znovu odpařena. Tento proces byl zopakován dvakrát. Baňka s produktem byla následně umístěna

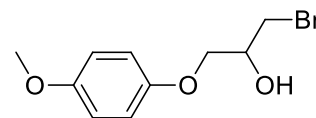
pod vakuem a obsah byl vysušen do konstantní hmotnosti. Obecný vzorec je vidět na Obr. 4.1.



Obr. 4.1: Obecný vzorec hydrochloridové soli substituovaných derivátů 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu

4.2.1 Příprava 1-(4-methoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (**1b**)

Pro získání látky **1a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (5,55 g, 39,9 mmol) a z 4-methoxyfenolu (1,00 g, 8,06 mmol) bylo získáno 1,30 g produktu (výtěžek 62 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

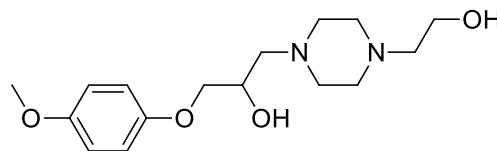


Obr. 4.2: **1a**

HRMS: m/z 261,0122 [M^+] změřeno

m/z 261,0121 vypočteno pro [$C_{10}H_{14}BrO_3^+$]

Látka **1b** byla získána pomocí OP2. Z látky **1a** (1,30 g, 4,98 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,969 g, 7,44 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (2,07 g, 14,94 mmol) bylo získáno 1,06 g produktu (výtěžek 69 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **1b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je bílý olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.3: **1b**

HRMS: m/z 311,1962 [M^+] změřeno

m/z 311,1965 vypočteno pro [$C_{16}H_{27}N_2O_4^+$]

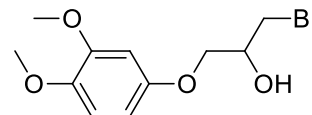
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 6.91 – 6.80 (m, 4H), 4.15 – 4.07 (m, 1H), 3.93 (dd, $J = 9.8, 4.4$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J = 9.8, 5.7$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.88 – 2.58 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 154.15, 153.03, 115.21, 114.28, 71.07, 66.80, 60.32, 59.35, 57.60, 54.71, 52.40, 52.25.

Celková výtěžnost látky **1b** byla 42 %.

4.2.2 Příprava 1-(3,4-dimethoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (**2b**)

Pro získání látky **2a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,44 g, 32,4 mmol) a z 3,4-dimethoxyfenolu (1,00 g, 6,49 mmol) bylo získáno 1,79 g produktu (výtěžek 95 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.



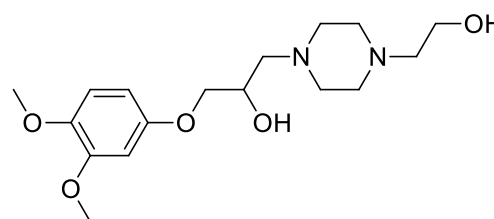
Obr. 4.4: **2a**

HRMS: m/z 291,0195 [M^+] změřeno

m/z 291,0226 vypočteno pro [$C_{11}H_{16}BrO_4^+$]

Látka **2b** byla získána pomocí OP2. Z látky **2a** (1,79 g, 6,15 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (1,20 g, 9,22 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (2,55 g, 18,45 mmol) bylo získáno 0,966 g produktu (výtěžek 46 %).

Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **2b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je hnědý olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.5: **2b**

HRMS: m/z 341,2069 [M^+] změřeno

m/z 341,2071 vypočteno pro [$C_{17}H_{29}N_2O_5^+$]

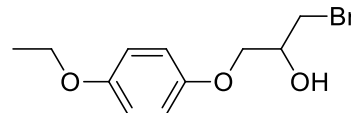
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 1H), 3.94 (dd, $J = 9.8, 4.3$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 9.8, 5.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.78 – 2.37 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153.91, 150.11, 143.61, 112.89, 104.36, 100.94, 71.10, 66.98, 60.75, 59.84, 58.34, 55.90, 55.00, 52.96, 52.91.

Celková výtěžnost látky **2b** byla 44 %.

4.2.3 Příprava 1-(4-ethoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (3b)

Pro získání látky **3a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,96 g, 36,2 mmol) a z 4-ethoxyfenolu (1,00 g, 7,24 mmol) bylo získáno 0,696 g produktu (výtěžek 35 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.



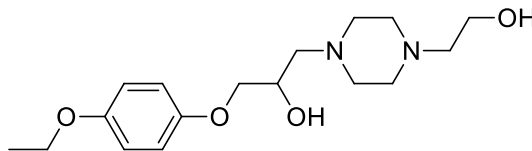
Obr. 4.6: 3a

HRMS: m/z 275,0281 [M^+] změřeno

m/z 275,0277 vypočteno pro [$C_{11}H_{16}BrO_3^+$]

Látka **3b** byla získána pomocí OP2. Z látky **3a** (0,696 g, 2,53 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,494 g, 3,79 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,05 g, 7,59 mmol) bylo získáno 0,669 g produktu (výtěžek 81 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2).

Finální produkt je hnědý olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.7: 3b

HRMS: m/z 325,2119 [M^+] změřeno

m/z 325,2122 vypočteno pro [$C_{17}H_{29}N_2O_4^+$]

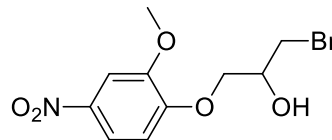
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 6.89 – 6.78 (m, 4H), 4.08 (ddt, $J = 7.7, 5.8, 4.5$ Hz, 1H), 4.00 – 3.83 (m, 4H), 3.69 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.82 – 2.48 (m, 12H), 1.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153.34, 153.06, 115.19, 115.07, 71.19, 66.98, 63.63, 60.69, 59.76, 58.22, 52.84, 52.82, 13.88.

Celková výtěžnost látky **3b** byla 28 %.

4.2.4 Příprava 1-(2-methoxy-4-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (4b)

Pro získání látky **4a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,05 g, 29,6 mmol) a z 4-nitroguaiacolu (1,00 g, 5,91 mmol) bylo získáno 1,11 g produktu (výtěžek 61 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

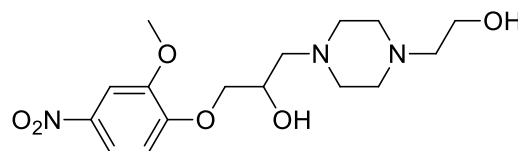


Obr. 4.8: 4a

HRMS: m/z 305,9807 [M^+] změřeno

m/z 305,9972 vypočteno pro [$C_{10}H_{13}BrNO_5^+$]

Látka **4b** byla získána pomocí OP2. Z látky **4a** (1,11 g, 3,63 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,609 g, 4,68 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,51 g, 10,89 mmol) bylo získáno 1,06 g produktu (výtěžek 82 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **4b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je hnědý olej o čistotě >95 %.



Obr. 4.9: 4b

Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.

HRMS: m/z 356,1809 [M^+] změřeno

m/z 356,1816 vypočteno pro [$C_{16}H_{26}N_3O_6^+$]

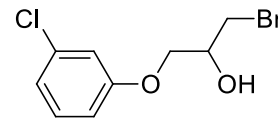
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.88 (td, $J = 8.9, 2.7$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.21 – 4.17 (m, 1H), 4.17 – 4.04 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.70 (dt, $J = 14.2, 5.9$ Hz, 2H), 2.91 – 2.40 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 154.11, 149.24, 141.49, 117.25, 111.45, 106.42, 71.92, 66.69, 60.24, 59.56, 57.88, 55.40, 52.70, 52.55.

Celková výtěžnost látky **4b** byla 50 %.

4.2.5 Příprava 1-(3-chlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (5b)

Pro získání látky **5a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (5,33 g, 38,9 mmol) a z 3-chlorfenolu (1,00 g, 7,78 mmol) bylo získáno 0,872 g produktu (výtěžek 42 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

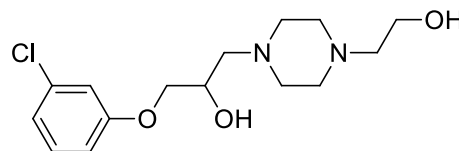


Obr. 4.10: **5a**

HRMS: m/z 264,9631 [M^+] změřeno

m/z 264,9625 vypočteno pro [$C_9H_{11}BrClO_2^+$]

Pro získání látky **5b** byl použit OP2. Z látky **5a** (0,872 g, 3,28 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,642 g, 4,93 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,36 g, 9,84 mmol) bylo získáno 0,918 g směsi vedlejších produktů a výchozích látek. Analýza MS prokázala přítomnost látky **5b** ve směsi, o 80% čistotě. Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2).



Obr. 4.11: **5b**

HRMS: m/z 315,1476 [M^+] změřeno

m/z 315,1470 vypočteno pro [$C_{15}H_{24}ClN_2O_3^+$]

Byla provedena druhá sloupcová chromatografie se stejnou mobilní fází za účelem zvýšení čistoty produktu. MS analýza nepotvrdila přítomnost látky v analyzovaných frakcích. Látku se nepodařilo izolovat.

Reakce pro získání látky **5b** byla provedena znovu. Dle OP2 byla nasazena **5a** (0,500 g, 1,88 mmol) s 1-(2-hydroxyethyl)piperazinem (0,368 g, 2,83 mmol) a K_2CO_3 (0,780 g, 5,64 mmol). Stejně množství látek bylo nasazeno dle modifikovaného OP2, kdy teplota reakční směsi byla 50 °C. MS analýza neprokázala žádný rozdíl mezi jednotlivými experimenty a reakční směsi byly spojeny. Pro přečištění směsi byla použita sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak

(6:2:0,2). Bylo získáno 1,10 g produktu (výťažek 92 %). Látka **5b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je žlutý olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.

HRMS: m/z 315,1476 [M⁺] změřeno

m/z 315,1470 vypočteno pro [C₁₅H₂₄ClN₂O₃⁺]

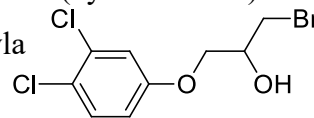
NMR: ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 4.17 – 4.10 (m, 1H), 4.02 (dd, *J* = 9.8, 4.0 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 9.8, 5.8 Hz, 1H), 3.75 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.60 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.08 – 2.60 (m, 12H).

¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.30, 132.30, 130.45, 123.48, 117.00, 113.27, 71.03, 66.55, 59.90, 58.98, 56.14, 52.25, 51.85.

Celková výťažnost látky **5b** byla 39 %.

4.2.6 Příprava 1-(3,4-dichlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (6b)

Pro získání látky **6a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,19 g, 30,1 mmol) a z 3,4-dichlorfenolu (1,00 g, 6,13 mmol) bylo získáno 1,14 g produktu (výtěžek 62 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

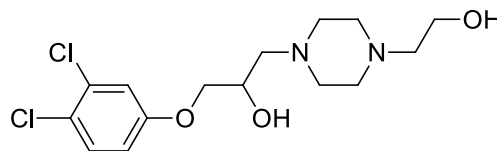


Obr. 4.12: 6a

HRMS: m/z 296,9081 [M^+] změřeno

m/z 296,9090 vypočteno pro [$C_9H_8BrCl_2O_2^-$]

Látka **6b** byla získána pomocí OP2. Z látky **6a** (1,14 g, 3,80 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,749 g, 5,75 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,58 g, 11,4 mmol) bylo získáno 1,13 g produktu (výtěžek 85 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **6b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je růžový olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.13: 6b

HRMS: m/z 349,1079 [M^+] změřeno

m/z 349,1080 vypočteno pro [$C_{15}H_{23}Cl_2N_2O_3^+$]

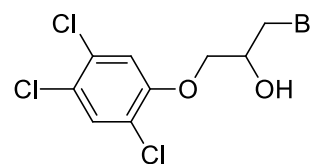
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 6.91 (dd, $J = 8.9, 2.9$ Hz, 1H), 4.17 – 4.09 (m, 1H), 4.02 (dd, $J = 9.8, 4.0$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 9.8, 5.8$ Hz, 1H), 3.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.60 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.07 – 2.56 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.29, 132.32, 130.55, 123.53, 116.24, 114.67, 71.03, 66.54, 59.87, 59.10, 57.14, 52.25, 51.84.

Celková výtěžnost látky **6b** byla 53 %.

4.2.7 Příprava 1-(2,4,5-trichlorfenoxy)3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (7b)

Pro získání látky **7a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (3,47 g, 39,9 mmol) a z 2,4,5-trichlorfenolu (1,00 g, 5,06 mmol) bylo získáno 1,00 g produktu (výtěžek 59 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

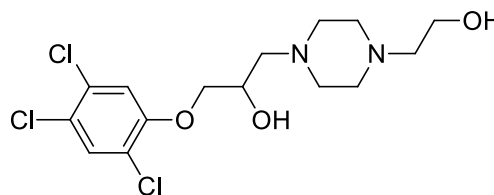


Obr. 4.14: 7a

HRMS: m/z 330,8691 [M^+] změřeno

m/z 330,8700 vypočteno pro [$C_9H_9BrCl_3O_2$]

Látka **7b** byla získána pomocí OP2. Z látky **7a** (1,00 g, 2,99 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,585 g, 4,49 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,24 g, 8,97 mmol) bylo získáno 1,02 g produktu (výtěžek 89 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **7b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je růžový olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.15: 7b

HRMS: m/z 383,0689 [M^+] změřeno

m/z 383,0691 vypočteno pro [$C_{15}H_{22}Cl_3N_2O_3$]

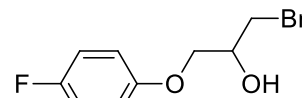
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.56 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 4.21 – 4.14 (m, 1H), 4.14 – 4.03 (m, 2H), 3.80 – 3.74 (m, 2H), 2.97 (s, 4H), 2.87 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.84 – 2.81 (m, 4H), 2.75 (dd, $J = 13.0, 4.9$ Hz, 1H), 2.72 – 2.64 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153.80, 130.98, 130.47, 123.74, 121.97, 115.17, 71.94, 66.51, 59.76, 58.93, 56.94, 56.82, 52.18, 51.59.

Celková výtěžnost látky **7b** byla 53 %.

4.2.8 Příprava 1-(4-fluorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (**8b**)

Pro získání látky **8a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (6,11 g, 44,0 mmol) a z 4-fluorfenolu (1,00 g, 8,92 mmol) bylo získáno 0,713 g produktu (výtěžek 32 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

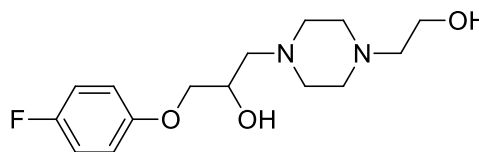


Obr. 4.16: **8a**

HRMS: m/z 248,9921 [M^+] změřeno

m/z 248,9921 vypočteno pro [$C_9H_{11}BrFO_2^+$]

Látka **8b** byla získána pomocí OP2. Z látky **8a** (0,713 g, 2,86 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,559 g, 4,29 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,19 g, 8,58 mmol) bylo získáno 0,686 g produktu (výtěžek 80 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **8b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je červený olej o čistotě >95 %.



Obr. 4.17: **8b**

Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.

HRMS: m/z 299,1771 [M^+] změřeno

m/z 299,1765 vypočteno pro [$C_{15}H_{24}FN_2O_3^+$]

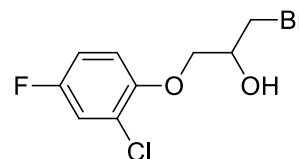
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.04 – 6.96 (m, 2H), 6.96 – 6.89 (m, 2H), 4.13 (ddt, $J = 7.8, 5.7, 4.4$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J = 9.7, 4.3$ Hz, 1H), 3.92 (dd, $J = 9.7, 5.7$ Hz, 1H), 3.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.88 (s, 4H), 2.80 (q, $J = 5.7, 4.9$ Hz, 6H), 2.75 – 2.61 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.32, 156.44, 115.46, 115.39, 115.38, 115.19, 71.00, 66.66, 60.05, 59.13, 57.22, 52.22, 51.91.

Celková výtěžnost látky **8b** byla 26 %.

4.2.9 Příprava 1-(4-fluor-2-chlorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (9b)

Pro získání látky **9a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,67 g, 34,1 mmol) a z 4-fluor-2-chlorfenolu (1,00 g, 6,82 mmol) bylo získáno 1,00 g produktu (výtěžek 52 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

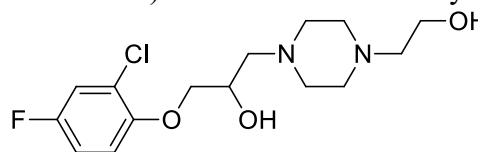


Obr. 4.18: **9a**

HRMS: m/z 282,9577 [M^+] změřeno

m/z 282,9587 vypočteno pro [$C_9H_7BrF_3O_2^-$]

Látka **9b** byla získána pomocí OP2. Z látky **9a** (1,00 g, 3,53 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,695 g, 5,34 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,46 g, 10,59 mmol) bylo získáno 0,564 g produktu (výtěžek 48 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **9b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je červený olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.19: **10b**

HRMS: m/z 331,1232 [M^+] změřeno

m/z 331,1230 vypočteno pro [$C_9H_7BrF_3O_2^-$]

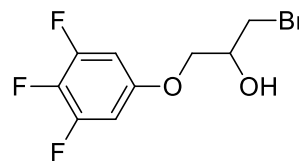
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.19 (dd, $J = 8.2, 3.0$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 9.1, 4.9$ Hz, 1H), 7.06 – 6.98 (m, 1H), 4.19 – 4.11 (m, 1H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.92 – 2.55 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 174.99, 157.60, 155.69, 151.16, 123.26, 116.92, 114.74, 113.94, 72.13, 66.77, 60.36, 59.49, 57.76, 56.93, 52.61.

Celková výtěžnost látky **9b** byla 25 %.

4.2.10 Příprava 1-(3,4,5-trifluorfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (10b)

Pro získání látky **10a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,63 g, 33,8 mmol) a z 3,4,5-trifluorfenolu (1,00 g, 6,75 mmol) bylo získáno 0,678 g produktu (výtěžek 35 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

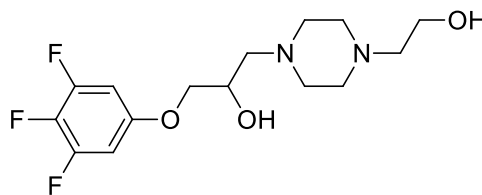


Obr. 4.20: 10a

HRMS: m/z 282,9577 [M^+] změřeno

m/z 282,9587 vypočteno pro [$C_9H_7BrF_3O_2^-$]

Látka **10b** byla získána pomocí OP2. Z látky **10a** (0,678 g, 2,38 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,466 g, 3,58 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,00 g, 7,24 mmol) bylo získáno 0,611 g produktu (výtěžek 77 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Látka **10b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je červený olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.21: 10b

HRMS: m/z 335,1575 [M^+] změřeno

m/z 335,1577 vypočteno pro [$C_{15}H_{22}F_3N_2O_3^+$]

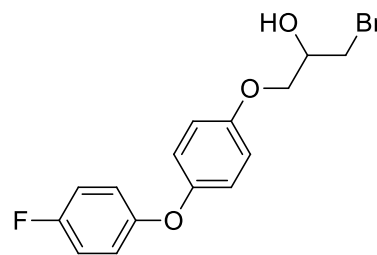
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 6.80 – 6.70 (m, 2H), 4.14 – 4.06 (m, 1H), 4.03 – 3.97 (m, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 1H), 3.73 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.90 – 2.54 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 174.99, 154.79, 152.36, 150.31, 135.34, 133.42, 99.06, 71.53, 66.54, 59.98, 59.33, 57.48, 56.93, 52.49, 52.17.

Celková výtěžnost látky **10b** byla 27 %.

4.2.11 Příprava 1-[4-(4-fluorfenoxy)fenoxy]-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (11b)

Pro získání látky **11a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (3,35 g, 24,5 mmol) a z 4-(4-fluorfenoxy)fenolu (1,00 g, 4,90 mmol) bylo získáno 1,18 g produktu (výtěžek 74 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (3:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

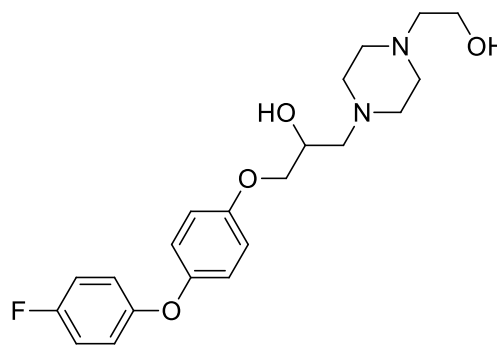


Obr. 4.22: 11a

HRMS: m/z 339,0039 [M^+] změřeno

m/z 339,0039 vypočteno pro [$C_{15}H_{13}BrFO_3$]

Látka **11b** byla získána pomocí OP2. Spojením látky **11a** (1,18 g, 3,63 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,709 g, 5,45 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,51 g, 10,89 mmol) bylo získáno 0,633 g produktu (výtěžek 47 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2). Látka **11b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je růžový olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.23: 11b

HRMS: m/z 391,2022 [M^+] změřeno

m/z 391,2028 vypočteno pro [$C_{21}H_{28}FN_2O_4^+$]

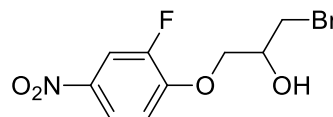
NMR: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.22 – 7.14 (m, 2H), 6.99 – 6.94 (m, 6H), 3.98 – 3.91 (m, 2H), 3.88 – 3.81 (m, 1H), 3.51 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.53– 2.35 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172.50, 155.53, 150.35, 120.69, 119.68, 119.61, 116.92, 116.74, 116.26, 71.92, 66.89, 61.25, 53.37.

Celková výtěžnost látky **11b** byla 35 %.

4.1.12 Příprava 1-(2-fluor-4-nitrofenoxy)3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (12b)

Pro získání látky **12a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,42 g, 31,8 mmol) a z 2-fluor-4-nitrofenolu (1,00 g, 6,37 mmol) bylo získáno 1,20 g produktu (výtěžek 63 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.



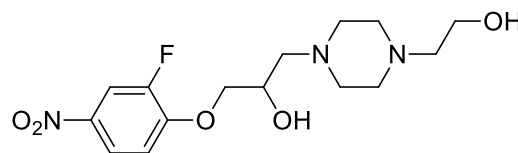
Obr. 4.24: 12a

HRMS: m/z 291,9618 [M^+] změřeno

m/z 291,9626 vypočteno pro [$C_9H_8BrFNO_4$]

Látka **12b** byla získána pomocí OP2. Z látky **12a** (0,590 g, 2,01 mmol) a z 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,393 g, 3,02 mmol) za pomoci K_2CO_3 (0,83 g, 6,03 mmol) byla získána reakční směs. Stejně množství výchozích látek bylo zpracováno podle modifikovaného OP2, kdy reakční směs byla míchána při 50 °C. MS analýza obou reakčních směsí prokázala totožnou identitu. Reakční směsi byly spojeny a dále zpracovávány společně. Po dvojitým přečištění sloupcovou chromatografií bylo získáno 0,960 g produktu (výtěžek 70 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2).

Látka **12b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je oranžový olej o čistotě >95 %.



Obr. 4.25: 12b

Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.

HRMS: m/z 344,1591 [M^+] změřeno

m/z 344,1616 vypočteno pro [$C_{15}H_{23}FN_3O_5^+$]

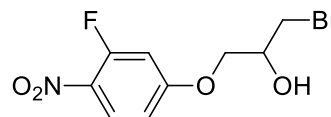
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 8.49 (s, 1H), 8.17 (dd, $J = 8.3, 3.0$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 9.1, 4.9$ Hz, 1H), 4.17 – 4.10 (m, 1H), 4.06 – 3.98 (m, 2H), 3.70 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.94 – 2.54 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 157.50, 155.69, 152.14, 124.45, 121.25, 116.91, 83.15, 81.16, 72.13, 66.76, 60.35, 58.98, 57.75, 56.93, 52.60.

Celková výtěžnost látky **12b** byla 44 %.

4.1.13 Příprava 1-(3-fluor-4-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (13b)

Pro získání látky **13a** byl použit OP1. Spojením epibromhydrinu (4,42 g, 31,8 mmol) a 3-fluor-4-nitrofenolu (1,00 g, 6,37 mmol) bylo získáno 1,02 g produktu (výtěžek 55 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

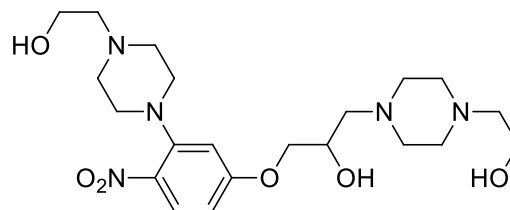


Obr. 4.26: 13a

HRMS: m/z 291,9618 [M^+] změřeno

m/z 291,9626 vypočteno pro [$C_9H_8BrFNO_4^-$]

Pro získání látky **13b** byl použit OP2. Z látky **13a** (1,02 g, 3,47 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,679 g, 5,22 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,44 g, 10,41 mmol) bylo získáno 0,795 g produktu (výtěžek 34 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). MS analýza nepotvrdila identitu látky. Byla získána látka **13c**, jejíž struktura byla potvrzena MS analýzou. Látka **13c** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je oranžový olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.27: 13c

HRMS (13c): m/z 455,2660 [M^+] změřeno

m/z 455,2733 vypočteno pro [$C_{21}H_{37}N_5O_6^{2+}$]

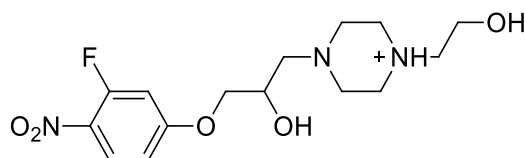
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.94 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.72 – 6.67 (m, 1H), 4.21 – 4.10 (m, 2H), 4.09 – 4.02 (m, 1H), 3.81 – 3.74 (m, 4H), 3.19 – 3.13 (m, 4H), 3.01 – 2.97 (m, 4H), 2.92 – 2.87 (m, 6H), 2.87 – 2.83 (m, 4H), 2.81 – 2.76 (m, 2H), 2.76 – 2.65 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 163.48, 148.38, 136.24, 128.52, 107.66, 106.28, 70.93, 66.48, 59.71, 59.52, 58.90, 57.64, 56.80, 52.88, 52.10, 51.53, 50.45.

Celková výtěžnost látky **13c** byla 19 %.

Pro získání látky **13b** byl 1-(2-hydroxyethylpiperazin) (0,149 g, 1,14 mmol) rozpuštěn v 20 ml acetonitrilu spolu s K_2CO_3 (0,320 g, 2,31 mmol). Následně byla pomalu přikapána látka **13a** (0,224 g, 0,76 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs zfiltrována pomocí frity o velikosti pórů S4 a odpařena. Směs byla separována pomocí sloupcové chromatografie se silikagelovou stacionární fází. Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2), která byla použita i pro monitorování reakce pomocí TLC. Pomocí MS analýzy byly potvrzeno, že v přečištěném produktu je převážně látka **13c** a 9 % látky **13b**. Látky se nepodařilo oddělit.

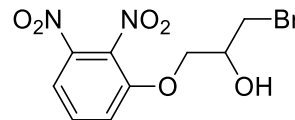
HRMS (13 b): m/z 344,1613 $[M^+]$ změřeno
 m/z 344,1616 vypočteno pro $[C_9H_8BrFNO_4^-]$



Obr. 4.28: **13b**

4.1.14 Příprava 1-(2,3-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (14b)

Pro získání látky **14a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (3,72 g, 27,2 mmol) a z 2,3-dinitrofenolu (1,00 g, 5,43 mmol) bylo získáno 0,612 g produktu (výtěžek 35 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

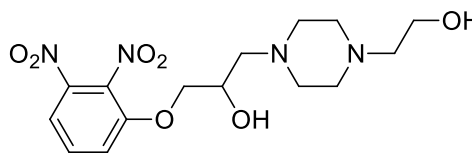


Obr. 4.29: 14a

HRMS: m/z 318,9569 [M⁺] změřeno

m/z 318,9571 vypočteno pro [C₉H₈BrN₂O₆]⁻

Pro získání látky **14b** byl použit OP2. Z látky **14a** (0,612 g, 1,91 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,372 g, 2,84 mmol) za přítomnosti K₂CO₃ (0,79 g, 5,73 mmol) bylo získáno 3,04 g směsi vedlejších produktů a výchozích látek. Ve směsi se nacházela i látka **14b** o 1% čistotě. Jako mobilní fáze byla použita směs



Obr. 4.30: 14b

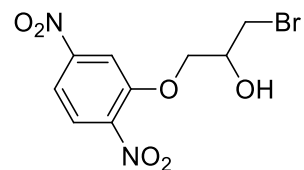
ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2). Látku se nepodařilo izolovat.

HRMS: m/z 371,1552 [M⁺] změřeno

m/z 371,1561 vypočteno pro [C₁₅H₂₃N₄O₇]⁺

4.1.15 Příprava 1-(2,5-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (15b)

Pro získání látky **15a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (3,72 g, 27,2 mmol) a z 2,5-dinitrofenolu (1,00 g, 5,43 mmol) bylo získáno 1,40 g produktu (výtěžek 80 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

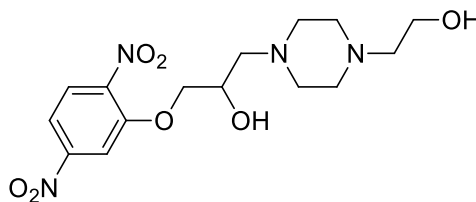


Obr. 4.31: 15a

HRMS: m/z 318,9570 [M⁺] změřeno

m/z 318,9571 vypočteno pro [C₉H₈BrN₂O₆]

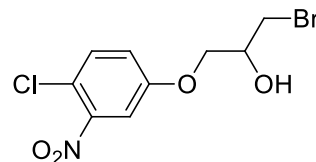
Pro získání látky **15b** byl použit OP2. Z látky **15a** (1,40 g, 4,36 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,851 g, 6,54 mmol) za přítomnosti K₂CO₃ (1,81 g, 13,08 mmol) bylo získáno 0,288 g směsi vedlejších produktů a výchozích látek. Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (6:2:0,2). Identita látky nebyla potvrzena MS.



Obr. 4.32: 15b

4.1.16 Příprava 1-(4-chlor-3-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-propan-2-ol (16b)

Pro získání látky **16a** byl použit OP1. Spojením epibromhydrinu (3,95 g, 28,8 mmol) a z 4-chlor-3-nitrofenolu (1,00 g, 5,76 mmol) bylo získáno 0,994 g produktu (výtěžek 56 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

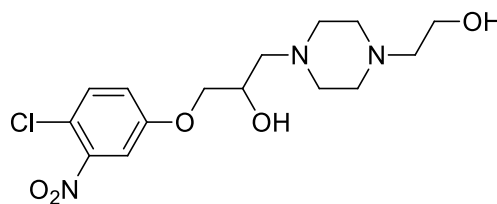


Obr. 4.33: 16a

HRMS: m/z 307,9334 [M^+] změřeno

m/z 307,9331 vypočteno pro [$C_9H_8BrClNO_4^-$]

Látka **16b** byla získána pomocí OP2. Z látky **16a** (0,994 g, 3,20 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,625 g, 4,84 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,33 g, 9,60 mmol) bylo získáno 0,878 g produktu (výtěžek 76 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2). Látka **16b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je oranžový olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.34: 16b

HRMS: m/z 360,1317 [M^+] změřeno

m/z 360,1321 vypočteno pro [$C_{15}H_{23}ClN_3O_5^+$]

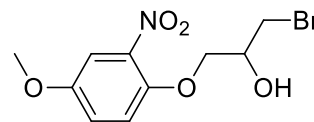
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.23 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H), 4.17 – 4.07 (m, 2H), 4.05 – 3.97 (m, 1H), 3.70 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.74 – 2.50 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.20, 148.62, 131.97, 119.85, 116.89, 110.89, 71.61, 66.63, 60.20, 59.62, 57.97, 56.93, 52.76, 52.64.

Celková výtěžnost látky **16b** byla 43 %.

4.1.17 Příprava 1-(4-methoxy-2-nitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (17b)

Pro získání látky **17a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (4,05 g, 29,6 mmol) a z 4-methoxy-2-nitrofenolu (1,00 g, 5,91 mmol) bylo získáno 0,670 g produktu (výťažek 37 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

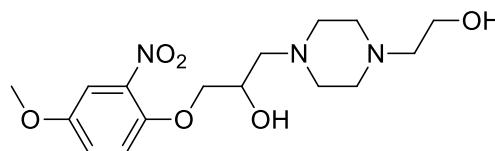


Obr. 4.35: 17a

HRMS: m/z 303,9828 [M^+] změřeno

m/z 303,9826 vypočteno pro [$C_{10}H_{11}BrNO_5^-$]

Látka **17b** byla získána pomocí OP2. Z látky **17a** (0,670 g, 2,18 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,427 g, 3,28 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (0,90 g, 6,54 mmol) bylo získáno 0,600 g produktu (výťažek 77 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2). Látka **17b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je tmavě hnědý olej o čistotě >95 %.



Obr. 4.36: 17b

Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.

HRMS: m/z 356,1811 [M^+] změřeno

m/z 356,1816 vypočteno pro [$C_{16}H_{26}N_3O_6^+$]

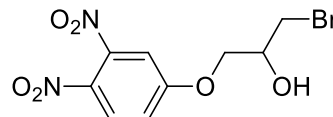
NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.39 – 7.31 (m, 1H), 7.24 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.21 – 7.13 (m, 1H), 4.16 – 4.09 (m, 1H), 4.11 – 4.04 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.74 – 3.65 (m, 2H), 2.89 – 2.45 (m, 12H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153.47, 145.92, 140.34, 119.94, 116.88, 109.39, 72.61, 66.70, 60.17, 59.50, 57.77, 55.17, 52.60, 52.44.

Celková výťažnost látky **17b** byla 29 %.

4.1.18 Příprava 1-(3,4-dinitrofenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (18b)

Pro získání látky **18a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu (3,72 g, 27,2 mmol) a z 3,4-dinitrofenolu (1,00 g, 5,43 mmol) bylo získáno 0,823 g produktu (výtěžek 47 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (1:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.

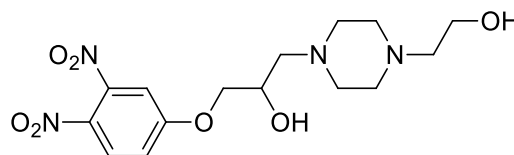


Obr. 4.37: 18a

HRMS: m/z 318,9566 [M⁺] změřeno

m/z 318,9571 vypočteno pro [C₉H₈BrN₂O₆]⁻

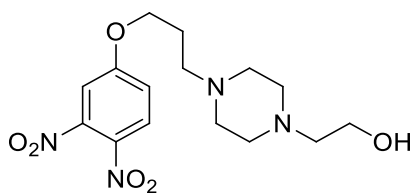
Pro získání látky **18b** byl použit OP2. Z látky **18a** (0,823 g, 2,56 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,501 g, 3,85 mmol) za přítomnosti K₂CO₃ (1,06 g, 7,68 mmol) byla získána směs vedlejších produktů a výchozích látek. Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2). Identita látky nebyla potvrzena MS.



Obr. 4.38: 18b

HRMS (vedlejší produkt): m/z 355,1740 [M⁺] změřeno (13 % čistota)

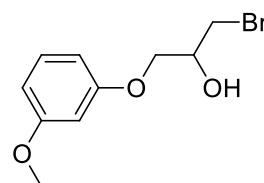
m/z 355,1612 vypočteno pro [C₁₅H₂₃N₄O₆]⁺



Obr. 4.39: vedlejší produkt

4.1.19 Příprava 1-(3-methoxyfenoxy)-3-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol (19b)

Pro získání látky **19a** byl použit OP1. Z epibromhydrinu 5,52 g, 40,28 mmol) a z 3-methoxyfenolu (1,00 g, 8,06 mmol) bylo získáno 1,10 g produktu (výtěžek 52 %). Jako mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a pro TLC byla použita směs heptan/ethylacetát (5:1). Identita látky byla potvrzena pomocí MS.



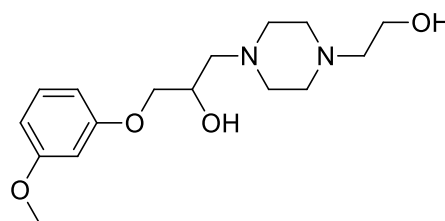
Obr. 4.40: 19a

HRMS: m/z 261,0113 [M^+] změřeno

m/z 261,0121 vypočteno pro [$C_{10}H_{14}BrO_3^+$]

Látka **19b** byla získána pomocí OP2. Z látky **19a** (1,10 g, 4,21 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu (0,823 g, 6,32 mmol) za přítomnosti K_2CO_3 (1,74 g, 12,63 mmol) bylo získáno 0,832 g produktu (výtěžek 64 %). Jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát:methanol:amoniak (4:4:0,2).

Látka **19b** byla následně převedena na svou hydrochloridovou sůl podle OP3. Finální produkt je oranžovočervený olej o čistotě >95 %. Identita látky byla potvrzena pomocí MS a NMR.



Obr. 4.41: 19b

HRMS: m/z 311,1963 [M^+] změřeno

m/z 311,1965 vypočteno pro [$C_{16}H_{27}N_2O_4^+$]

NMR: 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 7.15 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.4$ Hz, 1H), 6.54 – 6.49 (m, 3H), 4.17 – 4.08 (m, 1H), 4.01 – 3.88 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.96 – 2.56 (m, 12H).

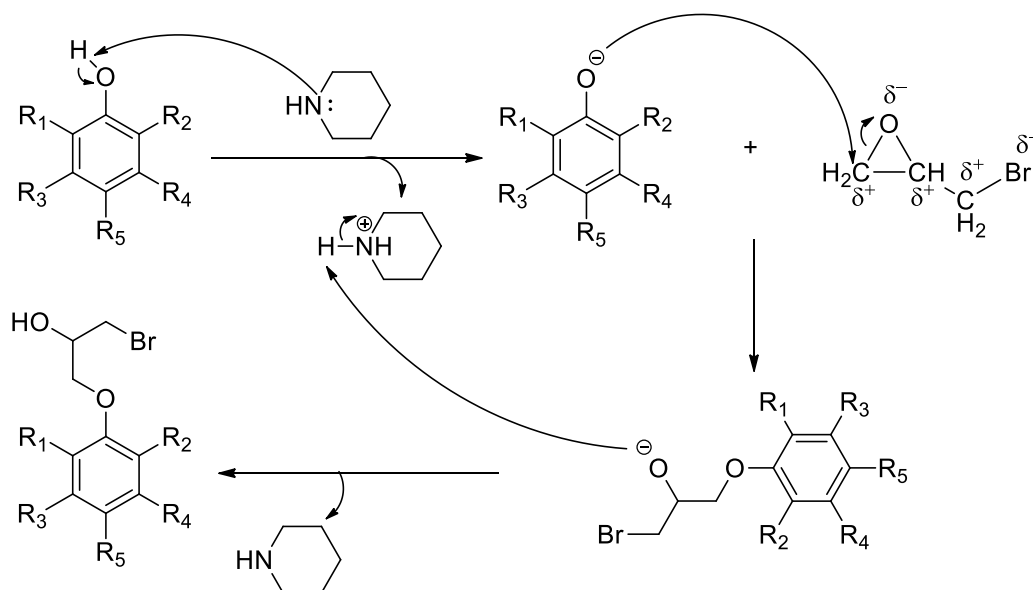
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 161.01, 160.13, 129.54, 106.41, 106.06, 100.70, 70.36, 66.73, 60.28, 59.34, 57.55, 56.93, 54.29, 52.42, 52.24, 16.98.

Celková výtěžnost látky **19b** byla 34 %.

5 Výsledky a diskuze

Látky **1a-19a** byly připraveny reakcí substituovaného fenolu s epibromhydrinem. Epihalohydriny mají vysoký syntetický potenciál díky přítomnosti tří elektrofilních uhlíků a jednoho nukleofilního kyslíku (viz Obr. 5.1) a kvůli pnutí trojčlenného oxiranového kruhu¹⁸². Tyto vlastnosti umožňují otevření kruhu a následnou nukleofilní substituční reakci s různými nukleofily. Epibromhydrin byl zvolen místo epichlorhydrinu. Produkty této reakce mají na propan-2-olovém řetězci brom, který při reakci ve druhého kroku odstupuje snadněji než chlor a zvyšuje tak výtěžnost reakce.

Jako katalyzátor byl použit piperidin, který je více nukleofilní než aromatické fenoly, a je tedy schopný odtrhnout vodík od OH-skupiny substituovaných fenolů¹⁸³ (viz Obr. 5.1). Tasler a kol. ve své práci z roku 2010 publikovali reakce vycházející ze substituovaných fenolů a epibromhydrinu v butanonu při 80 °C a za přítomnosti K₂CO₃, u nich došlo pouze ke vzniku aryloxymethyloxiranů¹⁸⁴, což může naznačovat, že pro otevření trojčlenného oxiranového kruhu epihalohydrinů je nutná přítomnost piperidinu, či vyšší teplota reakce.



Obr. 5.1: Navržený reakční mechanismus syntézy prekurzorů

Nejvyšší výtěžek, 95 %, měla látka **2a**, která obsahuje dvě CH₃O-skupiny. U látek **3a**, **8a**, **10a**, **14a** a **17a** se výtěžek pohyboval pouze mezi 30–40 %.

Látka **3a** obsahuje ve své struktuře ethoxylovou skupinu, která může více interagovat

se stacionární fází sloupcové chromatografie a více se na ní zachycovat. Fayzullin a kol. ve své publikaci z roku 2015 připravovali 1-(allyloxy)-4-**methoxy**benzen, který byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie a měl výtěžek 65 %, a 1-(allyloxy)-4-**ethoxy**benzen, který byl přečištěn pouze extrakcí a poskytl výtěžek 67 % (cit. ¹⁸⁵). Chavez a kol. ve své práci z roku 2011 syntetizovali 2-[(4-ethoxyfenoxy)methyl]oxiran reakcí 4-ethoxyfenolu s epichlorhydrinem. Výsledné krystaly nebylo potřeba přečistit a výtěžek reakce byl 87 %. Protože ani jedna analogická látka obsahující CH₃CH₂-O-skupinu nebyla čištěna sloupcovou chromatografií, nelze vyloučit zachycení látky **3a** na chromatografické koloně, a tedy snížení výtěžku reakce. Je vysoce pravděpodobné, že reakce neproběhla kvantitativně, a tedy výchozí látky zcela nezreagovaly. To samé platí pro látky **8a**, **10a**, **14a** a **17a**.

Tyto látky ve své struktuře obsahují atom nebo atomy fluoru a jednu či více NO₂-skupin. Atom fluoru má negativní indukční efekt na aromatické jádro. NO₂-skupina má negativní mezomerní efekt. V obou případech tedy dochází k odtahu elektronů z jádra. Je možné, že vytvořený záporný náboj na atomu kyslíku v OH-skupině substituovaných fenolů není dostatečně silný pro atak atomu uhlíku ve struktuře epibromhydrinu (viz Obr. 5.1), reakce tedy neprobíhá kvantitativně. U látek (**12a-13a** a **16a**), které ve své struktuře mají jednu NO₂-skupinu a jeden atomu fluoru, případně jiný halogen (chlor), se výtěžek pohybuje mezi 55–63 %. Je možné, že vliv jednotlivých substituentů je velice komplexní a navzájem se ovlivňují. V tomto případě došlo k obstojnému zisku produktů.

Látka **14a** se od látky **15a** a **18a** liší pouze polohou obou NO₂-skupin. Látka **18a** má ale vyšší výtěžek (viz Tab. 5.1), což by naznačovalo, že 3,4-dinitrofenol má vhodnější umístění substituentů. Rozdíl mezi výtěžky ale není příliš vysoký a jediným rozdílem mohou být ztráty při purifikačním procesu způsobené lidským faktorem. Nejlepší výtěžek z prekurzorů obsahujících dvě NO₂-skupiny měla látka **15a**, která má tyto skupiny umístěné v druhé a páté poloze, jednalo se o 80% výtěžek (viz Tab. 5.1). Je možné, že u izolovaných NO₂-skupin je jejich negativní mezomerní efekt lépe rozložen po aromatickém jádře, a neovlivňuje tak výtěžnost reakce. Látky **4a** a **17a** mají pouze vyměněné polohy substituentů. Látka **4a** měla obstojný výtěžek 61 % (viz Tab. 5.1), což naznačuje, že kombinace 2-OCH₃-skupiny a 4-NO₂-skupiny u látky **4a** je výhodnější pro zvýšení výtěžku, než kombinace 2-NO₂-skupiny a 4-OCH₃ skupiny u látky **17a**.

Kreighbaum a kol. ve své práci z roku 1980 zveřejnili reakci substituovaného fenolu

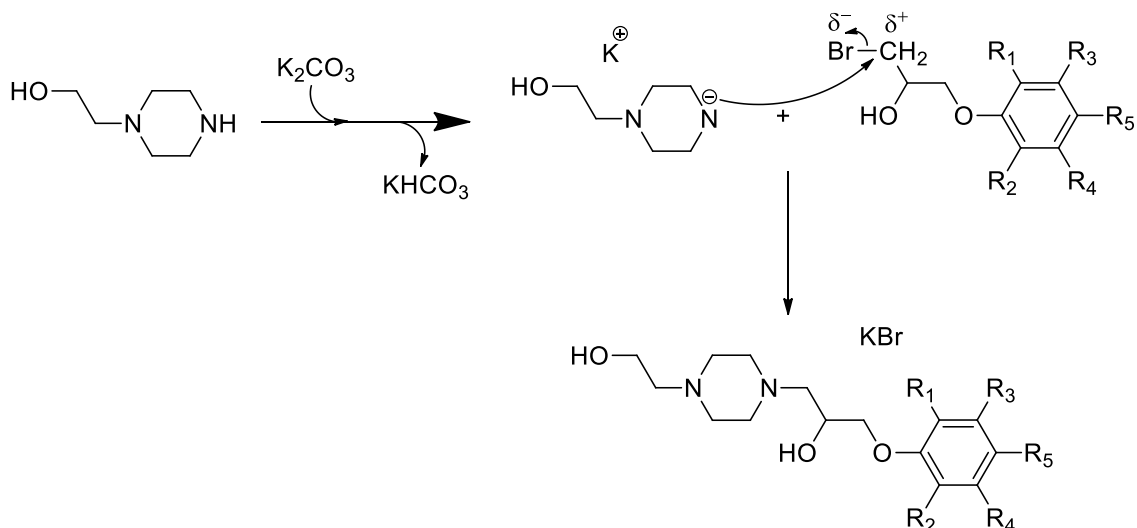
se šestinásobkem molárního množství epichlorhydrinu, kdy byl jako katalyzátor použit piperidin a reakce běžela při teplotě refluxu epichlorhydrinu po dobu dvou až osmi hodin¹⁸⁶. Produktem reakce byly 1,2-epoxy-3-(aryloxy)propany, tedy nedošlo k otevření oxiranového kruhu. Teplota varu epichlorhydrinu je 118 °C, což se od teploty varu epibromhydrinu, 135 °C, liší o 17 °C. Teplota varu reakce by mohla být klíčová pro otevření trojčlenného kruhu. Vliv na jeho otevření může mít také nižší dostupnost chloru. Marek a kol. ve své práci z roku 2020, od nichž byl OP1 převzat a modifikován, udával výtěžnost reakcí okolo 80 % (cit. ¹⁴⁵). Ani u těchto látek nebyla použita sloupcová chromatografie. Průměrný výtěžek reakcí provedených v této diplomové práci se pohyboval okolo 54 %. Celkově bylo připraveno 19 látek, jejichž čistota dle MS se pohybovala okolo 80 %, což bylo dostatečné pro druhý krok syntézy.

Tab. 5.1: Výtěžnost produktů prvního kroku syntézy, **1a-19a**

Označení látky	Výtěžnost [%]	Označení látky	Výtěžnost [%]
1a	62	11a	74
2a	95	12a	63
3a	35	13a	55
4a	61	14a	35
5a	42	15a	80
6a	62	16a	56
7a	59	17a	37
8a	32	18a	47
9a	52	19a	52
10a	35		

Látky **1a-19a** byly nasazeny do druhého kroku syntézy. Požadované produkty vznikly u reakcí **1b-12b**, **16b-17b** a **19b**, tedy celkem 15 žádoucích produktů. Výtěžnost se pohybovala od 46–92 % (viz Tab. 5.2). Jako výchozí látka byl použit 1-(2-hydroxyethyl)piperazin. Pro zlepšení jeho přístupnosti byl do reakční směsi přidán nadbytek K₂CO₃, který měl fungovat jako báze a pomoci odtrhnout atom vodíku navázaného na atomu dusíku ve čtvrté poloze. Tento atom dusíku se stal silným nukleofilním činidlem, které mohlo atakovat parciálně kladně nabitý atom uhlíku

s navázaným atomem bromu, který má vysokou elektronegativitu (viz Obr. 5.2). Následně došlo k odstupu atomu bromu a ke vzniku žádaného produktu. Velmi podobná struktura připravovaným látkám byla publikována v práci Filipová a kol. z roku 2020. Výtěžek druhého kroku reakce je udáván na 79 % (cit. ¹⁴⁴).

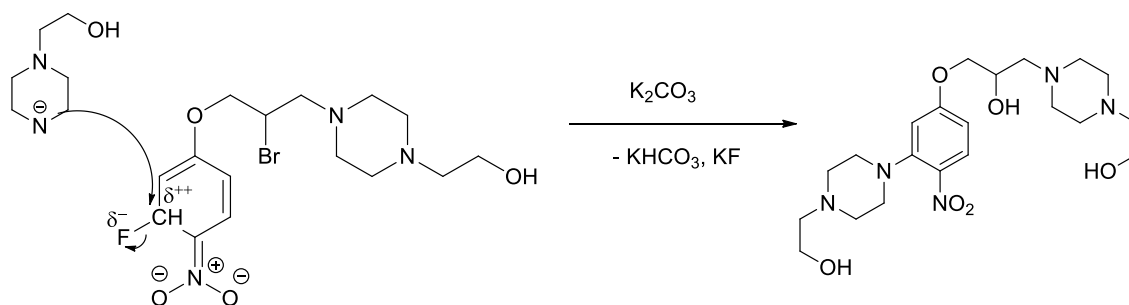


Obr. 5.2: Navržený reakční mechanismus syntéz druhého kroku

Látka **4b** byla již publikována v práci Marek a kol. z roku 2020 (cit. ¹⁴⁵), kde tato reakce měla výtěžek 81 %. Výtěžek reakce v této diplomové práci byl 82 % (viz Tab. 5.2), což je adekvátní. Analogické reakce publikované v této práci měly výtěžek 59–77 %.

O vysoké čistotě vznikl neočekávaný produkt **13c**, místo látky **13b**. Reakce byla provedena třikrát, pokaždé se stejným produktem **13c**. Zde je vidět jednoznačný vliv polohy substituentů na průběh reakce. Pro zvýšení selektivity substituce byla pomalým přikapáváním přidána látka **13a** v acetonitrilu a v reakční směsi vzniklo 9 % látky **13b**, kterou se ale nepodařilo oddělit. Za vhodné optimalizace podmínek a postupu by mělo být možné látku **13b** dosáhnout. Látka **12b**, kterou se podařilo připravit s celkovým výtěžkem 44 % (viz Tab. 5.2), má na svém benzenovém jádře o-fluor a p-NO₂-skupinu. **13a** pro očekávaný produkt **13b** měla na svém benzenovém jádře v poloze m-fluor a p-NO₂-skupinu. Výchozí látky **12a** a **13a** se tedy liší pouze polohou atomu fluoru. Hutchinson a kol. ve své publikaci z roku 2008 provedli na benzyl(3-fluor-3-nitrofenyl)etheru nukleofilní aromatickou substituci benzylmerkaptanem, který se na aromatické jádro navázal místo atomu fluoru¹⁸⁷. To samé potvrzuje patent Budzika

a kol. z roku 2007, kdy parciálně kladně nabitý atom uhlík v benzenovém jádře, na němž byl navázán atom fluoru, ve struktuře 3-fluor-4-nitrofenyl(methyl)ether byl atakován volným elektronovým párem NH_2 -skupiny ethyl-4-amino-1-piperidinkarboxylátu¹⁸⁸. Za běžných podmínek je atom fluoru velmi nevhodná odstupující skupina, protože jeho vazba s uhlíkem je velmi silná. U aromatických jader, zvláště u těch, které obsahují jednu elektron-odtahující skupinu, reaguje fluor velmi dobře. Má silně negativní indukční efekt, což vytváří na jeho vazebném atomu uhlíku silnější parciálně kladný náboj, který může být zatakován nukleofilní skupinou, v případě látky **13c** volným elektronovým párem atomu dusíku ve čtvrté poloze molekuly 1-(2-hydroxyethyl)piperazin (viz Obr 5.3). Tento negativní indukční efekt napomáhá stabilizovat tzv. Meisenheimerův komplex¹⁸⁹, který se jako nestabilní intermediát přemění na látku **13c**. U látky **12b** k tomuto jevu nedošlo, protože atom uhlíku přímo navázaný na atom fluoru v této molekule není ovlivněn mezomerním efektem nitro skupiny. Atom fluoru v tomto případě nepůsobí jako odstupující skupina. Látka **13c** vznikala velice selektivně a její struktura obsahovala dvě hydroxyethylpiperazinové struktury, které byly zásadní pro vývoj potenciálních látek s radioprotektivním účinkem. Její výtěžek byl 34 %, který byl pravděpodobně nižší kvůli komplexnějšímu uspořádání molekuly v prostoru a snadnějšímu zachytávání na chromatografické koloně. Celkový výtěžek této reakce byl 19 % (viz Tab. 5.2).



Obr. 5.3: Navržený reakční mechanismus vzniku látky **13c**

Dle průběžných výsledků MS analýzy se látku **5b** podařilo připravit. Kvůli nedostatečné čistotě byla směs obsahující látku **5b** přečištěna druhou kolonovou chromatografií, kde došlo k masivním ztrátám látky a pouze získání čistých vedlejších produktů. Je pravděpodobné, že se látku **5b** nepodařilo zachytit do sbíraných frakcí, případně se ji nepodařilo vymýt ze silikagelového chromatografického sloupce.

Při zopakování reakce a zkvalitnění purifikačního procesu této látky bylo dosaženo produktu o vysokém výtěžku 92 %. Je možné, že výchozí látky reagovaly více kvantitativně než při první syntéze. Dále byla optimalizována mobilní fáze u sloupcové chromatografie. V tomto případě se podařilo látku zachytit do sbíraných frakcí.

Látky **14b**, **15b** a **18b** ve své struktuře obsahují na aromatickém jádře dvě NO₂-skupiny a ani jednu z nich se nepodařilo připravit o uspokojivé čistotě. Zde může figurovat negativní mezomerní efekt NO₂-skupin. Látka **14b** vznikla, ale ani po přečištění sloupcovou chromatografií nebyla dle průběžných MS analýz o dostatečné čistotě. Je možné, že přečištění extrakcí by mohlo vést k izolaci této látky, jejíž výtěžek by byl ale vysoce snížen kvůli přítomnosti řady vedlejších produktů a nečistot. Reakční směs pro získání látky **15b** byla přečištěna sloupcovou chromatografií dle OP2. Přítomnost aromatického produktu v sesbíraných frakcích byla sledována pomocí TLC a detekována pod UV světlem. Pomocí MS byly analyzovány všechny sesbírané frakce a v žádné z nich nebyla potvrzena přítomnost látky **15b**. Pokud požadovaný produkt při reakci vznikl, nejspíš se vyskytoval v nízkých množstvích, které buď zůstaly zachycené na silikagelovém sloupci nebo byly vymyty ze sloupce příliš brzy, a nebyly tedy zachyceny v sesbíraných frakcích. To samé platí pro látku **18b**, u které v jedné z frakcí se nacházel vedlejší produkt, kterému ve struktuře chyběla OH-skupina na propylovém řetězci.

Tab. 5.2: Výtěžnost produktů druhého kroku reakce **1b-19b** a celková výtěžnost

Látka	Výtěžnost [%]	Celková výtěžnost [%]	Látka	Výtěžnost [%]	Celková výtěžnost [%]
1b	69	42	11b	47	35
2b	46	44	12b	70	44
3b	81	28	13c	34	19
4b	82	50	14b	-	-
5b	92	39	15b	-	-
6b	85	53	16b	76	43
7b	89	53	17b	77	29
8b	80	26	18b	-	-
9b	48	25	19b	64	34
10b	77	27			

Pro získané látky byly vypočteny hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu (P), což je hodnota udávající lipofilitu látky¹⁹⁰. P udává rozpustnost nenabitě sloučeniny v nemísitelném dvojfázovém systému lipidů a vody. Negativní hodnota logP vypovídá o vysoké afinitě k vodné fázi. Pokud je hodnota logP nulová, je látka rovnoměrně rozdělena mezi obě fáze. Kladné hodnoty logP ukazují na lipofilní charakter sledované sloučeniny. LogP = 1 znamená, že je látka rozdělena v poměru 10:1 ve fázích organická:vodná. Kalkulované hodnoty logP (clogP) byly vypočteny PharmDr. Lukášem Prchalem, Ph.D. ve dvou softwarových programech pro porovnání rozdílu a jsou uvedeny v Tab 5.3 (str. 59).

Pro pochopení chování léčiva v biologických systémech jsou hodnoty logP ve farmaceutickém průmyslu sledovány. Dle Lipinského pravidla pěti, které bylo definováno v rámci společnosti Pfizer, léčiva určená pro orální podání by neměla mít hodnotu logP vyšší než 5 (cit. ¹⁹³). Látky cílené na centrální nervový systém by měly mít hodnotu logP okolo 2, pro orální a intestinální absorpci se ideální hodnota pohybuje v intervalu 1,35 – 1,80 (cit. ¹⁹⁴). Nejvyšší hodnotu clogP mají látky **7b** a **11b**, u kterých je možné očekávat zvýšenou cytotoxicitu při *in vitro* testování (viz Tab. 5.3), protože ve většině případů zvyšující lipofilita látky přímo koreluje s rostoucí cytotoxicitou. Tuto korelaci potvrzují např. publikace Filipowské z roku 2016 (cit. ¹⁹¹) nebo Johna z roku 1993 (cit. ¹⁹²). Látka **7b** obsahuje ve své struktuře tři atomy chloru, látka **6b** obsahuje pouze dva atomy chloru, přesto jejich hodnota clogP je velmi blízká. Mnohonásobná halogenace na blízkých atomech uhlíku zvyšuje hodnotu logP pravděpodobně kvůli lokalizovaným dipólům, které jsou částečně chráněny od vody sousedními halogeny¹⁹⁵. Vliv na lipofilitu látky mají hlavně atomy halogenů o větší velikost, tzn. chlor, brom a jod. Větší atomy jsou snadněji polarizovatelné, protože jejich vnější elektronová slupka je slaběji vázaná, a tedy snadněji narušitelná. Tohoto efektu se týkají Londonovy disperzní síly díky formaci okamžitého dipólového momentu v blízkých molekulách, čímž mají vliv na rozpustnost látky¹⁹⁶. Z halogenů je pouze atom fluoru schopný interagovat s vodíkovými vazbami pomocí jeho volných elektronových párů, které ale kvůli menším rozměrům atomu drží pevně u sebe. Je to možné vysvětlení, proč u látek **8a** a **10a**, které mají jeden a více atomů fluoru, nedošlo k zásadnímu zvýšení hodnoty clogP. Zde je vidět vliv atomů chloru na zvýšení lipofility látek. Velmi nízkou hodnotu clogP má látka **13c**, jejíž struktura obsahuje dvě molekuly 1-(2-hydroxyethyl)piperazinu, které zvyšují

hydrofilitu.

V některých případech ale není potvrzen vztah mezi lipofilitou a cytotoxicitou látky¹⁹⁷, proto je stále nutné provést testy cytotoxicity na různých buněčných liniích. Citlivost jednotlivých buněčných linií se může u různých látek lišit. Navíc i zvýšená cytotoxicita látky nevylučuje radioprotektivní účinek. Pro přesnější hodnocení látek je lepší měřit hodnotu logP experimentálně, protože se od clogP může lišit, vzhledem k používaným algoritmům.

Tab. 5.3: Shrnutí získaných produktů, celková výtěžnost reakcí, hodnoty clogP (CD) a clogP (M)

Látka	Celková výtěžnost [%]	clogP (CD)	clogP (Ma)
1b	42	0,48	0,203
2b	44	0,36	0,046
3b	28	0,82	0,560
4b	50	-0,87	0,143
5b	39	1,17	0,965
6b	53	1,73	1,569
7b	53	2,28	2,173
8b	26	0,77	0,504
9b	25	1,33	1,108
10b	27	1,08	0,789
11b	35	2,30	2,004
12b	44	-0,87	0,444
13b	-	-	-
13c	19	-2,40	-0,434
14b	-	-	-
15b	-	-	-
16b	43	-0,38	0,905
17b	29	-0,87	0,143
18b	-	-	-
19b	34	0,48	0,203

6 Závěr

Celkem bylo připraveno 19 prekurzorů, z nichž 15 vedlo k získání finálního produktu a jeden vedl ke vzniku jiného, čistého produktu, který byl díky obsahu dvou 1-(2-hydroxyethyl)piperazinových struktur zařazen na další testování. Identita látek byla ověřena pomocí MS a NMR analýz. Látky budou následně podrobeny testům cytotoxicity *in vitro* na 10 vybraných buněčných liniích. Látky s nízkou mírou cytotoxicity budou dále testovány na své radioprotektivní účinky *in vitro*. Vybraní kandidáti budou případně použiti i na *in vivo* testování. Výsledky těchto studií určí, zda mají některé z látek slibný potenciál. Tato práce je prvním krokem směřujícím k potenciálnímu využití těchto nízkomolekulárních látek v klinickém použití. Zavedení tohoto typu látek do případné praxe by mohlo zlepšit vyhlídky pacientů po léčbě radioterapií.

7 Bibliografie

1. Cancer Research UK. *Worldwide Cancer Statistics | Cancer Research UK*. Dostupné z URL: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer> [cit. 10.3.2021]
2. World Health Organization. *Cancer Today*. Dostupné z URL: <https://gco.iarc.fr/today/home> [cit. 10.3.2021]
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
4. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment: Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-based Clinical Guidelines. *Cancer*. 2005;104(6):1129-1137.
5. Borrás J. M., Lievens Y., Grau C. The Need for Radiotherapy in Europe in 2020: Not only Data but also a Cancer Plan. *Acta Oncologica*. 2015;54(9):1268-1274.
6. Barton MB, Allen S, Delaney GP, et al. Patterns of Retreatment by Radiotherapy. *Clinical Oncology*. 2014;26(10):611-618.
7. Lalani N, Cummings B, Halperin R, et al. The Practice of Radiation Oncology in Canada. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;97(5):876-880.
8. Hoppe R, Phillips T, Roach M. *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology*. 3rd ed. Saunders; 2010.
9. Garibaldi C, Jerezek-Fossa BA, Marvaso G, et al. Recent Advances in Radiation Oncology. *ecancer*. 2017;11.
10. Chaput G, Med CP, Sussman J. Integrating Primary Care Providers through the Seasons of Survivorship. *Curr Oncol*. 2019;26(1):48-54.
11. Hosseinimehr SJ. Trends in the Development of Radioprotective Agents. *Discovery Today*. 2007;12(19-20):794-805.
12. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, et al. PUMA Regulates Intestinal Progenitor Cell Radiosensitivity and Gastrointestinal Syndrome. *Cell Stem Cell*. 2008;2(6):576-583.
13. Yu H, Shen H, Yuan Y, et al. Deletion of PUMA Protects Hematopoietic Stem Cells and Confers Long-term survival in Response to High-dose γ -irradiation. *Blood*. 2010;115(17):3472-3480.
14. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 Network. *Nature*. 2000;408(6810):307-310.
15. Yu J, Zhang L. PUMA, a Potent Killer with or without p53. *Oncogene*. 2008;27(Suppl 1):S71-S83.

16. Pazdur RMD. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach: Medicalm Surgical and Radiation Oncology*. F. A. Davis Company; 2003.
17. Hosseinimehr SJ. Potential Utility of Radioprotective Agents in the Practice of Nuclear Medicine. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2009;24(6):723-731.
18. Gilbert ES. Ionising Radiation and Cancer Risks: What Have We Learned from Epidemiology? *International Journal of Radiation Biology*. 2009;85(6):467-482.
19. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of the Mortality of Atomic Bomb Survivors, report 14. *Radiation Research*. 2012;177(3):229-243.
20. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*. 1954;119(3097):623-626.
21. Pastink A, Eeken JCJ, Lohman PHM. Genomic Integrity and the Repair of Double-strand DNA Breaks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;480-481:37-50.
22. Olive PL. The Role of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Cell Killing by Ionizing Radiation. *Radiation Research*. 1998;150(5):S42.
23. Zhou R, Si J, Zhang H, et al. The Effects of x-ray Radiation on the Eye Development of Zebrafish. *Human and Experimental Toxicology*. 2014;33(10):1040-1050.
24. Turner ND, Braby LA, Ford J, Lupton JR. Opportunities for Nutritional Amelioration of Radiation-Induced Cellular Damage. *Nutrition*. 2002;18(10):904-912.
25. Mustata G, Li M, Zevola N, et al. Development of Small-Molecule PUMA Inhibitors for Mitigating Radiation-Induced Cell Death. *CTMC*. 2011;11(3):281-290.
26. Cerella C, Teiten M-H, Radogna F, Dicato M, Diederich MF. From Nature to Bedside: Pro-survival and Cell Death Mechanism as Therapeutic Targets in Cancer Treatment. *Biotechnology Advances*. 2014;32(6):1111-1122.
27. Patel DD, Bansal DD, Mishra S, et al. Radioprotection to small intestine of the mice against ionizing radiation by semiquinone glucoside derivative (SQGD) isolated from *Bacillus* sp. INM-1. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;370(1-2):115-125.
28. Komarova EA. Transgenic Mice with p53-responsive lacZ: p53 activity Varies Dramatically during Normal Development and Determines Radiation and Drug Sensitivity *in vivo*. *The EMBO Journal*. 1997;16(6):1391-1400.
29. Machlin LJ, Bendich A. Free Radical Tissue Damage: Protective Role of Antioxidant Nutrients. *The FASEB Journal*. 1987;1(6):441-445.

30. Wang H, Mu X, He H, Zhang X-D. Cancer Radiosensitizers. *Pharmacological Sciences*. 2018;39(1):24-48.
31. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *Aging*. 2012;4(5):330-349.
32. Alison MR. *The Cancer Handbook*. Wiley; 2007.
33. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. W. H. Freeman; 2008.
34. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26(4):239-257.
35. Clavería C, Giovinazzo G, Torres M. Myc-driven Endogenous Cell Competition in the Early Mammalian Embryo. *Nature*. 2013;500:39-44.
36. Savill J. The innate immune system: Recognition of apoptotic cells. *Apoptosis and the Immune Response*.
37. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of Apoptosis by the Bcl-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(1):49-63.
38. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001;41(1):367-401.
39. Igney FH, Krammer PH. Death and Anti-death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(4):277-288.
40. Cohen PL, Eisenberh RA. Fas/APO-1: A Cell Surface Receptor that Signals Apoptosis. In: *Apoptosis and the Immune Response*. Wiley-Liss; 1995.
41. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of Fas Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*. 2009;30(2):180-192.
42. Akimzhanov AM, Wang X, Sun J, Boehning D. T-cell Receptor Complex is Essential for Fas Signal Transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(34):15105-15110.
43. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer. Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(14):7795-7798.
44. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a Novel Death Domain-containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis. *Cell*. 1995;81(4):505-512.

45. Rainaldi G, Ferrante A, Indovina P, Santini M. Induction of Apoptosis or Necrosis by Ionizing Radiation is Dose-dependent in MG-63 Osteosarcoma Multicellular Spheroids. *Anticancer research*. Published online 2003.
46. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates with c-myc to immortalize pre-B Cells. *Nature*. 1988;335(6189):440-442.
47. Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J, Nowell P, Croce C. Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation. *Science*. 1984;226(4678):1097-1099.
48. Lutz RJ. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) Domain in the Regulation of Apoptosis and Bcl-2-related Proteins. *Biochemical Society Transactions*. 2000;28(2):51-56.
49. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax. *Cell*. 2000;103(4):645-654.
50. Chang BS, Kelekar A, Harris MH, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB. The BH3 Domain of Bcl-xS Is Required for Inhibition of the Antiapoptotic Function of Bcl-xL. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):6673-6681.
51. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, et al. BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Molecular Cell*. 2005;17(4):525-535.
52. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 Family Members and the Mitochondria in Apoptosis. *Genes & Development*. 1999;13(15):1899-1911.
53. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, et al. Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science*. 1997;275(5302):983-986.
54. Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a Potent Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-xL from NMR and Parallel Synthesis. *J Med Chem*. 2006;49(2):656-663.
55. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a Gene Expressed in Programmed Myeloid Cell Differentiation, has Sequence Similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(8):3516-3520.
56. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, et al. Role for Bcl-xL as an Inhibitor of Cytosolic Cytochrome C Accumulation in DNA Damage-induced Apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(13):6939-6942.
57. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*. 2018;28(6):475-493.
58. Adachi M, Imai K. The Proapoptotic BH3-only Protein BAD Transduces Cell Death Signals Independently of its Interaction with Bcl-2. *Cell Death Differ*.

- 2002;9(11):1240-1247.
59. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a Novel BH3 Domain-only Death Agonist. *Genes & Development*. 1996;10(22):2859-2869.
 60. O'Connor L. Bim: a Novel Member of the Bcl-2 Family that Promotes Apoptosis. *The EMBO Journal*. 1998;17(2):384-395.
 61. Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, et al. Bik, a Novel Death-inducing Protein Shares a Distinct Sequence Motif with Bcl-2 Family Proteins and Interacts with Viral and Cellular Survival-promoting Proteins. *Oncogene*. 1995;11(9):1921-1928.
 62. Hijikata M, Kato N, Sato T, Kagami Y, Shimotohno K. Molecular Cloning and Characterization of a cDNA for a Novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive Gene that is Highly Expressed in an Adult T-cell Leukemia Cell Line. *J Virol*. 1990;64(10):4632-4639.
 63. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*. 2001;7(3):683-694.
 64. Han J -w., Flemington C, Houghton AB, et al. Expression of bbc3, a Pro-apoptotic BH3-only Gene, is Regulated by Diverse Cell Death and Survival Signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11318-11323.
 65. Green DR. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science*. 2004;305(5684):626-629.
 66. Purring-Koch C, McLendon G. Cytochrome c binding to Apaf-1: The Effects of dATP and Ionic Strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(22):11928-11931.
 67. Segal M, Niazi S, Simons MP, Galati SA, Zangrilli JG. Bid Activation during Induction of Extrinsic and Intrinsic Apoptosis in Eosinophils. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(7):518-524.
 68. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-489.
 69. Kuida K. Caspase-9. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2000;32(2):121-124.
 70. Porter AG, Jänicke RU. Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99-104.
 71. Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G, Ohashi A. Novel Procaspase-3 Activating Cascade Mediated by Lysoapoptases and its Biological Significances in Apoptosis. *Advances in Enzyme Regulation*. 2001;41(1):237-250.

72. Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, et al. Studies of the Lamin Proteinase Reveal Multiple Parallel Biochemical Pathways during Apoptotic Execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(20):9042-9046.
73. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, et al. Cleavage of Lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: Multiple Interleukin 1 beta-converting Enzyme-related Proteases with Distinct Substrate Recognition Properties are Active in Apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(16):8395-8400.
74. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Programmed Cell Death (Apoptosis). *Molecular Biology of the Cell 4th edition*. Published online 2002.
75. Yuste VJ, Sánchez-López I, Solé C, et al. The Contribution of Apoptosis-inducing Factor, Caspase-activated DNase, and Inhibitor of Caspase-activated DNase to the Nuclear Phenotype and DNA Degradation during Apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35670-35683.
76. Gewirtz DA. Growth Arrest and Cell Death in the Breast Tumor Cell in Response to Ionizing Radiation and Chemotherapeutic Agents which Induce DNA Damage. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;62(3):223-235.
77. Kamran MZ, Ranjan A, Kaur N, Sur S, Tandon V. Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Medicinal research reviews*. 2016;36.
78. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. NF- κ B in Cancer: from Innocent Bystander to Major Culprit. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(4):301-310.
79. Bours V, Bonizzi G, Bentires-Alj M, et al. NF- κ B Activation in Response to Toxic and Therapeutic Agents: Role in Inflammation and Cancer Treatment. *Toxicology*. 2000;153(1-3):27-38.
80. Baeuerle PA, Henkel T. Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. *Annual Review of Immunology*. 1994;12(1):141-179.
81. Jung M, Dritschilo A. NF- κ B Signaling Pathway as a Target for Human Tumor Radiosensitization. *Seminars in Radiation Oncology*. 2001;11(4):346-351.
82. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(15):1066-1071.
83. Albeni BC. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Doing in and to the Mitochondrion? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7(154).
84. Li N, Karin M. Signaling Pathways Leading to Nuclear Factor- κ B Activation. *Methods in Enzymology*. 2000;319:273-279.
85. Lin YC, Brown K, Siebenlist U. Activation of NF-kappa B Requires Proteolysis of the Inhibitor I kappa B-alpha: Signal-induced Phosphorylation of I kappa B-alpha

- Alone Does Not Release Active NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(2):552-556.
86. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B Alpha Phosphorylation Marks the NF-kappa B Inhibitor for Degradation via the Ubiquitin-proteasome Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(23):10599-10603.
 87. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, Regulation and Function of NF-kappaB. *Annual Review of Cell Biology*. 10(1):405-455.
 88. Sen R, Smale ST. Selectivity of the NF-kB Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009;2(4).
 89. Heichman KA, Roberts JM. Rules to Replicate by. *Cell*. 1994;79(4):557-562.
 90. Sherr CJ. Cancer Cell Cycles. *Science*. 1996;274(5293):1672-1677.
 91. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell R. NF-kB and Cell-cycle Regulation: the Cyclin Connection. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2001;12(1):73-90.
 92. Magné N, Toillon R-A, Bottero V, et al. NF-kB Modulation and Ionizing Radiation: Mechanisms and Future Directions for Cancer Treatment. *Cancer Letters*. 2006;231(2):158-168.
 93. Chen G. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*.
 94. Deveraux QL, Reed JC. IAP Family Proteins-Suppressors of Apoptosis. *Genes and Development*. 1999;13(3):239-252.
 95. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors (TRAFs)-a Family of Adapter Proteins that Regulates Life and Death. *Genes and Development*. 1998;12(18):2821-2830.
 96. Desagher S, Martinou J-C-. Mitochondria as the Central Control Point of Apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 2000;10(9):369-377.
 97. Chen X, Shen B, Xia L., et al. Activation of Nuclear Factor Kappa B in Radioresistance of TP53-inactive Human Keratinocytes. *Cancer Research*. 2002;62(4):1213-1221.
 98. Bellas RE, Sonenshein GE. Nuclear Factor kappaB Cooperates with c-Myc in Promoting Murine Hepatocyte Survival in a Manner Independent of p53 Tumor Suppressor Function. *Cell Growth and Differentiation*. 1999;10(5):287-294.
 99. Mayo MW, Wang C-Y, Cogswell PC, et al. Requirement of NF-kB Activation to Suppress p53-Independent Apoptosis Induced by Oncogenic Ras. *Science*. 1997;278(5344):1812-1815.

100. Ravi R, Mookerjee B, Hensbergen Y van, et al. p53-mediated Repression of Nuclear Factor- κ B RelA via the Transcriptional Integrator p300. *Cancer Research*. 1998;58(20):4531-4536.
101. Role of NF- κ B in p53-mediated Programmed Cell Death. *Nature*. 2000;404(6780):892-897.
102. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(11):a011254-a011254.
103. Qi M. MAP Kinase Pathways. *Journal of Cell Science*. 2005;118(16):3569-3572.
104. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential Regulation and Properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-3112.
105. Keshet Y, Seger R. The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In: Seger R, ed. *MAP Kinase Signaling Protocols*. Vol 661. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2010:3-38.
106. Seger R, Krebs EG. The MAPK Signaling Cascade. *FASEB J*. 1995;9(9):726-735.
107. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal Transduction through MAP Kinase Cascades. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 74. Elsevier; 1998:49-139.
108. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*. 2001;81(2):807-869.
109. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes & Cancer*. 2013;4(9-10):401-408.
110. Amorino GP, Hamilton VM, Valerie K, Dent P, Lammering G, Schmidt-Ullrich RK. Epidermal Growth Factor Receptor Dependence of Radiation-induced Transcription Factor Activation in Human Breast Carcinoma Cells. Heldin C-H, ed. *MBoC*. 2002;13(7):2233-2244.
111. Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Matsukuma K. EGF Receptor Phosphorylation is Affected by Ionizing Radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1997;1358(3):289-299.
112. Rosen EM, Day R, Singh VK. New Approaches to Radiation Protection. *Front Oncol*. 2015;4.
113. Boucher M-J, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Lainé J, Rivard N. MEK/ERK Signaling Pathway Regulates the Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1 and Promotes Survival of Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2000;79(3):355-369.
114. Rosette C, Karin M. Ultraviolet Light and Osmotic Stress: Activation of the JNK

- Cascade Through Multiple Growth Factor and Cytokine Receptors. *Science*. 1996;274(5290):1194-1197.
115. Potapova O, Haghghi A, Bost F, et al. The Jun Kinase/Stress-activated Protein Kinase Pathway Functions to Regulate DNA Repair and Inhibition of the Pathway Sensitizes Tumor Cells to Cisplatin. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14041-14044.
 116. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases Pathway Regulation, Function and Role in Human Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007;1773(8):1358-1375.
 117. Wang X, McGowan CH, Zhao M, et al. Involvement of the MKK6-p38 γ Cascade in γ -Radiation-Induced Cell Cycle Arrest. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4543-4552.
 118. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to Improve Radiotherapy with Targeted Drugs. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):239-253.
 119. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-1134.
 120. Lopiccolo J, Blumenthal G, Bernstein W, Dennis P. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway: Effective Combinations and Clinical Considerations. *Drug Resistance Updates*. 2008;11(1-2):32-50.
 121. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt Phosphorylation and Gefitinib Efficacy in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(15):1133-1141.
 122. Toulany M, Baumann M, Rodemann HP. Stimulated PI3K-AKT Signaling Mediated through Ligand or Radiation-Induced EGFR Depends Indirectly, but not Directly, on Constitutive K-Ras Activity. *Molecular Cancer Research*. 2007;5(8):863-872.
 123. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):988-1004.
 124. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters. *Oncogene*. 2003;22(56):8983-8998.
 125. Nicholson KM, Anderson NG. The Protein Kinase B/Akt Signalling Pathway in Human Malignancy. *Cellular Signalling*. 2002;14(5):381-395.
 126. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF- κ B and Upregulation of Intracellular Anti-apoptotic Proteins via the IGF-1/Akt Signaling in Human Multiple Myeloma cells: Therapeutic Implications. *Oncogene*. 2002;21(37):5673-5683.
 127. Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, et al. Targeting Stat3 in the Myeloid Compartment Drastically Improves the In vivo Antitumor Functions of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Research*. 2010;70(19):7455-7464.

128. Kortylewski M, Yu H. Role of Stat3 in Suppressing Anti-tumor Immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(2):228-233.
129. Liang J, Wang D, Renaud G, Wolfsberg TG, Wilson AF, Burgess SM. The stat3/socs3a Pathway Is a Key Regulator of Hair Cell Regeneration in Zebrafish stat3/socs3a Pathway: Regulator of Hair Cell Regeneration. *J Neurosci*. 2012;32(31):10662-10673.
130. Tan P-X, Du S-S, Ren C, Yao Q-W, Yuan Y-W. Radiation-induced Cochlea Hair Cell Death: Mechanisms and Protection. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14(10):5631-5635.
131. Royds JA, Iacopetta B. p53 and Disease: When the Guardian Angel Fails. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):1017-1026.
132. Hainaut P, Hollstein M. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 77. Elsevier; 1999:81-137.
133. Bulavin DV. Phosphorylation of Human p53 by p38 Kinase Coordinates N-terminal Phosphorylation and Apoptosis in Response to UV Radiation. *The EMBO Journal*. 1999;18(23):6845-6854.
134. Lu X, Ma O, Nguyen T-A, Jones SN, Oren M, Donehower LA. The Wip1 Phosphatase Acts as a Gatekeeper in the p53-Mdm2 Autoregulatory Loop. *Cancer Cell*. 2007;12(4):342-354.
135. Leonova KI, Shneyder J, Antoch MP, et al. A Small Molecule Inhibitor of p53 Stimulates Amplification of Hematopoietic Stem Cells but Does not Promote Tumor Development in Mice. *Cell Cycle*. 2010;9(7):1434-1443.
136. Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. The Pathological Response to DNA Damage Does not Contribute to p53-mediated Tumour Suppression. *Nature*. 2006;443(7108):214-217.
137. Potten CS. Radiation, the Ideal Cytotoxic Agent for Studying the Cell Biology of Tissues such as the Small Intestine ¹. *Radiation Research*. 2004;161(2):123-136.
138. Wu W-S, Heinrichs S, Xu D, et al. Slug Antagonizes p53-Mediated Apoptosis of Hematopoietic Progenitors by Repressing puma. *Cell*. 2005;123(4):641-653.
139. Weiss J. F., Simic M. G. Perspectives in Radioprotection. *Pharmacology and Therapeutics*. 1988;39:1-414.
140. Musa A. E, Omyan G., Esmaily F., Shabeeb D. Radioprotective Effect of Hesperidin: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)*. Published online 2019.
141. Maier P., Wenz F., Herskind C. Radioprotection of Normal Tissue Cells. *Strahlentherapie Und Onkologie*. Published online 2014:745-754.
142. Wei MC, Zong, W.-X., Cheng EH-Y, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A

- Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science*. 2001;292(5517):727-730.
143. Garrison SP, Phillips DC, Jeffers JR, et al. Genetically Defining the Mechanism of Puma- and Bim-induced Apoptosis. *Cell Death Differ*. 2012;19(4):642-649.
 144. Filipova A, Marek J, Havelek R, et al. Substituted Piperazines as Novel Potential Radioprotective Agents. *Molecules*. 2020;25:532.
 145. Marek J, Tichy A, Havelek R, et al. A Novel Class of Small Molecule Inhibitors with Radioprotective Properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;187:111606.
 146. Rizzo AM, Berselli P, Zava S, et al. Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. In: Giardi MT, Rea G, Berra B, eds. *Bio-Farms for Nutraceuticals*. Vol 698. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 2010:52-67.
 147. Candas D, Li JJ. MnSOD in Oxidative Stress Response-Potential Regulation via Mitochondrial Protein Influx. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(10):1599-1617.
 148. Robbins D, Zhao Y. Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(10):1628-1645.
 149. Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular Mechanisms and Potential Clinical Significance of S - Glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10(3):445-474.
 150. Weiss JF, Landauer MR. Protection against Ionizing Radiation by Antioxidant Nutrients and Phytochemicals. *Toxicology*. 2003;189(1-2):1-20.
 151. Harapanhalli RS, Narra VR, Yaghmai V, et al. Vitamins as Radioprotectors in vivo II. Protection by Vitamin A and Soybean Oil against Radiation Damage Caused by Internal Radionuclides. *Radiation Research*. 1994;139(1):115-122.
 152. Narra VR, Howell RW, Sastry KSR, Rao DV. Vitamin C as a Radioprotector Against Iodine-131 in vivo. *Journal of Nuclear Medicine*. 1993;34(4):637-640.
 153. Chao M. Management of Differentiated Thyroid Cancer with Rising Thyroglobulin and Negative Diagnostic Radioiodine Whole Body Scan. *Clinical Oncology*. 2010;22(6):438-447.
 154. Mozdarani H, Nazari E. Frequency of Micronuclei in 4-8 Cell Mouse Embryos Generated after Maternal gamma-irradiation in the Presence and in the Absence of Vitamin C. *Environmental Biophysics*. 2007;46(4):417-422.
 155. Srinivasan V, Weiss JF. Radioprotection by Vitamin E: Injectable Vitamin E Administered Alone or with WR-3689 Enhances Survival of Irradiated Mice. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1992;23(4):841-

845.

156. Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P. Involvement of Selenoprotein P in Protection of Human Astrocytes from Oxidative Damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40(9):1513-1523.
157. Tinggi U. Selenium: Its Role as Antioxidant in Human Health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2008;13(2):102-108.
158. Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. *Melatonin: Biological Basis of Its Function in Health and Disease*. Landes Bioscience; 2005.
159. Shirazi A, Mihandoost E, Mohseni M, Ghazi-Khansari M, Mahdavi SR. Radioprotective Effects of Melatonin against Irradiation-induced Oxidative Damage in Rat Peripheral Blood. *Physica Medica*. 2013;29(1):65-74.
160. Mihandoost E, Shirazi A, Mahdavi SR, Aliasgharzadeh A. Can Melatonin Help Us in Radiation Oncology Treatments? *BioMed Research International*. 2014;22:1-12.
161. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE. Cysteine Protection against X Irradiation. *Science*. 1949;110(2852):213-214.
162. Kouvaris JR, Kouloulis VE. Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector.
163. Purdie JW, Inhaber ER, Scheider H, Labelle JL. Interaction of Cultured Mammalian Cells with WR-2721 and Its Thiol, WR-1065: implications for mechanisms of radioprotection. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. 1983;43(5):517-527.
164. Glover D, Negendan W, Delivoria-Papadopoulos M, Glick JH. Alterations in Oxygen Transport Following WR-2721. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1984;10(9):1565-1568.
165. Calabro-Jones PM, Fahey RC, Smoluk GD, Ward JF. Alkaline Phosphatase Promotes Radioprotection and Accumulation of WR-1065 in V79-171 cells incubated in medium containing WR-2721. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. 1985;47(1):23-27.
166. Yuhas JM. Active versus Passive Absorption Kinetics as the Basis for Selective Protection of Normal Tissues by S-2-(3-Aminopropylamino)-ethylphosphorothioic Acid. *Cancer Research*. 1980;40:1519-1524.
167. Huang E, Wang F, Chen Y, et al. Amifostine Alleviates Radiation-Induced Lethal Small Bowel Damage via Promotion of 13-3-3 σ -mediated Nuclear p53 Accumulation. *Oncotarget*. 2014;5:9756-9769.
168. Cassatt DR, Fazenbaker CA, Bachy CM, Hanson MS. Preclinical Modeling of

- Improved Amifostine (Ethyol) Use in Radiation Therapy. *Seminars in Radiation Oncology*. 2002;12(1):97-102.
169. Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S, et al. Subcutaneous Administration of Amifostine During Fractionated Radiotherapy: A Randomized Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(11):2226-2233.
 170. Peebles DD, Soref CM, Copp RR, Thunberg AL, Fahl WE. ROS-Scavenger and Radioprotective Efficacy of the New PrC-210 Aminothiols. *Radiation Research*. 2012;178(1):57-68.
 171. Soref CM, Hacker TA, Fahl WE. A New Orally Active, Aminothiol Radioprotector-Free of Nausea and Hypotension Side Effects at Its Highest Radioprotective Doses. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2012;82(5):e701-e707.
 172. Hwang WYK, Koh L-P, Ng HJ, et al. A Randomized Trial of Amifostine as a Cytoprotectant for Patients Receiving Myeloablative Therapy for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34(1):51-56.
 173. Mitchell JB, DeGraff W, Kaufman D, et al. Inhibition of Oxygen-dependent Radiation-induced Damage by the Nitroxide Superoxide Dismutase Mimic, Tempol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1991;289(1):62-70.
 174. Hahn SM, Tochner Z, Krishna CM, et al. Tempol, a Stable Free Radical, is a Novel Murine Radiation Protector. *Cancer Res*. 1992;52(7):1750-1753.
 175. Citrin D, Cotrim AP, Hyodo F, Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Oncologist*. 2010;15(4):360-371.
 176. Cuscela D, Coffin D, Lupton GP, et al. Protection from Radiation-induced Alopecia with Topical Application of Nitroxides: Fractionated Studies. *Cancer J Sci Am*. 1996;2(5):273-278.
 177. Metz JM, Smith D, Mick R, et al. A Phase I Study of Topical Tempol for the Prevention of Alopecia Induced by Whole Brain Radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6411-6417.
 178. Cotrim AP, Hyodo F, Matsumoto K-I, et al. Differential Radiation Protection of Salivary Glands versus Tumor by Tempol with Accompanying Tissue Assessment of Tempol by Magnetic Resonance Imaging. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4928-4933.
 179. Bailly C. Sequence-specific Minor Groove Binding by Bis-benzimidazoles: Water Molecules in Ligand Recognition. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(5):1514-1524.
 180. Singh SP, Jayanth VR, Chandna S, et al. Radioprotective Effects of DNA Ligands Hoechst-33342 and 33258 in Whole Body Irradiated Mice. *Indian J Exp Biol*.

- 1998;36(4):375-384.
181. Martin RF, Broadhurst S, Reum ME, et al. In Vitro Studies with Methylproamine: A Potent New Radioprotector. *Cancer Res.* 2004;64(3):1067-1070.
 182. Singh GS, Mollet K, D'hooghe M, De Kimpe N. Epihalohydrins in Organic Synthesis. *Chem Rev.* 2013;113(3):1441-1498.
 183. Bender ML. Mechanisms of Catalysis of Nucleophilic Reactions of Carboxylic Acid Derivatives. *Chem Rev.* 1960;60(1):53-113.
 184. Tasler S, Baumgartner R, Ammendola A, et al. Thienopyrimidines as β 3-adrenoceptor agonists: Hit-to-lead optimization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2010;20(20):6108-6115.
 185. Fayzullin RR, Antonovich OA, Zakharychev DV, Bredikhina ZA, Kurenkov AV, Bredikhin AA. Synthesis and Some Features of Phase Behavior of Chiral p-alkoxyphenyl Glycerol Ethers. *Russ J Org Chem.* 2015;51(2):202-209.
 186. Kreighbaum WE, Matier WL, Dennis RD, et al. Antihypertensive indole derivatives of phenoxypropanolamines with .beta.-adrenergic receptor antagonist and vasodilating activity. *J Med Chem.* 1980;23(3):285-289.
 187. Hutchinson DK, Rosenberg T, Klein LL, et al. Hepatitis C NS5B polymerase inhibitors: 4,4-Dialkyl-1-hydroxy-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-3-yl benzothiadiazine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2008;18(14):3887-3890.
 188. Budzik B, Cooper DG, Forbes IT, et al. Benzimidazolones which Have Activity at Mi Receptor. 2007;(GB20050019966 20050930; GB20060002853 20060213).
 189. Meisenheimer J. Ueber Reactionen aromatischer Nitrokorper. *Justus Liebigs Ann Chem.* 1902;323(2):205-246.
 190. Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem Rev.* 1971;71(6):525-616.
 191. Filipowska A, Filipowski W, Tkacz E, Nowicka G, Struga M. Statistical Analysis of the Impact of Molecular Descriptors on Cytotoxicity of Thiourea Derivatives Incorporating 2-Aminothiazole Scaffold. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN.* 2016;64:1196-1202.
 192. John GW, Shrivastava R, Chevalier A, Pognat JF, Massingham R. An In Vitro Investigation of the Relationships Between Potency, Lipophilicity, Cytotoxicity and Chemical Class of Representative Calcium Antagonist Drugs. *Pharmacological Research.* 1993;27(3):253-262.
 193. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.*

- 1997;23(1-3):3-25.
194. Hansch C, Björkroth JP, Leo A. Hydrophobicity and Central Nervous System Agents: On the Principle of Minimal Hydrophobicity in Drug Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1987;76(9):663-687.
 195. Pliška V, Testa B, Waterbeemd H van de. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. VCH; 1996.
 196. Anon. 12.6: Intermolecular Forces: Dispersion, Dipole–Dipole, Hydrogen Bonding, and Ion-Dipole. Chemistry LibreTexts. Dostupné z URL: https://chem.libretexts.org/Courses/can/intro/12%3A_Liquids%2C_Solids%2C_and_Intermolecular_Forces/12.6%3A_Intermolecular_Forces%3A_Dispersion%2C_Dipole%E2%80%93Dipole%2C_Hydrogen_Bonding%2C_and_Ion-Dipole [cit. 10.3.2021]
 197. Deo KM, Sakoff J, Gilbert J, Zhang Y, Aldrich Wright JR. Synthesis, characterisation and influence of lipophilicity on cellular accumulation and cytotoxicity of unconventional platinum(IV) prodrugs as potent anticancer agents. *Dalton Trans*. 2019;48(46):17228-17240.