

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Alkaloidy *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master: izolace, strukturní identifikace,
příprava analog, biologická aktivita.**

**Alkaloids *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master: isolation, structural
identification, preparation of analogues, biological activity.**

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2018

Julie Schickerová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. a že jsem uvedla a řádně citovala v seznamu literatury všechny použité literární prameny a zdroje.

V Hradci Králové, květen 2018

.....

podpis

Diplomová práce byla vypracována za finanční podpory grantu SVV 260 412 Univerzity Karlovy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za ochotu, čas strávený nad touto prací, poskytnuté rady, odbornou literaturu a v neposlední řadě za trpělivost projevenou během celé tvorby práce. Dále bych velice ráda poděkovala Mgr. Daniele Hulcové za pomoc v laboratoři při zpracování experimentální části. Na tomto místě také děkuji všem zúčastněným pracovníkům Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kteří se podíleli na stanovení biologických aktivit, určování struktury a za jejich pomoc při interpretaci. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a ochotu pomoci při nejasnostech během práce v laboratoři.

OBSAH

OBSAH.....	4
PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK.....	9
1 ÚVOD.....	11
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	13
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1 Botanická charakteristika čeledi Amaryllidaceae.....	14
3.1.1 Rod <i>Narcissus</i>	15
3.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	16
3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů a jejich rozdělení dle struktury ..	18
3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů.....	24
3.3.1 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich využití v terapii Alzheimerovy choroby	25
3.3.1.1 Charakteristika Alzheimerovy choroby	25
3.3.1.2 Patofyziologie Alzheimerovy choroby	25
3.3.1.3 Terapeutické cíle Alzheimerovy choroby v současnosti.....	27
3.3.1.4 Galanthaminový strukturní typ	30
3.3.1.5 Lykorinový strukturní typ	32
3.3.2 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich potenciální využití v terapii nádorových	34
onemocnění	34
3.3.2.1 Lykorinový strukturní typ	35
3.3.2.2 Pankratistatinový strukturní typ.....	38
3.3.2.3 Haemanthaminový strukturní typ	40
4 EPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1 Materiál a chemikálie pro izolaci alkaloidů.....	43
4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie	43
4.1.2 Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii	43
4.1.3 Chromatografické adsorbenty	43
4.1.4 Pomocný materiál	44
4.1.5 Přístroje.....	44
4.1.6 Činidla použitá na detekci alkaloidů.....	44

4.1.7	Rostlinný materiál	44
4.2	Metody.....	44
4.2.1	Všeobecné postupy	44
4.2.1.1	Příprava rozpouštědel	44
4.2.1.2	Odpařování rozpouštědel z extraktů	45
4.2.1.3	Sloupcová chromatografie	45
4.2.1.4	Příprava litých desek pro preparativní TLC.....	45
4.2.1.5	Preparativní TLC	45
4.2.1.6	Detekce alkaloidů na TLC deskách,	45
4.3	Izolace alkaloidů z extraktu rostliny <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Dutch	
Master	46
4.3.1	Sloupcová chromatografie	46
4.3.2	Zpracování frakce ND 15.....	48
4.3.3	Separace alkaloidů z podfrakce ND 15-9	49
4.3.4	Strukturní identifikace alkaloidů	52
4.3.4.1	GC/MS analýza.....	52
4.3.4.2	Nukleární magnetická rezonance.....	52
4.3.4.3	Optická otáčivost	53
4.4	Testování biologické aktivity.....	53
4.4.1	Chemikálie	53
4.4.2	Příprava hemolyzátu a plazmy.....	53
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči AChE/BuChE54	
4.4.4	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči POP	55
5	VÝSLEDKY	56
5.1	Přehled izolovaných alkaloidů a jejich strukturní analýza.....	56
5.1.1	Strukturní analýza epimaritidinu (NDS1).....	56
5.1.1.1	MS analýza	56
5.1.1.2	NMR analýza	57
5.1.1.2.1	¹ H NMR spektrum epimaritidinu.....	57
5.1.1.2.2	¹³ C NMR spektrum epimaritidinu.....	57
5.1.1.3	Optická otáčivost	57

5.1.2	Strukturní analýza krininu (NDS2).....	57
5.1.2.1	MS analýza	57
5.1.2.2	NMR analýza	58
5.1.2.2.1	¹ H NMR spektrum krininu.....	58
5.1.2.2.2	¹³ C NMR spektrum krininu.....	58
5.1.2.3	Optická otáčivost	58
5.1.3	Strukturní analýza tetrahydromasoninu (NDS3).....	59
5.1.3.1	MS analýza	59
5.1.3.2	NMR analýza	59
5.1.3.2.1	¹ H NMR spektrum tetrahydromasoninu.....	59
5.1.3.2.2	¹³ C NMR spektrum tetrahydromasoninu.....	60
5.1.3.3	Optická otáčivost	60
5.2	Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k Alzheimerově chorobě	
	60	
5.3	Příprava derivátů izolovaných alkaloidů.....	61
6	DISKUZE	62
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A PRAMENŮ	64
	ABSTRAKT	72
	ABSTRACT	73

SEZNAM ZKRATEK

Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
A549	buňky plicního karcinomu
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
APP	amyloidní prekurzorový protein
Aβ	β-amyloid
BACE-1	enzym sekretasa štěpící APP v místě β
BuChE	butyrylcholinesterasa
Caco-2	buňky kolorektálního karcinomu
CDK5	cyklin-dependentní kinasa 5
cv.	pěstovaná odrůda (kultivar)
DMSO	dimethylsulfoxid
Et ₂ NH	diethylamin
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
G-361	maligní melanom
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GC	plynová chromatografie
GSK-3β	glykogensyntasa kinasa 3β
HCl	kyselina chlorovodíková
HeLa	lidský adenokarcinom děložního hrdla
HepG2	buňky jaterního hepatocelulárního karcinomu
Hey1B	lidské nádorové buňky vaječníků
HL-60	akutní premyelocytární leukemické buňky
HSC-2	krevní kmenové buňky
HT-29	buňky kolorektálního karcinomu
CH ₂ Cl ₂	dichlormethan
CHCl ₃	chloroform

cHx	cyklohexan
IC ₅₀	koncentrace působící 50 % inhibici
Jurkat	T-lymfoblastová leukemie
K562	chronická myeloidní leukemie
KM3	lidský mnohočetný karcinom
LB	lékařský benzín
LoVo	buněčné linie kolorektálního karcinomu
MCF-7	rakovinné buňky prsu
MDA-MB-231	buňky adenokarcinomu prsu
Me ₂ CO	aceton
MOLT-4	lidské leukemické buňky
MS	hmotnostní spektrometrie
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NH ₃	amoniak
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PC-3	rakovinné buňky prostaty
POP	prolyl oligopeptidasa (prolyl endopeptidasa)
SKMEL	buňky lidského kožního melanomu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
To	toluen
U373	zhoubný nádor mozku

PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1	Zástupci čeledi Amaryllidaceae: <i>Leucojum vernum</i> , <i>Galanthus nivallis</i> , <i>Narcissus poeticus</i> (12).....	14
Obrázek 2	Příklady různých typů květů rodu <i>Narcissus</i> (17-20).....	16
Obrázek 3	Struktury lykorinu, pankratistatinu, narciklasinu a haemanthaminu.....	18
Obrázek 4	Syntéza společného meziproductu 4- <i>O</i> -methylnorbelladinu.....	19
Obrázek 5	Biosyntéza základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů (36).....	20
Obrázek 6	Syntéza mesembranového typu alkaloidů (38).....	24
Obrázek 7	Mechanismus amyloidní hypotézy zahrnutý do patogeneze AD (41).....	26
Obrázek 8	Alkaloidy galanthaminového strukturního typu.....	31
Obrázek 9	Alkaloidy lykorinového strukturního typu.....	33
Obrázek 10	Alkaloidy lykorinového strukturního typu s cytotoxickou aktivitou.....	37
Obrázek 11	Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu s cytotoxickou aktivitou.....	40
Obrázek 12	Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu s význačnou cytotoxickou aktivitou.....	42
Obrázek 13	Souhrnná TLC 16 spojených frakcí z alkaloidního extraktu <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Dutch Master se zvýrazněnou frakcí č. 15.....	48
Obrázek 14	EI/MS spektrum ND 15-9.....	50
Obrázek 15	TLC jednotlivých zón ND 15-9 v soustavě S ₁ (2x vyvinuto).....	51
Obrázek 16	Epimaritidin.....	56
Obrázek 17	EI-MS spektrum epimaritidinu.....	56
Obrázek 18	Krinin.....	57
Obrázek 19	EI-MS spektrum krininu.....	58
Obrázek 20	Tetrahydromasonin.....	59
Obrázek 21	EI-MS spektrum tetrahydromasoninu.....	59

Tabulka 1	Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	21
Tabulka 2	Přehled skupin látek používaných nebo potenciálně použitelných v terapii AD (39; 41).	29
Tabulka 3	Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů galanthaminového typu čeledi Amaryllidaceae vůči AChE a BuChE	32
Tabulka 4	Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů lykorinového typu čeledi Amaryllidaceae vůči AChE	34
Tabulka 5	Cytotoxická aktivita IC ₅₀ (μM) vybraných alkaloidů prokázaná na odlišných liniích nádorových buněk	40
Tabulka 6	Hodnoty inhibičních aktivit vybraných Amaryllidaceae alkaloidů protirůzným liniím nádorových buněk	42
Tabulka 7	Získané alkaloidní frakce ze sloupcové chromatografie	47
Tabulka 8	Přehled nově vzniklých frakcí během sloupcové chromatografie	49
Tabulka 9	Podmínky preparativní TLC při zpracování frakce ND 15-9	50
Tabulka 10	Hmotnosti izolovaných látek a podmínky během jejich izolace	52
Tabulka 11	Přehled inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE	60
Tabulka 12	Přehled inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči POP	61

1 ÚVOD

Lidstvo od nepaměti provázejí mírnější či závažnější projevy chorob. Tradice a lidové léčitelství, které vycházejí z empirického počínání, pomáhaly a umožňovaly mírnit tyto projevy či navrátit zpět ztracené zdraví a tím se staly nedílnou součástí lidského života. Rostliny byly používány v nejrůznějších formách a jako přírodní zdroj byly často využívaným prostředkem k uzdravení. Postupem času, jak se rozvíjela věda a technické možnosti, byly odhaleny nové znalosti o jejich účincích. To vedlo ke zkoumání a izolaci jednotlivých složek rostlin v čistém stavu, přičemž ve většině případů byla jejich struktura popsána mnohem později. Tyto rostlinné strukturní látky, nazývané jako sekundární metabolity, vykazují značnou rozmanitost nejen co do jejich struktury, ale také do šíře spektra biologických účinků. Vzhledem k těmto vlastnostem je lze využít k léčbě mnoha civilizačních onemocnění.

Mezi jednotlivými skupinami sekundárních metabolitů je rozdíl nejen v jejich účinku a ve struktuře, ale také je jejich výskyt většinou omezen na jednu či několik příbuzenských čeledí. Za významnou a velmi zajímavou skupinu metabolitů rostlin lze považovat alkaloidní struktury. Jedná se o organické molekuly s atomem dusíku ve své struktuře, které se nacházejí v podzemních či nadzemních částech různých druhů rostlin. Jejich hlavní funkcí je pravděpodobně uskladnění dusíkatých zplodin a ochrana před býložravci (1). Alkaloidy se běžně nenacházejí ve všech čeledích, ale jejich přítomnost v rostlinách bývá pro jednotlivé čeledi charakteristická. Liší se způsobem vzniku při biosyntéze a jejich základními stavebními kameny jsou zejména aromatické aminokyseliny (2).

Terapeuticky významná skupina alkaloidů, která obsahuje isochinolinovou strukturu a která se mimo jiné nachází v široké škále významných čeledí, je produkována rostlinami čeledi Amaryllidaceae. Výzkumy a studie alkaloidů rostlin zmíněné čeledě probíhající v posledních desetiletích mají za úkol osvětlit jejich farmakologický potenciál. Do dnešní doby bylo popsáno více než 500 strukturně odlišných amarylkovitých alkaloidů. Řada z nich byla podrobena testování na nejrůznější účinky. Můžeme zmínit například inhibici cholinesteras, cytotoxické, antiproliferativní, antifungální či antimalarické působení (3). Z analýzy výsledků si lze všimnout, že biologická aktivita amarylkovitých alkaloidů je mnohdy spojena s daným strukturním typem.

Z klinicky významných zástupců těchto látek je nejdůležitější z amarylkovitých alkaloidů galanthamin, který byl již uveden na trh pod obchodním názvem Reminyl. Jeho uplatnění v klinické praxi najdeme v symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (AD), kde působí jako selektivní reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE) (4). Z dalších významných zástupců amarylkovitých alkaloidů lze uvést například lykorin. Jeho výhodou je jednak značná rozmanitost ve spektru biologických aktivit a v dnešní době je intenzivně zkoumáno zejména jeho protinádorové působení (3). Další výhodou je jeho snadná dostupnost z přírodních zdrojů, což u biologicky aktivních látek umožňuje jejich izolaci v dostatečném množství pro další testování či pro případnou přípravu derivátů.

Pod pojmem civilizační onemocnění lze uvést výše zmíněné nemoci, neboť stárnutí populace je jedním z důvodů stále se zvyšujícího výskytu neurodegenerativních chorob. Vznik neoplazmat je i v současné době jednou z nejčastějších příčin nemoci i úmrtí obyvatelstva. Látky přírodního charakteru, které by mohly být použity v terapii AD a na léčbu onkologických onemocnění, jsou v současné době intenzivně zkoumány na mnoha vědeckých pracovištích. Katedra farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové se zabývá výzkumem a hledáním potenciálně využitelných přírodních sloučenin v léčbě AD. Jedním z možných zdrojů se stal *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, který byl vybrán pro další studie.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo izolovat alkaloidy z čerstvých cibulí rostlin *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master (Amaryllidaceae) a podrobit je testování za účelem zjištění jejich biologické aktivity.

Jednotlivé cíle zahrnovaly:

- Izolace alespoň jednoho alkaloidu v čistém stavu za využití běžných chromatografických metod,
- strukturní identifikace izolovaných látek za použití běžných spektrálních metod (NMR, MS), stanovení optické otáčivosti a další,
- příprava izolovaných látek pro biologické studie,
- příprava polosyntetických derivátů izolovaných látek v případě izolace dostatečného množství,
- zpracování výsledků a sepsání diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Botanická charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Čeď Amaryllidaceae (amarylkovité) spadá do řádu Asparagales a je považována za rozsáhlou skupinu jednoděložných krytosemenných rostlin. Tyto rostliny zahrnují více než 1000 rostlinných druhů klasifikovaných přibližně do 79 rodů této čeledi (5).

Do této čeledi patří vytrvalé rostliny s oddenky, cibulovými hlízkami nebo s podzemními cibulemi. Typ listů je čárkovitý a listy jsou buď přízemní nebo lodyžní. Pro tuto čeď jsou typické pravidelné nápadné oboupohlavné květy se spodním semeníkem a jejich plodem jsou tobolky nebo bobule (6).

Z hlediska výskytu představují Amaryllidaceae hojně rozšířenou (pantropickou) čeď, jejíž zástupci se nacházejí především v několika oblastech s rozdílnou geografickou polohou (7). Amaryllidaceae jsou bohatě zastoupeny v tropických oblastech Jižní Afriky a v Andách Jižní Ameriky. Některé rody se také nacházejí v oblasti Středomoří a v mírných pásích Asie (8). Například rostliny rodu *Lycoris* jsou rozšířeny zejména v Číně a v Japonsku a tradice jejich používání sahá několik desítek generací nazpět (9; 10). Na území České republiky je možno nalézt ve volné přírodě zástupce několika rodů této čeledi, příkladem jsou rostliny rodu *Narcissus* (narcisy), *Leucojum* (bledule) a *Galanthus* (sněženky) (11).



Obrázek 1 Zástupci čeledi Amaryllidaceae: *Leucojum vernum*, *Galanthus nivalis*, *Narcissus poeticus* (12).

Celá řada rostlin čeledi Amaryllidaceae je využívána pro jejich okrasné květy a za tímto účelem bylo vyšlechtěno velké množství okrasných a zahradnických odrůd (7). Tyto rostliny jsou také ceněny vzhledem k širokému využití v lidovém léčení (13), neboť desítky rostlin čeledi Amaryllidaceae byly používány po tisíce let jako bylinné přípravky (8). Spojitost mezi Amaryllidaceae a tradiční medicínou lze vystopovat až do dob ve starověkém Řecku, kdy bylo zdokumentováno první lékařské využití. Globální průzkum rostlin mimo jiné prokázal, že například zástupci *Galanthus nivalis*, *Lycoris radiata*, *Narcissus jonquilla* a *Narcissus pseudonarcissus*, se používají dodnes k léčbě mentálních poruch (5).

3.1.1 Rod *Narcissus*

Rostliny patřící do rodu *Narcissus* dorůstají výšky v průměru 20 až 40 cm (14). Jedná se o vytrvalé jednoděložné byliny s podzemní cibulí kulovitého až vejčitého tvaru, která se skládá z dužnatých a pravidelně narůstajících vrstev suknic. Listy jsou celokrajné, čárkovité, se souběžnou žilnatinou a většinou stejně široké. Stvol je dutý, na průřezu hranatý, neolistěný, je zakončený na svém konci květem či celým souborem květenství (15). Květ se skládá ze 6 okvětních lístků uspořádaných ve dvou přeslenech, které na spodu srůstají v okvětní trubku, v jejichž ústí se nachází pakorunka (14). Zbarvení květů je dáno barvou okvětních lístků, které jsou nejčastěji v bílých či žlutých odstínech, a barvou pakorunky, jež se může vyskytovat v barvách od oranžové až po červenou (15).

Většina rostlin tohoto druhu kvete koncem zimy a na jaře. Květy rostlin rodu *Narcissus* mají v průměru od 12 do 125 mm a jsou nesené buď samostatně, příkladem je většina rostlin druhu *N. pseudonarcissus*, nebo v květenstvích, které mohou obsahovat až 15-20 květů. Příkladem je *N. tazetta* (Obr. 2A). Nejvýznamnějšími rysy květů rostlin rodu *Narcissus* jsou koruna, válcový kužel, který zasahuje do okvětní trubky, a okvětní trubka. Morfologie koruny je velmi variabilní a vyskytuje se v podobě malého okrového až žlutého pigmentového disku u *N. serotinus* (Obr. 2B), rudimentární struktury v *N. cavanillesii* (Obr. 2C), dlouhých trubkovitých struktur u *N. cyclamineus* (Obr. 2D) ve skupině *Pseudonarcissi* (16).



Obrázek 2 Příklady různých typů květů rodu *Narcissus* (17-20).

Rod *Narcissus* obsahuje asi 50 až 180 druhů podle různých autorů (21). Například Fernandes rozdělil rod *Narcissus* na 10 skupin (*Apodanthi*, *Aurelia*, *Bulbocodii*, *Ganymedes*, *Jonquillae*, *Narcissus*, *Pseudonarcissus*, *Serotini*, *Tapeinanthus*, *Tazettae*) podle rozsáhlé rodové chromozomální studie, na které pracoval více než čtyři desetiletí (22). Zajímavé mezidruhové rozdíly, které výrazně ovlivňují kvalitu a biologickou aktivitu rostlin, jsou u tohoto rodu často nalezeny v různých druzích rostlin, ale také má na ně nesporný vliv jejich geografické rozšíření (9). Veliká morfologická variabilita těchto rostlin je dána širokým zeměpisným rozšířením. Rostliny druhu *Narcissus* se nalézají v otevřených lokalitách od nížinných bažin, na březích řek, na travních plochách, poblíž keřů a lesů, přes skalní svahy až po vysokohorské pastviny (16; 21). Největší rozmanitost bylin patřící do rodu *Narcissus* se vyskytuje na Pyrenejském poloostrově, kde se nachází až 90 % všech druhů (21). V současné době je rod *Narcissus* velmi oblíbená zahradní rostlina, jelikož zahrnuje velký počet druhů, hybridů a odrůd, které se začaly kultivovat již koncem 16. století (23).

Pojem *Narcissus* je odvozen z řeckého slova „narkao“, což znamená v překladu znečitlivěný, strnulý a je takto nazýván podle narkotických vlastností rostliny. Sokrates nazval narcis "kaple pekelných bohů" právě kvůli jeho narkotickým účinkům (23).

3.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

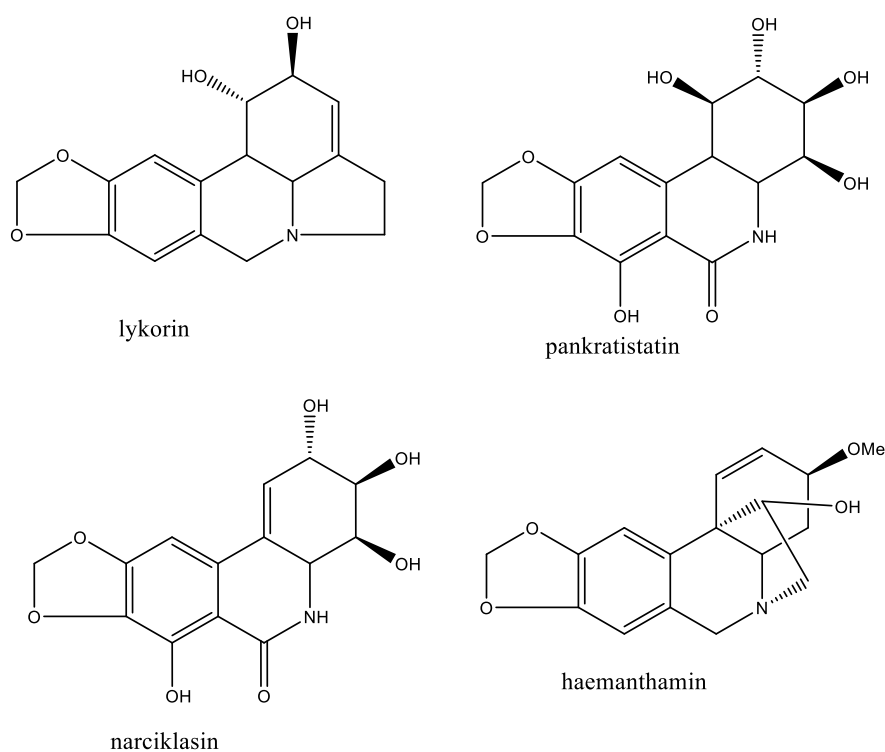
Tradiční medicína je v rámci zdravotní péče využívána asi třemi čtvrtinami světové populace (24). Přírodní produkty se velmi významně podílejí na hledání a vývoji nových léků určených k léčbě civilizačních onemocnění (25). To je patrné u léčiv testovaných v klinických

studiích zabývající se nádorovými onemocněními, kde více než 50% z nich je izolováno převážně z rostlin (24). Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou již velmi dlouho známé pro své léčivé a toxické vlastnosti. Toto vedlo ke snaze izolovat látky zodpovědné za biologickou aktivitu rostlin čeledi Amaryllidaceae (25). První zdokumentované použití pro lékařské účely sahá až do 4. století před Kristem. Otec medicíny Hippokrates si všiml protinádorových účinků extraktu z rostliny *Narcissus poeticus* a použil olejový alkaloidní extrakt z Narcisu při léčbě děložního nádoru (13). V období středověku docházelo k rozšiřování poznatků o využití extraktu z narcisů až do zemí Střední Ameriky, Severní Afriky a do Číny (26). V tradiční medicíně se dále využívaly pro své antineoplastické účinky rostliny *Amaryllis belladonna* (27), *Crinum delagoense*, *Hymenocallis littoralis* (28) a další. Z historie lidového léčitelství lze uvést rozmanitou škálu využití amaryllkovitých rostlin. Například v Jižní Americe používali obyvatelé domorodých kmenů rozdrcené cibule rostlin z rodu *Eucharis* ve formě obkladů na léčbu vředů či nádorů. Kmen indiánů z Peru zpozoroval příznivý vliv slizu z těchto cibulí na akné (29). Dalším příkladem je mimo jiné použití odvaru z cibulí rostliny *Boophone disticha* kmenem Zulů na terapii úzkostných stavů, depresí a stařeckou demencí (5). V záznamech lidového léčitelství můžeme najít použití narcisů k léčbě infekčních onemocnění nebo k léčbě neplodnosti žen (7). Rostlina *Lycoris radiata* byla a stále je hojně využívána v tradiční čínské medicíně (30). Látky izolované z rostlinných extraktů této čeledi jsou zkoumány v rámci chemického výzkumu téměř 200 let a během posledních tří desetiletí byla řada těchto alkaloidů i jejich syntetických derivátů podrobena velkému množství studií (8).

Nejvýznamnější sekundární metabolity rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou isochinolinové alkaloidy. Nacházejí se v celé rostlině, nicméně jejich největší koncentrace se vyskytuje především v podzemních cibulích (11). Hlavní funkcí alkaloidů je chemická ochrana proti požeru kvůli své hořkosti (21). Vzhledem k přítomnosti těchto látek rostliny čeledi Amaryllidaceae vykazují velmi široké spektrum biologických aktivit. Řada amaryllkovitých alkaloidů výrazně ovlivňuje činnost některých fyziologických enzymů. Jako důležitá se uvádí schopnost inhibice cholinesteras, zejména AChE (31). Celá řada alkaloidů produkovaných rostlinami čeledi Amaryllidaceae působí cytotoxicky (11). Toto antineoplastické působení (30) spolu s inhibiční aktivitou vůči acetylcholinesterase (31) se dnes řadí mezi nejvýznamnější aktivity těchto látek. U těchto rostlin byla dále prokázána

aktivita protizánětlivá, antivirová, antimalarická a další (32). Z rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo do dnešní doby izolováno a popsáno více než 500 alkaloidů. Jsou klasifikovány do různých strukturních typů a více než 100 z nich pochází právě z rodu *Narcissus* (21). Navzdory jejich značné strukturální variabilitě jsou biosynteticky příbuzné, neboť vycházejí ze stejného prekurzoru tyrosinu a fenylalaninu (8). Jejich široká biologická aktivita vedla k nárůstu zájmu o sekundární metabolity rostlin této čeledi, což mimo jiné vedlo k přípravě jejich polosyntetických derivátů s různou účinností (27).

Izolace prvního alkaloidu lykorinu z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* byla uskutečněna již v roce 1877, ale jeho struktura byla objasněna až v roce 1956 (13). V dnešní době je za nejdůležitější alkaloid této čeledi považován bezesporu galanthamin (33), který byl v roce 2000 uveden na trh pod generickým názvem Reminyl (34). Z těchto látek mají největší potenciál i další alkaloidy pankratistatin, narciklasin, haemanthamin a již zmíněný lykorin (13).

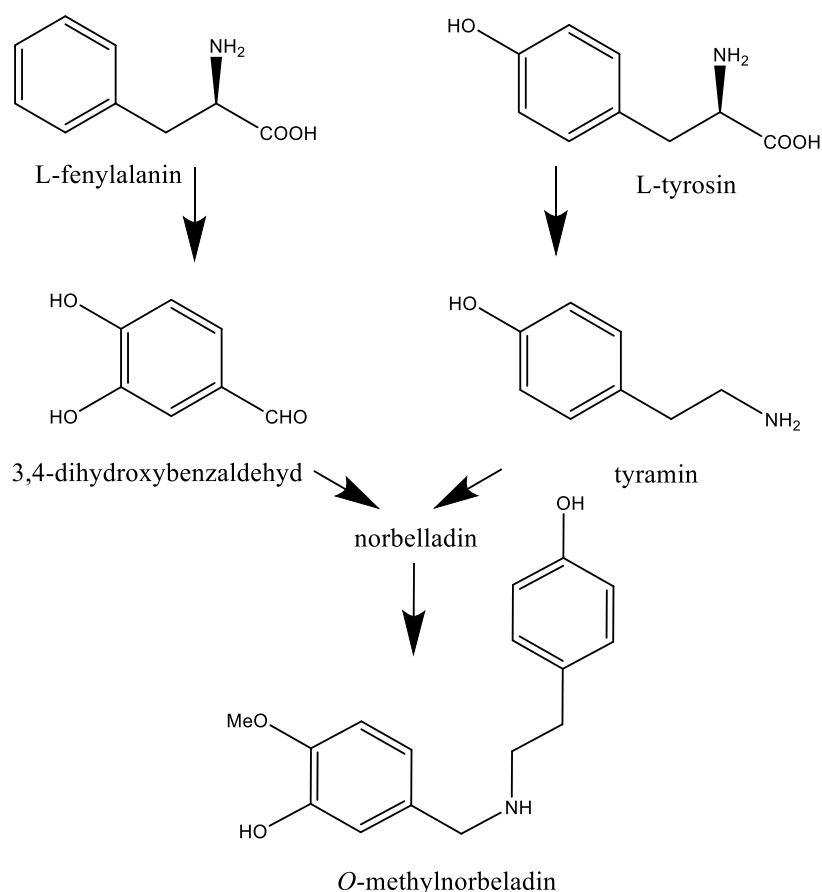


Obrázek 3 Struktury lykorinu, pankratistatinu, narciklasinu a haemanthaminu.

3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů a jejich rozdělení dle struktury

Jak již bylo uvedeno, amaryllkovité alkaloidy jsou typické značnou strukturní rozmanitostí. Z pohledu biosyntézy vycházejí ze společného klíčového meziproductu

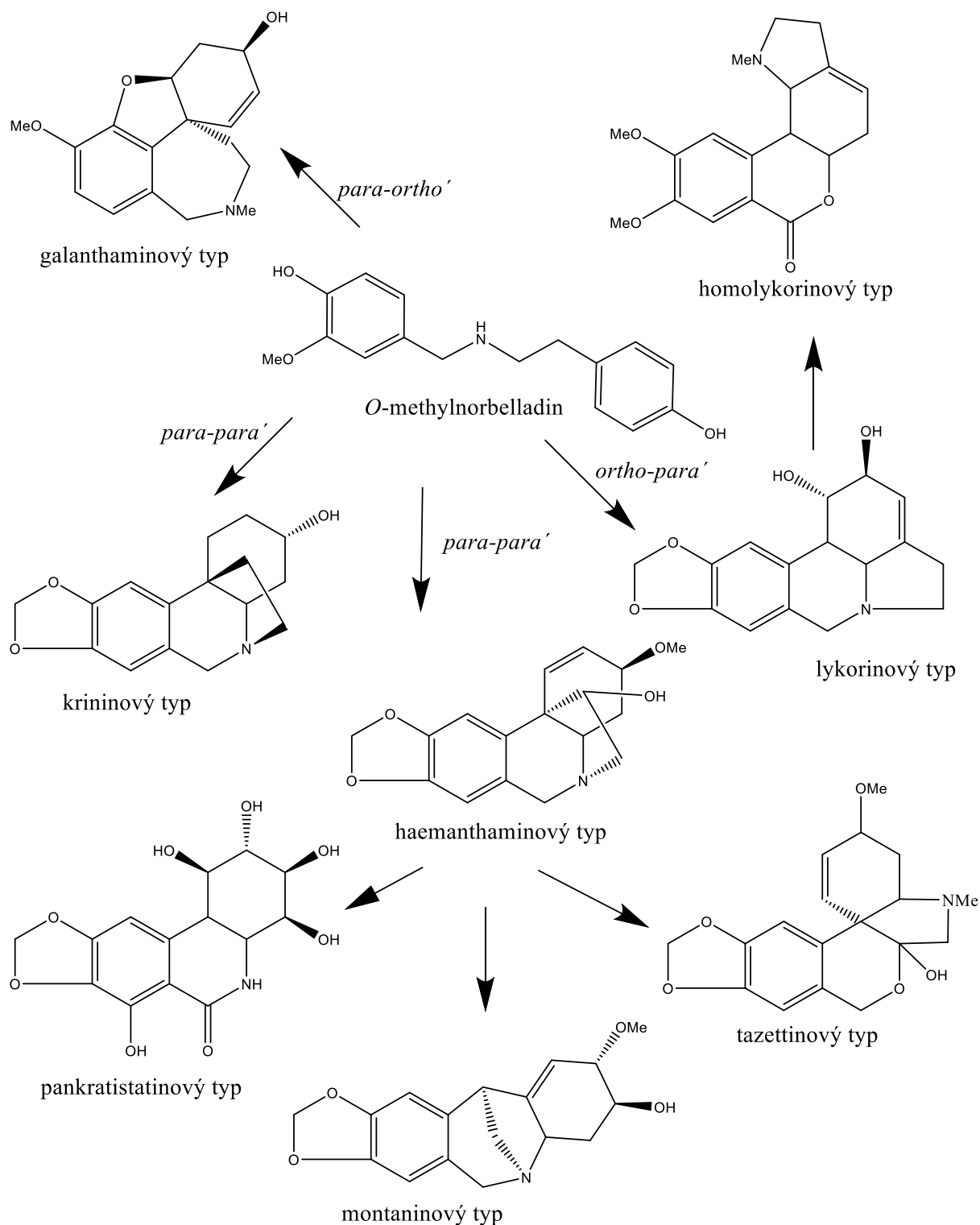
norbelladinu, podle kterého je biosyntetická cesta vedoucí k syntéze těchto látek označována jako tzv. norbelladinová cesta (34). V literatuře je do dnešní doby popsáno 18 strukturních typů těchto alkaloidů (35) a do hlavních skeletů patří rovněž norbelladinový typ, ze kterého vychází vlastní biosyntéza (Obr. 4 a 5). Prvním stupněm v biosyntéze je přeměna aromatických aminokyselin L-tyrosinu a L-fenylalaninu na tyramin a 3,4 – dihydroxybenzaldehyd a jejich následná kondenzace za vzniku 4-*O*-metylnorbelladinu (2).



Obrázek 4 Syntéza společného meziprojektu 4-*O*-metylnorbelladinu.

Klíčovým krokem při biosyntéze těchto alkaloidů je cyklizace fenolové vazby výše zmíněného meziprojektu do poloh označovaných jako *orto-para'*, *para-para'* a *para-orto'* (35). Další chemickou modifikací vzniká 9 základních strukturních typů. Jejich názvy jsou odvozeny od hlavního zástupce a patří mezi ně norbelladinový, lykorinový, homolykorinový, krininový, haemanthaminový, pankratistatinový, tazettinový, galanthaminový a montaninový typ (Obr. 5) (8). Alkaloidy galanthaminového typu jsou tvořeny z prekurzoru *O*-metylnorbelladinu cyklizací fenolové vazby do polohy *para-orto'* (35). Strukturní typy

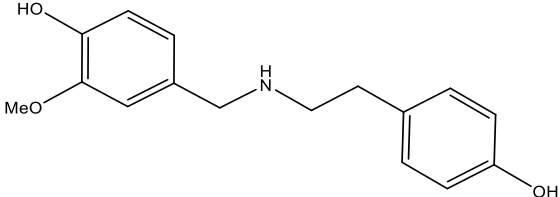
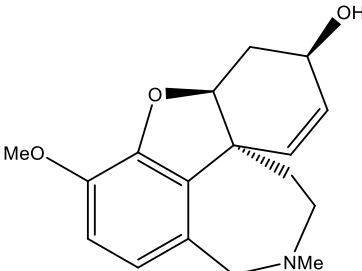
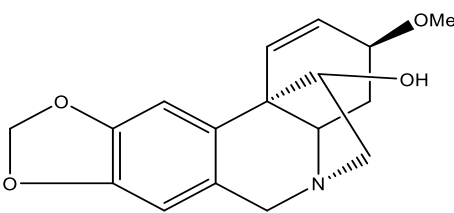
haemanthaminový a krininový se liší pouze prostorovým uspořádáním 5,10*b*-ethanolového můstku (36). Biosyntetická cesta, která vede k méně často frekventovaným typům amarylkovitých alkaloidů, nebyla doposud zcela objasněna.



Obrázek 5 Biosyntéza základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů (36).

Přehled základních strukturních typů s výčtem hlavních alkaloidů a jejich rostlinných zdrojů je shrnut v následující tabulce (Tab. 1). V každém rostlinném druhu se nachází směs alkaloidů s několika hlavními sloučeninami a s různě velkým počtem látek s nižším zastoupením (35; 36). Ze zástupců méně frekventovaných strukturních typů amarylkovitých alkaloidů můžeme uvést například sloučeniny plikamin (plikaminový typ), gracilin (gracilinový typ) (35) a galanthindol (galanthindolový typ), který ve své struktuře kombinuje dva strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů (36; 37).

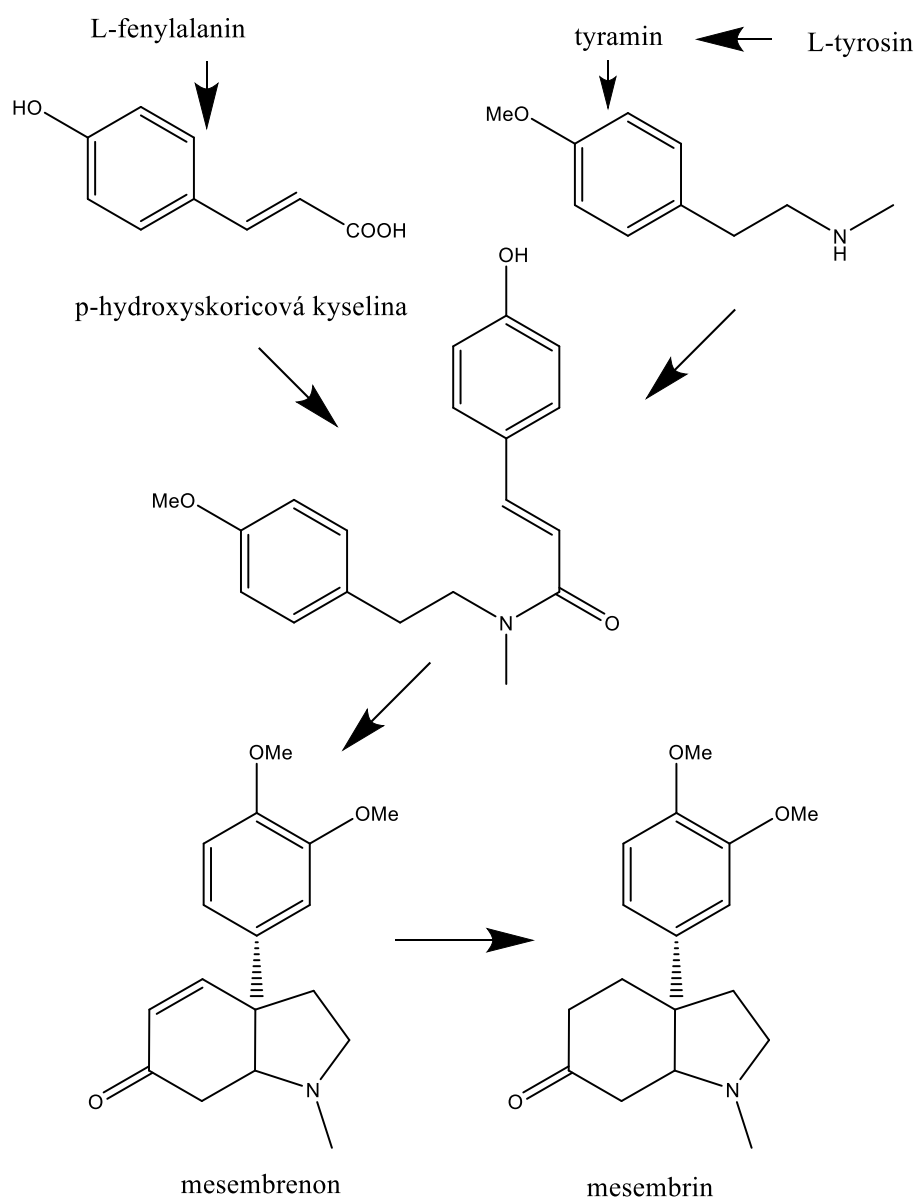
Tabulka 1 Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Strukturní typ	Základní stavba strukturního typu	Hlavní zástupce	Rod
Norbelladinový		Belladin	<i>Nerine</i> (2) <i>Chlidanthus</i> (66)
Galanthaminový		Galanthamin	<i>Leucojum</i> (35) <i>Narcissus</i> (21) <i>Zephyranthes</i> (46) <i>Cyrtanthus</i> (28) <i>Galanthus</i> (64) <i>Chlidanthus</i> (66)
Haemanthaminový		Haemanthamin	<i>Narcissus</i> (35; 36) <i>Boophane</i> (8) <i>Clivia</i> (28) <i>Cyrtanthus</i> (28) <i>Galanthus</i> (64)

Tabuka 1			pokračování
Homolykorinový		Homolykorin	<i>Narcissus</i> (21; 36) <i>Lycoris</i> (3) <i>Haemanthus</i> (28)
Krininový		Krinin	<i>Nerine</i> (8) <i>Narcissus</i> (8) <i>Boophane</i> (8; 28) <i>Crinum</i> (28; 37) <i>Zephyranthes</i> (46) <i>Bunsvigia</i> (28)
Lykorinový		Lykorin	<i>Bunsvigia</i> (28) <i>Narcissus</i> (21) <i>Lycoris</i> (35) <i>Crinum</i> (28) <i>Amnocharis</i> (28) <i>Zephyranthes</i> (46) <i>Chlidanthus</i> (66)
Pankratistatinový		Narciklasin	<i>Narcissus</i> (88) <i>Leucojum</i> (2) <i>Hymenocallis</i> (58)

Tabuka 1			pokračování
Tazettinový		Tazettin	<i>Narcissus</i> (21) <i>Zephyranthes</i> (46) <i>Chlidanthus</i> (66) <i>Cyrtanthus</i> (28) <i>Galanthus</i> (64)
Montaninový		Montanin	<i>Lycoris</i> (37) <i>Haemanthus</i> (28)

Za zvláštní typ Amaryllidaceae alkaloidů lze považovat mesembranový typ alkaloidů. Tyto látky byly v čeledi Amaryllidaceae identifikovány pouze v rostlinách *Hymenocallis arenicola*, *Crinum oliganthum* a také u dvou druhů narcisů, a to u *N. triandrus* a *N. pallidus* (8). Nedávné studie uvádějí přítomnost tohoto typu alkaloidů v *N. pallidus* až do výše 95 %. Jmenovitě se jedná o mesembrenon, mesembrenol a mesembrin (21), který je zároveň považován za hlavní mesembranový alkaloid (38). Z hlediska struktury jsou tyto alkaloidy podobné krininovému typu alkaloidů a jejich biosyntetická cesta vychází ze stejných prekurzorů jako amarylkovité alkaloidy. Studie zabývající se biosyntézou těchto látek prokázaly, že vlastní průběh biosyntézy a následná chemická modifikace probíhá odlišným způsobem (38) (Obr. 6). Výskyt alkaloidů mesembranového typu v čeledi Amaryllidaceae může být následkem mutací genů, které jsou zodpovědné především za modifikaci derivátů L-fenylalaninu. U mesembranového typu vzniká p-hydroxyskořicová kyselina, která se váže s tyraminem za vzniku specifického meziprojektu (21). Významným zdrojem tohoto strukturního typu je především rod *Sceletium* (Aizoaceae). Obsahuje mimo jiné druh *Sceletium tortuosum*, který je využíván tradiční čínskou medicínou na území Jižní Afriky a u kterého dochází k postupnému rozšiřování do celého světa (37).



Obrázek 6 Syntéza mesembranového typu alkaloidů (38).

3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

Jak již bylo naznačeno v úvodu, spektrum biologických aktivit těchto látek je poměrně rozsáhlé. Do současné doby bylo mnoho z nich, i jejich syntetické deriváty, podrobeny nemalému množství studií. V současnosti jsou mezi nejvýznamnější aktivity amarylkovitých alkaloidů řazeny zejména dvě a to: schopnost inhibovat AChE (31) a jejich protinádorové působení vyvolané indukci apoptózy (32). Dalším biologickým aktivitám není v této práci

věnována pozornost, protože v porovnání s těmito účinky jsou považovány za méně významné.

3.3.1 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich využití v terapii Alzheimerovy choroby

3.3.1.1 Charakteristika Alzheimerovy choroby

Toto závažné onemocnění je charakterizováno neurodegenerativními změnami nervového systému. Obecně je považováno za jednu z nejčastějších příčin demence u stárnoucí populace, ve které snižuje kvalitu života a představuje jednu z primárních příčin úmrtí (39).

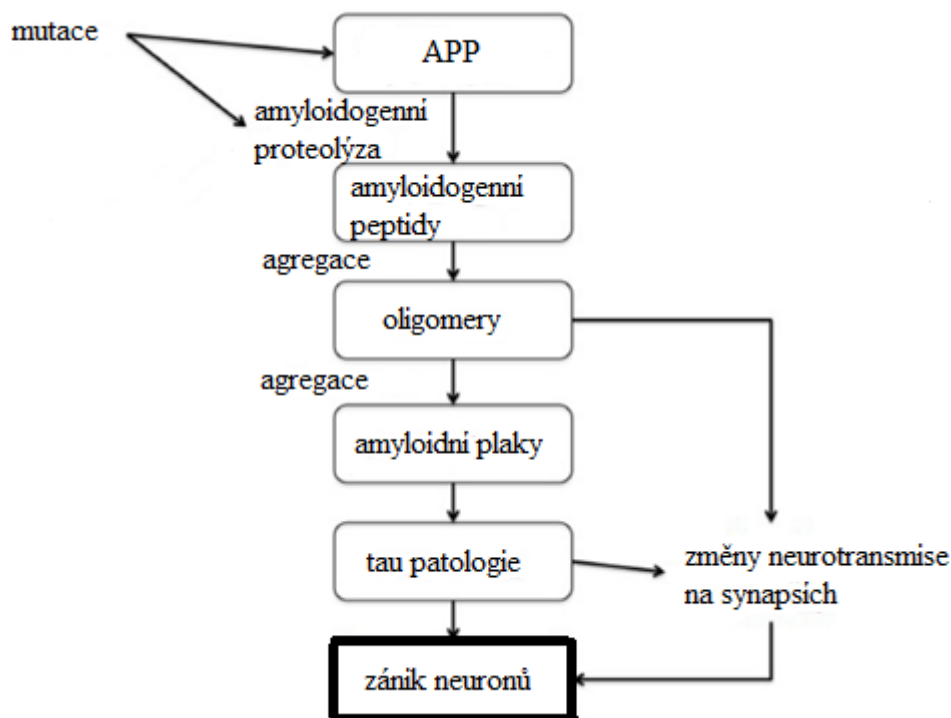
Klinicky se projevuje ztrátou paměti, postupným a nevratným zhoršením kognitivních (poznávacích) funkcí a poruchou řeči (10). Z hlediska vývoje nemoci lze AD rozdělit na několik stádií. V počátečních fázích je pacient stále soběstačný, nicméně jeho kognitivní funkce se začínají pomalu zhoršovat a pacient zapomíná například vykonávat běžné činnosti. Postupem času dochází k prohlubování ztráty paměti, u pacientů se objevuje dezorientace, a nakonec dochází k úplné ztrátě paměti i schopnosti se postarat o sebe sama (40). Vzhledem k faktu celosvětového stárnutí populace by mohla AD představovat pro společnost významný sociální problém.

Etiopatogeneze této závažné choroby není stále zcela objasněna a existuje několik teorií jejího vzniku. Avšak i přes nejednoznačnost vzniku AD jsou amyloidní a cholinergní teorie považovány za hlavní (39).

3.3.1.2 Patofyziologie Alzheimerovy choroby

Amyloidový prekurzorový proteinu (APP) je transmembránový glykoprotein, který se přirozeně vyskytuje v neuronech a u kterého probíhají dva typy proteolytického štěpení za pomoci sekretas. U jednoho z typů, označovaný amyloidogenní cesta, je APP štěpen β -sekretasou (BACE-1) a γ -sekretasou za vzniku peptidových vláken amyloidu β ($A\beta$), u kterých se stupněm polymerizace zvyšuje jejich toxicita. Aktivují se enzymatické reakce, které jsou zodpovědné za oxidativní stres, dochází k narušení hladin Ca^{2+} , k produkci volných kyslíkových radikálů, k aktivaci COX II a k následné apoptóze. Druhým typem je tzv. neamyloidogenní cesta, kdy metabolizací APP pomocí α -sekretas vznikají rozpustné fragmenty, které mají neuroprotektivní charakter (39).

Vznik patologického proteinu A β je podle amyloidní teorie popisován kaskádou amyloidních reakcí (Obr. 7) Mutace APP jsou uváděny jako počáteční impulz a vedou k poruše jeho metabolismu. Podle amyloidní teorie dochází ke vzniku amyloidogenních peptidů, které se spojují do oligomerů. Jejich další následnou agregací se tvoří amyloidní plaky způsobující intracelulární metabolické změny τ -proteinu. Jeho hyperfosforylace a následná agregace vede ke vzniku neurofibrilárních klubek, čímž dochází k zániku takto poškozených neuronů (41). Fyziologickou úlohou τ -proteinu je podpora a stabilizace axonálního transportu, která je kontrolována kinasami. V rámci AD je nutné zmínit dva z těchto enzymů: glykogensyntasu kinasu 3 β (GSK-3 β), podílející se na neurogenezi, a cyklin-dependentní kinasu 5 (CDK5), která se podílí na procesech zrání neuronů během vývoje mozku. Oba enzymy výrazně ovlivňují hyperfosforylaci τ -proteinu. Dochází-li k nadměrné tvorbě A β , zvyšuje se také aktivita GSK-3 β (39). Amyloidní plaky i neurofibrilární klubka mohou zapříčinit nadměrné uvolnění glutamátu v určitých částech CNS, což může vést k neuronální smrti prostřednictvím N-metyl D-aspartát (NMDA) receptorů (41).



Obrázek 7 Mechanismus amyloidní hypotézy zahrnutý do patogeneze AD (41).

Úloha cholinerní neurotransmise je základem cholinerní teorie a její nedostatečnost, která je způsobena zejména patologicky sníženým vznikem a uvolněním neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) z presynaptických zakončení, je hlavním důvodem kognitivních poruch (42). Na odbourávání ACh se u AD podílejí dva typy cholinesteras: AChE a butyrylcholinesterasa (BuChE). Oba dva enzymy se nacházejí v různých tkáních lidského těla ve dvou formách, a to G4 a G1. U zdravého jedince převažuje u AChE G4 forma, ale v případě AD je u tohoto enzymu výrazně zvýšená forma G1 (39). AChE se fyziologicky vyskytuje zejména v membránách erytrocytů, v nervosvalové ploténce a v synapsích v CNS (43), kde hraje důležitou roli například v regeneraci neuronů. U pacientů trpících AD její aktivita klesá, zatímco koncentrace BuChE se zvyšuje. Na základě výsledků různých studií bylo zjištěno, že inhibice obou enzymů může být prospěšná v léčbě kognitivních poruch spojených s neurologickými abnormalitami (44). Do dnešní doby byl v terapii AD použit jediný přípravek s těmito vlastnostmi – Rivastigmin (44), který přednostně inhibuje G1 izoformy (45). Z tohoto důvodu je vhodné hledat nové inhibitory se schopností inhibovat AChE i BuChE (46). Druhý enzym je přítomen převážně v krevní plazmě a také hraje důležitou roli v cholinerní neurotransmisi (43). Vyskytuje se v gliových buňkách, neuronech, v neuritovém plaku a neurofibrilárních klubkách. Pokud je aktivita AChE snížena, BuChE ji může nahradit (46).

3.3.1.3 Terapeutické cíle Alzheimerovy choroby v současnosti

V terapii AD je důležité, aby léčba byla komplexní, tzn. měla by zahrnovat farmakoterapii, ale i podpůrnou péči a metody z ní vyplývající. Základem je pečovat o celkový tělesný i duševní stav pacienta, podporovat trénování paměti formou kognitivní rehabilitace a udržovat pacienta v chodu běžných denních aktivit (40). Jelikož vlastní příčina AD není zcela objasněna, farmakoterapie je mnoha autory považována pouze za symptomatickou (47-49). Vlastní léčbu je možné z pohledu jejích účinků rozdělit na kognitivní a nekognitivní, do které lze zahrnout farmakoterapii nespavosti, depresí, agitovanosti a dalších přidružených symptomů. Kognitivní farmakoterapie vychází z cholinerní hypotézy. Podpora syntézy neurotransmiterů či prodloužení jejich pobytu v synaptické štěrbině vede k prodloužení vazby ACh na jeho receptory. Toho je dosaženo podáváním inhibitorů AChE, které zvyšují dostupnost ACh v centrálních cholinerních

synapsích, čímž dochází k zvýšení cholinergní transmise. Tyto struktury jsou považovány za neúčinnější v léčbě AD (50) a v této farmakoterapeutické skupině jsou zároveň jedinými schválenými léky u pacientů s mírnou až středně závažnou AD (51). Mezi další kognitiva lze zařadit prekuzory tvorby Ach a agonisty muskarinových a nikotinových receptorů. Další možností léčby, která je využívána zejména v pokročilém stadiu nemoci, je ovlivnění a normalizace glutamatergní transmise. Za tímto účelem jsou pacientům podávány blokátory NMDA receptorů, které jsou důležité v procesech učení a paměti (52).

V rámci různých studií bylo prokázáno, že u AD dochází nejprve ke ztrátě cholinergních neuronů s následným sníženým uvolňováním Ach. V současnosti jsou v terapii AD využívány tři látky jako inhibitory AChE (donepezil, galanthamin, rivastigmin). Další rozsáhlé výzkumy dokázaly, že AD je charakteristická změnami v kortikálních a subkortikálních strukturách glutamátových receptorů. V terapii je využívána pouze jediná látka, kterou je parciální inhibitor těchto receptorů, memantin. Ačkoli oba terapeutické přístupy dosáhly velmi efektivních úrovní v léčbě, získané klinické výsledky nejsou zcela uspokojivé (41).

Další terapeutické možnosti jsou založeny na působení proti zvýšené tvorbě A β a na inhibici fosforylace a agregace τ -proteinu. Anti-amyloidní strategie je zaměřena na inhibici či stimulaci sekteras účastnící se metabolismu APP, na selektivní redukci syntézy A β 42, prevenci amyloidní agregace a anti-amyloidní imunoterapii. Z preklinických studií AZD3293, které se zabývají inhibicí β -sekretas, byly získány slibné výsledky. Molekula je v současné době vystavena klinickému testování za účelem zjištění jejich terapeutických vlastností (53). Dosud získané výsledky z klinických studií dalších zajímavých molekul, které modulují γ -sekretasy či blokují agregaci A β 42, jsou slibné, ale stále je nezbytné dokázat jejich účinnost a bezpečnost (41).

Mnoho vědců formulovalo závěry na základě molekulárních patologických dat uvedených v literatuře, že neurofibrilární klubka mohou být jednou z hlavních příčin AD. Podkladem této hypotézy jsou fakta uvedená v mnoha studiích. Neurofibrilární klubka se nevyskytují v mozku zdravého člověka, a pokud jsou přítomny, nacházejí se v buňkách a jejich hustota odpovídá závažnosti demence (54). Proto je anti-tau strategie mnoha vědci považována za hlavní přístup v léčbě AD. Jak již bylo v textu naznačeno, nadměrná fosforylace τ -proteinu a jeho agregace jsou klíčovými procesy během utváření neurofibrilárních klubek vedoucí v konečném důsledku k zániku neuronu. Tyto procesy by

mohly být sníženy inhibicí enzymu GSK-3 β , který je za jejich tvorbu z velké části zodpovědný (55). GSK-3 β je inhibován pomocí protein kinasy C (PKC) a ta je stimulována prostřednictvím agonistů muskarinových receptorů typu 1 (51). Nedávnými studiemi bylo prokázáno, že tyto agonisté mohou snížit fosforylaci a agregaci τ -proteinu (56). Na druhou stranu doposud nebyly objeveny molekuly schopné blokovat jejich agregaci (57). V následující tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny některé látky, které jsou, anebo mohou být použity v patofyziologických procesech probíhajících u AD (41).

Tabulka 2 Přehled skupin látek používaných nebo potenciálně použitelných v terapii AD (39; 41).

Patologický proces	Možnost jeho ovlivnění
Snížení hladin Ach	Kognitiva (iAChE, iBuChE) Agonisté nikotinových receptorů
Zvýšení hladin glutamátu	Blokáda NMDA receptorů
Tvorba Aβ	Inhibitory β -sekretas Modulátory γ -sekretas
Agregace Aβ	Blokátory agregace A β 42 Chelatátory kovů Protilátky proti A β 42
Tvorba neuronálních klubek	Inhibitory GSK-3 β Modulátory γ -sekretas

Galanthamin je považován za jednu z nejvýznamnějších látek s inhibiční aktivitou vůči AChE ($IC_{50}=2,5\mu M$) (46). Tato látka byla původně izolována z cibulí sněženky *Galanthus nivalis* L. z čeledi Amaryllidaceae (58). Později byla nalezena i v dalších rodech této čeledi, například v *Narcissus* spp., *Leucojum* spp. a dalších (33). Galanthamin je dlouhodobě působící, selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor AChE. Na rozdíl od ostatních inhibitorů používaných u AD se vyznačuje schopností alosterické modulace nikotinových receptorů, čímž dochází ke zvýšení afinity receptoru k Ach (8; 59). Inaktivace tohoto enzymu vede ke kumulaci Ach a ke stimulaci muskarinových a také nikotinových receptorů (59).

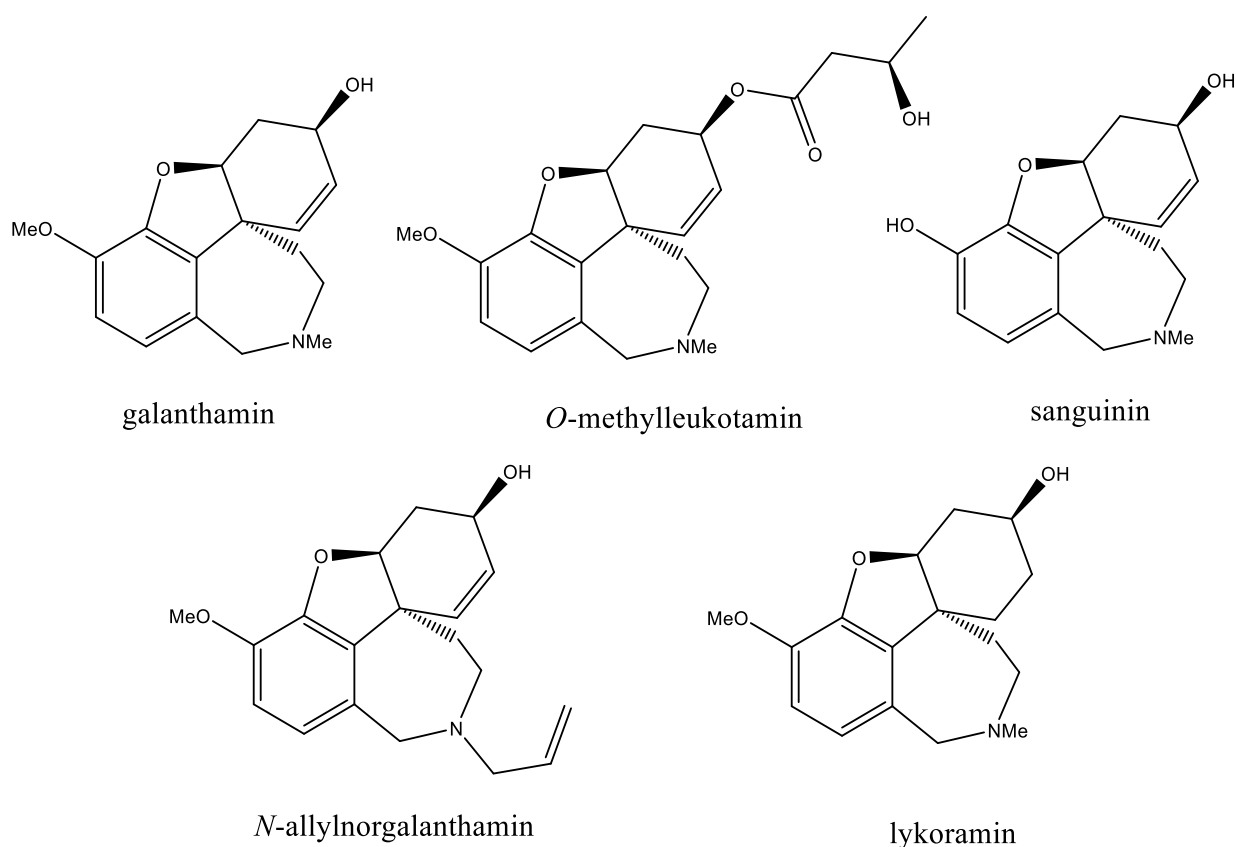
Vzhledem k těmto vlastnostem ovlivňuje nejen cholinergní přenos, ale i jiné systémy, jako jsou monoaminy, glutamát a GABA (58). Dále bylo zjištěno, že má schopnost modulovat neamyloidogenní cestu u metabolismu APP, čímž dochází k zábraně toxicity, resp. agregaci A β (42). Na rozdíl od jiných alkaloidů, galanthamin nevykazuje cytotoxické vlastnosti (61). Z výše uvedených účinků vyplývá, že tato sloučenina je vhodná nejen k léčbě AD, ale také k terapii některých duševních chorob, jako je například schizofrenie a bipolární poruchy (51; 58).

V současné době je v rámci vědeckých studií zabývající se testováním alkaloidních extraktů amarylkovitých rostlin věnována pozornost zejména dalším potenciálním inhibitorům AChE. Výsledky těchto screeningových studií slouží především k výběru vhodných rostlinných druhů s danou aktivitou a případně i k následné izolaci látek v čistém stavu za pomoci fytochemických metod. Data získaná z biologických testů dokládají skutečnost, že galanthaminový a lykorinový strukturní typ amarylkovitých alkaloidů dosahuje povětšinou nejlepších hodnot při inhibici AChE oproti jiným strukturním typům (50; 51; 62; 63). Zástupci galanthaminového typu jsou obecně považovány za silnější inhibitory (51).

3.3.1.4 Galanthaminový strukturní typ

Alkaloidy patřící do tohoto strukturního typu jsou tvořeny dibenzofuranem. U hlavního zástupce galanthaminu je pro vazebný účinek na AChE důležitá přítomnost čtyř vazebných míst v jeho struktuře, a to: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina (51). Lze uvést další terapeuticky zajímavé látky, které mají vyšší či srovnatelnou inhibiční aktivitu vůči AChE. Alkaloid sanguinin (9-*O*-demethylgalanthamin) vykazuje silnější inhibiční aktivitu než galanthamin (Tab. 3) a je přítomen například v rostlinách *Eucharis grandiflora*, *Galanthus elwesii* (43) a několika dalších. Volná hydroxyskupina na uhlíku C9 cyklohexenového kruhu způsobuje až dvacetinásobné zvýšení inhibiční aktivity vůči AChE (Obr. 8) (64). Ale zároveň také dochází ke snížení lipofility molekuly, čímž se zmenšuje její schopnost překonat hematoencefalickou bariéru. Stejně tak i další látky, *N*-allylnorgalanthamin a *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin izolované z *Leucojum aestivum*, jsou považovány za silnější inhibitory AChE (Tab. 3). Jejich zvýšená aktivita je způsobena substitucí *N*-methylové skupiny allylovou nebo 14-methylallylovou skupinou (Obr. 8). Izolace

N-alkylderivátů galanthaminového typu alkaloidů je velice obtížná vzhledem k jejich velmi nízké koncentraci v rostlinách (65). Další zajímavou látkou tohoto typu je *O*-methylleukotamin, který byl izolován z *Galanthus elwesii* (43). Jeho anticholinesterasová aktivita je spojena s inhibicí obou cholinesteras (Tab. 3) (43). Chybějící AChE inhibiční aktivita u lykoraminu (Obr. 8) a epinorlykoraminu je způsobena hydrogenací dvojně vazby v cyklohexenového kruhu. Hydrogenací dojde ke změně prostorové konfigurace molekuly, která je nezbytná pro vyvolání biologického účinku na AChE (51).



Obrázek 8 Alkaloidy galanthaminového strukturního typu.

Tabulka 3 Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů galanthaminového typu čeledi Amaryllidaceae vůči AChE a BuChE.

Alkaloid	IC₅₀ AChE (μM)	IC₅₀ BuChE (μM)	Literatura
Sanguinin	0,10 \pm 0,01	NT	51
Galanthamin	1,82 \pm 0,40	43,3 \pm 1,3	65
N-Allylnorgalanthamin	0,18 \pm 0,01	NT	65
N-(14-Methylallyl) norgalanthamin	0,16 \pm 0,01	NT	65
O-Methylleukotamin	6,13 ^a	aktivní	43

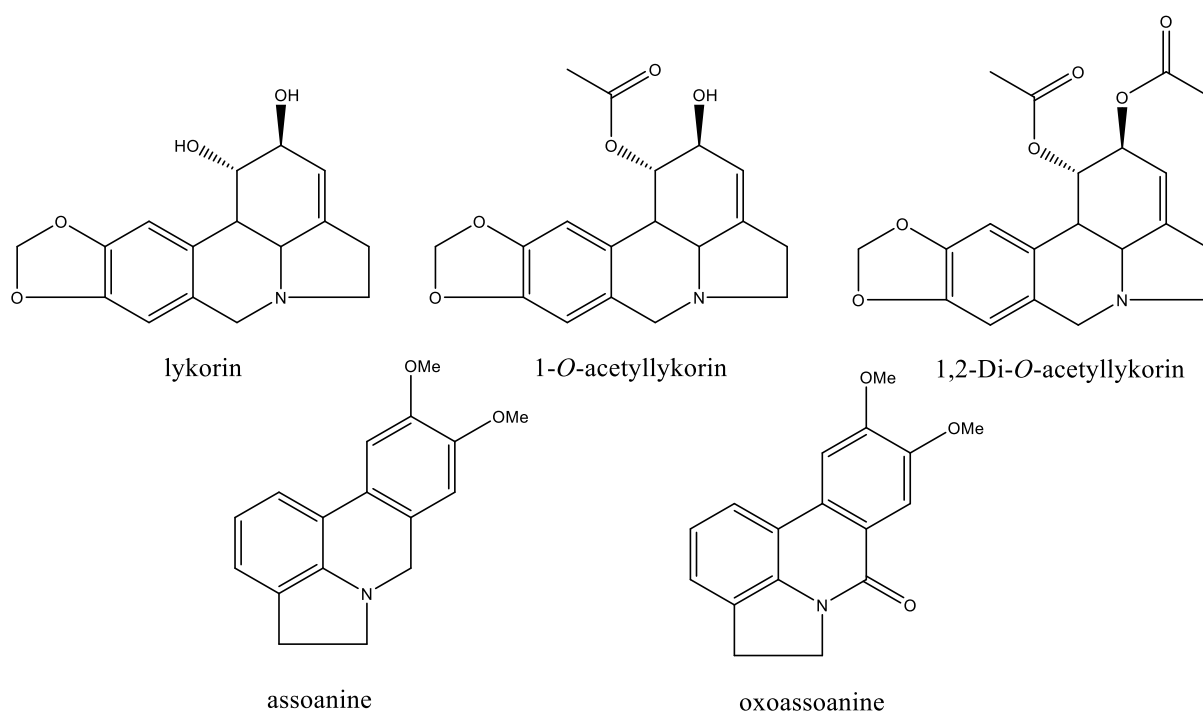
^a jednotky (μ g/ml), NT - nebylo testováno

Galantamin a některé jeho deriváty mají navíc antioxidační vlastnosti, které jsou spojovány s přítomností enolové skupiny a kvartérního dusíku. Po transformaci enolové skupiny za vzniku karbonylu, antioxidační aktivita molekuly zaniká. Přítomnost kvartérního dusíku není zapotřebí k vychytávání radikálů, ale je zodpovědná za zvýšení antioxidačního efektu (42).

3.3.1.5 Lykorinový strukturní typ

Dalším potenciálně zajímavým strukturním typem amarylkovitých alkaloidů je typ lykorinový. Jeho zástupci mají obecně slabší inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám než látky galanthaminového typu (66). Hlavní reprezentant lykorin nevykazuje biologickou aktivitu (Tab. 4) vzhledem k AChE. Je snadno dostupný z přírodních zdrojů a doposud byl izolován z celé řady rodů *Narcissus* (21), *Lycoris* (35), *Zephyrantes* (46), *Chlidanthus* (66) a dalších. Studováním vztahů mezi strukturou a inhibičním účinkem vůči AChE a poměrně vysoký přirozený výskyt lykorinu je silným podnětem pro přípravu jeho polosyntetických derivátů jako potenciálních selektivních inhibitorů AChE. Z analýzy výsledků bylo zjištěno, že aktivita těchto látek je spojována se substitucí v polohách C1 a C2. Zavedením lipofilních substituentů do molekuly dochází ke zvýšení inhibiční aktivity, přičemž je nezbytné zachovat neporušené pyrrolo-fenanthridinové jádro molekuly (63). Acylací molekuly v poloze C1 dochází k výraznému zvýšení inhibiční aktivity. To je dáno energeticky výhodnou konformací molekuly k vazebnému místu AChE, která vzniká přítomností intramolekulárních vodíkových

vazeb (63). Doposud asi nejvýraznější látkou se silnou inhibiční aktivitou je 1-*O*-acetyllykorin ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,05 \mu M$). Dalším testováním inhibiční aktivity vůči AChE bylo zjištěno, že původ enzymu má v některých případech vliv na hodnoty inhibičních aktivit. (60). Látky lykorinového strukturního typu s acylací v poloze 2 či 1,2-diacetylderiváty (Tab. 4) ztrácí inhibiční aktivitu. Dalšími přirozeně se vyskytujícími alkaloidy s inhibiční aktivitou jsou assoanine a oxoassoanine (Tab. 4). Tyto alkaloidy byly izolovány z rostliny *Narcissus assoanus* a jejich inhibiční účinek je vysvětlován planárním uspořádáním kruhu C v molekule (51). Z těchto poznatků lze vyvodit základní strukturní předpoklady těchto látek, které souvisejí s inhibiční aktivitou vůči AChE: pyrrolo-fenanthridinové jádro, aromatický C-kruh a substituce na uhlíku C1. Některé ze zmíněných látek jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 9).



Obrázek 9 Alkaloidy lykorinového strukturního typu.

Tabulka 4 Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů lykorinového typu čeledi Amaryllidaceae vůči AChE.

Alkaloid	IC₅₀ AChE (μM)	Literatura
Lykorin	> 500	51
1-O-Acetyllykorin	0,45 ± 0,05	60
1,2-Di-O-Acetyllykorin	169 ± 10	62
Assoanin	3,87 ± 0,24	51
Oxoassoanin	47,21 ± 1,13	51

3.3.2 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich potenciální využití v terapii nádorových onemocnění

V současné době patří onkologická onemocnění mezi jednu z hlavních příčin úmrtí na světě. Zásadní úlohu v rozvoji maligního procesu hrají tumor supresorové geny. Protein p53 je jedním z nich a má několik zásadních funkcí. Stimuluje transkripci proapoptotických molekul, reguluje expresi genů účastnících se na zástavě buněčného cyklu. Dále se podílí na reparaci poškozené DNA a buněčné smrti. Tento protein je nejčastější a vysoce exprimovaný defektní gen nalezený u onkologických onemocnění v lidském těle (je přítomen ve více než 50 % nádorů) (61). Jeho mutace nebo ztráta alely hraje významnou roli ve vývoji a progresi malignit (67). Byla nalezena například u nádorů plic, tlustého střeva, prsu, jater, mozku. Dále bylo zjištěno, že defekt tohoto proteinu také pravděpodobně souvisí s rezistencí nádorů k léčbě (68).

V posledních desetiletích byl zaznamenán velký pokrok v pochopení nádorových onemocnění, respektive mechanismů nezbytných k jejich léčbě. Nicméně v některých případech se může rozvinout rezistence i k chemoterapeutikům s odlišným mechanismem účinku. Rezistentní nádorové buňky se tak nekontrolovatelně dělí a přispívají tím k šíření metastáz do ostatních orgánů (69). Mezi buněčné mechanismy zodpovědné za rezistenci k terapii lze zařadit například up regulaci detekce poškozené DNA (70), indukci zastavení buněčného cyklu umožňujícího opravu poškozené DNA (71) a poruchu buněčné signalizace při apoptóze (72). V současné době je proto zjevná potřeba nalezení nových sloučenin s cytotoxickým účinkem a také těch, které by byly schopné rozpoznat rezistentní nádorové buňky, aniž by poškozovaly buňky zdravé (61).

Za účelem nalézt látky s vhodnými antineoplastickými vlastnostmi byly prozkoumány různé přírodní zdroje. V posledních letech byl rozpoznán významný potenciál přírodních látek používaných v protinádorové léčbě. Mají méně vedlejších účinků, zvyšují chemosenzitivitu a nevedou k lékové rezistenci, čímž se stávají nadějným zdrojem pro léčbu rakoviny (73). Důkazem je fakt, že více než 60 % klinicky využívaných protinádorových léčiv pochází z přírodních zdrojů z celého světa (74). Při hledání sloučenin s antineoplastickými vlastnostmi byly také studovány rostliny čeledi Amaryllidaceae, které se vyznačují protinádorovou aktivitou (68). Testováním Amaryllidaceae alkaloidů bylo zjištěno, že jsou selektivní k nádorovým buňkám a poměrně málo toxické k zdravým a klidovým buňkám (61). Na základě dosavadních dat z provedených studií lze konstatovat, že látky s cytotoxickými vlastnostmi se nejčastěji vyskytují v následujících strukturních typech, a to v lykorinovém, pankratistatinovém a haemanthaminovém (32).

U těchto látek bylo doposud provedeno mnoho screeningových studií s využitím různých nádorových buněčných linií. U některých byl podrobně zkoumán i jejich mechanismus účinku. Výzkumy z roku 1970 se zabývaly interakcemi amaryllkovitých alkaloidů s eukaryotními ribozomy. Ze sloučenin, které se byly schopné na tomto procesu podílet, lze uvést lykorin, pseudolykorin a haemathamin (13). Další studie dokládají, že narciklasin zasahoval do mitotického aparátu a působil tak výrazným antimitotickým účinkem zejména v metafázi a profázi (13). Jako další mechanismus účinku je možné zmínit inhibici topoizomeras. Například ungeremin a narciprimin vykazují vůči tomuto enzymu silné inhibiční účinky (13). Nejvýznamnějším mechanismem protinádorové aktivity je aktivace kaskády proapoptotických látek vedoucí k apoptóze buňky. Mezi zástupce, které mají tuto schopnost, lze zahrnout například lykorin, pankratistatin, narciklasin, haemathamin a haemathidin (13).

3.3.2.1 Lykorinový strukturní typ

Lykorinový strukturní typ zahrnuje téměř 200 strukturně odlišných amaryllkovitých alkaloidů, které mají různé biologické vlastnosti (75). Z hlediska struktury je pro tento typ typická přítomnost fenantridinového jádra a ethylového řetězce, který spojuje uhlíkový atom C4 a atomu dusíku vytvářející spolu 1,2,3- trisubstituovaný pyrrolový D-kruh (75). První izolovaný Amaryllidaceae alkaloid lykorin je považován za nejběžněji se vyskytující

sloučeninu této čeledi (75). Nejčastěji je izolován z rostliny *Lycoris radiata* (76) a disponuje celou řadou biologických účinků. Lykorin má schopnost inhibovat biosyntézu kyseliny askorbové u rostlin (13), u poliovirů bylo zjištěno jeho antivirové působení (77). Dále byla zaznamenána antimykotická aktivita vůči *Saccharomyces cerevisiae* (13) a také má *in vitro* významný vliv na antiplasmodiální aktivitu u kmenů *Plasmodium falciparum* s hodnotou IC_{50} 0,7 $\mu\text{g/ml}$ (7). Nicméně za nejvýznamnější účinek je širokou vědeckou komunitou považována jeho protinádorová aktivita, která byla u něho poprvé popsána v roce 1920 (78).

Pro posouzení protinádorové aktivity lykorinu byl proveden nespočet studií na různých nádorových buněčných liniích. V rámci jeho testování byly účinky pozorovány *in vitro* na promyelocytické leukemické buněčné linii HL-60, kdy byla prokázána protinádorová aktivita lykorinu v rozmezí od 0,31 do 5 μM (58). Dále bylo zjištěno, že je schopen zastavit buněčný cyklus ve fázi G2/M při koncentraci 5 μM . Při stejné koncentraci má schopnost indukovat apoptózu leukemických buněk HL-60 prostřednictvím aktivace kaspasy-8, kaspasy-9 a kaspasy-3, přičemž aktivizace kaspasy-3 byla nejvýrazněji zvýšená (79). Další *in vitro* studie prokázala, že lykorin při koncentraci 5 μM je schopen zastavit buněčný cyklus v G0/G1 fázi u buněk chronické myelogenní leukémie K562 (80). Kromě toho je lykorin pravděpodobně schopen indukovat apoptózu prostřednictvím inhibice translace proteinu Mcl-1 (myeloidní buněčná leukémie-1) u U937 a 6T-CEM leukemických buněčných linií při koncentracích vyšších než 10 μM (80). Mcl-1 je členem rodiny proteinů Bcl-2 a bylo prokázáno, že je vysoce exprimován v různých typech nádorů, včetně určitých forem leukémie. Mcl-1 hraje hlavní roli při potlačování apoptózy u různých typů rakovinných buněk (81). Pozdější studie provedená na buňkách lidského mnohočetného myelomu ARH-77 byla zaměřena na účinky lykorinu při koncentracích 10 μM . Výsledkem byla kumulace buněk ARH-77 v G1 fázi buněčného cyklu, čímž se prokázalo snížení proliferace cytostatickým mechanismem (58).

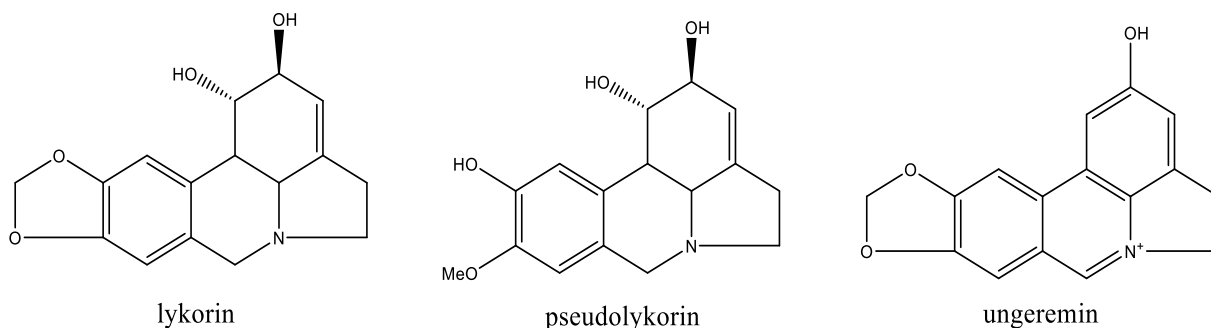
Lykorin byl dále *in vitro* testován v rozmezí IC_{50} od 5 do 10 μM na různých buněčných liniích rakoviny prostaty (PC-3M, DU145, LNCaP a 22RV1). U testovaných buněk došlo k jejich inhibici proliferace a migrace (82). Výsledky z *in vitro* studie dokládají, že lykorin vykazoval nejsilnější cytotoxické účinky ke všem exponovaným buňkám oproti ostatním testovaným látkám. (Jurkat, HT-29, HL-60, SW 480, PANC-1, BT-549, MDA-MB-231,

SK-BR-3, H1299, MOLT- 4, A549, COLO-201, AGS, MCF-7, HeLa, A2780). Jeho rozsah IC_{50} hodnot byl 0,7 - 1,4 μ M (68) (Tab. 5,6).

Dále bylo zjištěno, že lykorin působí proti nemalobuněčnému plicnímu karcinomu zastavením buněčného cyklu v G0/G1, což výrazně iniciuje počáteční fázi apoptózy a mitochondriální dysfunkci. Navíc je možné, že by mohl vyvolávat apoptózu mitochondriální cestou a inhibovat buněčnou signalizaci molekul Wnt/ β -katenin. Aktivace buněčné signalizace Wnt/ β -katenin je zásadní pro výskyt a vývoj rakoviny (83). β -Katenin je důležitým mediátorem signalizační kaskády Wnt/ β -katenin a jeho množství v cytoplazmě a v jádře hraje hlavní roli v její regulaci (84). Při podávání dávek lykorinu v rozmezí 10, 20, 30 μ M bylo zjištěno, že celkové množství β -kateninu (cytoplazmatické i jaderné) bylo sníženo, zatímco exprese GSK-3 β byla zvýšena. Hodnoty změn byly závislé na dávce a při 30 μ M lykorinu docházelo k nejvýraznějšímu snížení β -kateninu a zvýšení GSK-3 β (74).

Vzhledem k širokému výčtu protinádorového působení lykorinu, mezi vědci vzbudily zájem i jeho polosyntetické deriváty, u kterých se předpokládá také potenciální protinádorová aktivita. V rámci jedné *in vitro* studie bylo prokázáno, že hydrochloridová sůl lykorinu selektivně potlačuje proliferaci nádorových buněk vaječníků Hey1B s hodnotou IC_{50} 1,2 \pm 0,1 μ M. Tento účinek je způsoben jeho schopností zabránit expresi cyklin D3 a zvýšit expresi buněčného inhibitoru p21 (85).

Z dalších zástupců lykorinových alkaloidů, které disponují cytotoxickou aktivitou můžeme uvést 1-*O*-acetylykorin 5,6-dehydrolykorin, pseudolykorin, ungeremin a amarbellisin. Pseudolykorin, derivát lykorinu, ovlivňuje inhibici buněčného růstu leukemických linií a prodlužuje život myši infikovaných virem Rauscher ve srovnání se standardně používanými léky, jako je vinkristin (58). Další alkaloid lykorinového typu ungeremin selektivně inhibuje formu topoizomerasy II β (86) (Obr. 10).



Obrázek 10 Alkaloidy lykorinového strukturního typu s cytotoxickou aktivitou.

3.3.2.2 Pankratistatinový strukturní typ

Dalším strukturním typem, který vykazuje zajímavé protinádorové účinky, lze uvést typ pankratistatinový. Mezi reprezentativní sloučeniny, které mají silné inhibiční účinky proti mnoha nádorovým buněčným liniím, patří narciklasin a pankratistatin. V literatuře jsou někdy označovány jako isokarbostyrylové deriváty lykorinu (87).

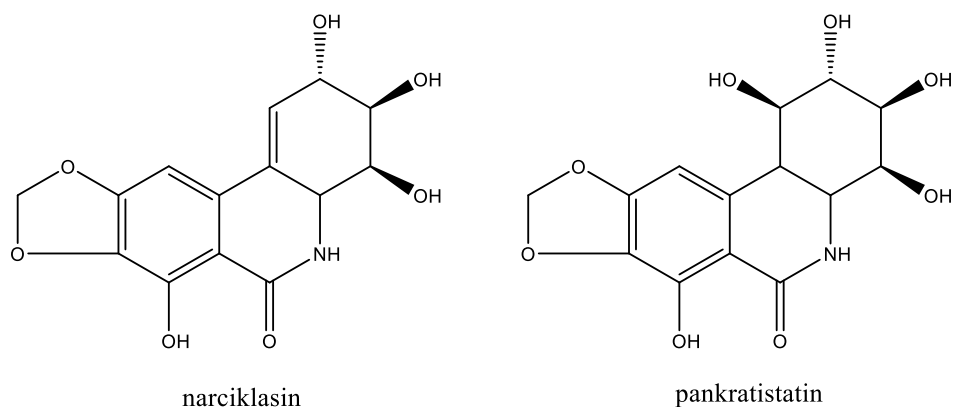
Narciklasin byl poprvé izolován z cibulí rodu *Narcissus* v roce 1967. Brzy poté u něho byly popsány antimitotické vlastnosti, které se projevovaly inhibičními účinky od klíčení semen až po vlastní růst rostlin, neboť ovlivňuje buněčné dělení v metafázi (88). O několik let později další studie prokázaly, že narciklasin inhibuje syntézu ribosomálních proteinů pomocí interakce s ribosomální podjednotkou 60S, čímž blokuje činnost peptidyltransferasy podílející se na vzniku peptidové vazby. Na základě analýzy dat bylo popsáno, že pravděpodobně zasahuje do syntézy DNA (87). Jeho cytotoxická aktivita byla hodnocena na 60 nádorových buněčných liniích a výsledek průměrné hodnoty IC_{50} byl $0,046 \mu M$ (78). Data v literatuře uvádějí, že narciklasin je schopen v koncentracích vyšších než $1 \mu M$ snížit proliferaci a migraci nádorových buněk (78).

V nedávné době bylo prokázáno, že narciklasin indukuje apoptózu na různých liniích nádorových buněk a vykazuje pouze malý cytotoxický účinek na buňky zdravé a klidové. V posledních letech byl testován na lidských nádorových buněčných liniích A549, MCF-7, PC-3, LoVo, U373 a BxPC3 (Tab. 5) po dobu 72 hodin a jeho průměrná hodnota IC_{50} činila $30 \mu M$. Dále byla jeho cytotoxicita prokázána narušením membránového potenciálu mitochondrií během 18 hodinové inkubace s buňkami lidského karcinomu prostaty PC-3 a s buňkami adenokarcinomu prsu (MDA-MB-231 a MCF-7), přičemž k lidským buňkám fibroblastů CCD25Lu byl prakticky neúčinný (87). Poměrně nedávno byly také popsány jeho silné cytotoxické účinky na buněčných liniích HL-60 ($IC_{50} 0,018 \mu M$) a HSC-2 ($IC_{50} 0,05 \mu M$), které byly způsobeny fragmentací DNA, smrštěním buněk a aktivací kaspasy-3 (78) (Tab. 5).

Při testování narciklasinu bylo zjištěno, že při koncentraci $1 \mu M$ *in vitro* a koncentraci 10 mg/kg *in vivo* má značnou proapoptotickou a cytotoxickou aktivitu, stejně jako pankratistatin. Při podávání ve fyziologických dávkách působil cytostaticky, nikoli cytotoxicky. V experimentálních modelech *in vivo* na nádorových buňkách mozku měl

výrazné protinádorové účinky. Byly způsobené poškozením struktury aktinového cytoskeletu buněk, bez projevení vedlejších toxických účinků. Chronickým podáváním narciklasinu v dávkách 1 mg/kg došlo k významnému zvýšení počtu imunodeficientních myši s vysoce invazivním lidským glioblastomem a mozgovými metastázami rezistentních na apoptózu. Tímto se narciklasin projevil jako potenciálně slibná molekula pro léčbu primárních nádorů mozku a různých mozkových metastáz (87).

Pankratistatin, blízký strukturní analog narciklasinu, byl izolován z *Hymenocallis littoralis* v roce 1984 (89) a ukázalo se, že má také potenciální antineoplastické účinky. V roce 2004 byla jeho schopnost vyvolat apoptózu potvrzena na lidských leukemických buňkách Jurkat. Pankratistatin při koncentraci 1 μM vykazoval na tyto buňky cytotoxický účinek způsobený aktivací kaspasy-3 bez vlivu na zdravé lymfocyty (90). Dále bylo potvrzeno na buňkách lidského neuroblastomu SHSY-5Y, že pankratistatin o stejných koncentracích (1 μM) vyvolal zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku a snížil koncentraci ATP v buňkách (89). Kromě toho také zvyšuje propustnost mitochondriální membrány, která vede k uvolňování aktivátorů kaspas a ke ztrátě své funkce (87). Tento apoptotický mechanismus byl také pozorován u androgen-senzitivních lidských buněk karcinomu prostaty LNCaP (89) a buněk adenokarcinomu prsu MCF-7 (IC_{50} 100 μM). Léčba pankratistatinem při koncentraci 0,5 μM v kombinaci s anti-estrogenním přípravkem Tamoxifenem vykazovala synergický účinek proti MCF-7 po 72 hodinách (91). Dále byly testovány buňky hepatocelulárního karcinomu potkana 5123t, kdy během 48 hodinové expozice pankratistatinem o koncentraci 1 μM došlo k jejich apoptóze. Pankratistatin nezpůsobil žádné vedlejší účinky u buněk lidských fibroblastů při cytotoxickém působení na buňky kožního nádoru a teratokarcinomu NT2 (90). V rámci další studie bylo prokázáno, že pankratistatin je schopen snížit membránový potenciál mitochondrií u nádorových buněk kolorektálního karcinomu HT-29 a HCT116 bez narušení funkce zdravých fibroblastů CCD-18Co (92). Nicméně nevýhodou této látky je, že se v rostlinách vyskytuje pouze v malém množství, což je z pohledu jejího dalšího detailního biologického testování značná nevýhoda. Možným řešením této skutečnosti je jeho syntetická příprava, která již byla popsána a umožňuje syntézu této látky.



Obrázek 11 Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu s cytotoxickou aktivitou.

Tabulka 5 Cytotoxická aktivita IC_{50} (μM) vybraných alkaloidů prokázaná na odlišných liniích nádorových buněk.

Buněčné linie	Lykorin IC_{50} (μM)	Haemanthamin IC_{50} (μM)	Narciklasin IC_{50} (μM)	Pankratistatin IC_{50} (μM)	Literatura
HL-60	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,018	0,2	68, 78, 93
Jurkat	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,3		1,0	68, 90
U373	7,6 ± 0,2	3,5 ^a	aktivní		34, 75, 87
A549	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	aktivní		68, 87
HT-29	0,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1		aktivní	68, 92
HSC-2	5,1 ± 0,1		0,05 ± 1,50	1,1 ± 0,1	75, 78, 93

^ajednotka ($\mu\text{g/ml}$)

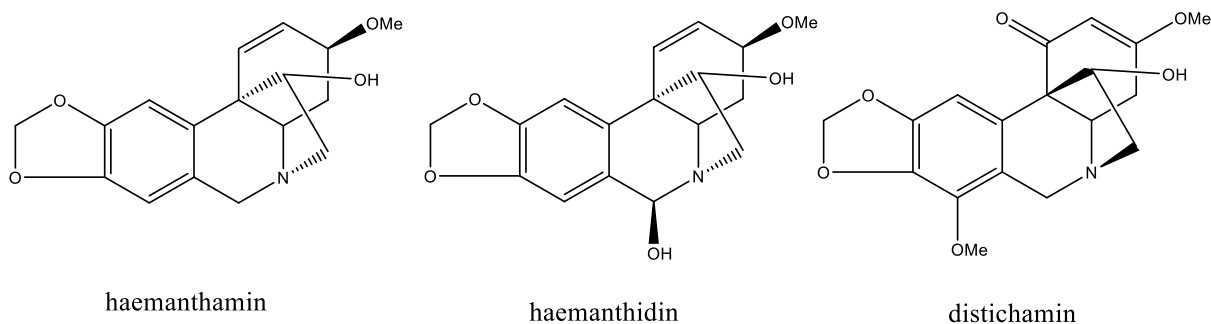
3.3.2.3 Haemanthaminový strukturní typ

Dalším strukturním typem, který má zajímavé účinky z pohledu protinádorové aktivity, je haemanthaminový typ, v literatuře někdy též označovaný jako β -krininový. Strukturní typy haemanthaminový a krininový se liší pouze prostorovým uspořádáním 5,10*b*-ethanolového můstku, a právě jeho orientace je považována za významný strukturní požadavek antiproliferativního působení molekul (68). Výjimku tvoří alkaloid distichamin, který strukturou odpovídá α -krininovému typu a disponuje také protinádorovou aktivitou (94).

Haemanthamin je považován za druhý nejrozšířenější amarylkovitý alkaloid. Nejprve byl izolován z rostlin rodu *Haemanthus* a poté z dalších rodů čeledi Amaryllidaceae, například

Crinum, *Narcissus*, *Hymenocallis* a *Zephyranthes*. Jeho struktura byla určena v roce 1960 (95). V rostlinách je enzymatickým způsobem ireverzibilně přeměňován na haemanthidin. U haemanthaminu bylo zjištěno, že *in vitro* vykazuje silné cytotoxické účinky proti několika různým typům nádorových buněčných linií, včetně MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, G-36, U373, SKMEL, OE24, A2780, SW1573 a T47-D (96) (Tab. 5,6). Testováním haemanthaminu v koncentračním rozmezí od 5 do 20 μM na buňkách akutní lymfoblastické leukemie Jurkat bylo zjištěno, že dochází k jejich zvýšené apoptóze. Ta byla navíc doprovázena aktivací kaspasy-3, kaspasy-7, kaspasy-8 a kaspasy-9, snížením membránového potenciálu mitochondrií a zastavením buněčného cyklus v G1 a G2/M fázi. Na základě experimentálního hodnocení se předpokládá, že inhibice proteosyntézy probíhá pomocí interakce s ribozomální podjednotkou 60S, čímž dochází k blokaci peptidyltransferasy a následně k inhibici tvorby peptidové vazby (32). V rámci studie, ve které byly použity buněčné linie multirezistentního myšího lymfomu L5178, byla prokázána schopnost haemanthaminu tvořit komplex s RNA buněk L5178, což má za následek silné inhibiční účinky na jejich růst (96).

Výskyt distichaminu je mezi amarylkovitými alkaloidy poměrně vzácný. Literatura uvádí, že se nachází pouze v jedné rostlině *Boophone disticha* (94). Tato sloučenina se vyznačuje také neobyčejnou strukturou, protože ve své molekule obsahuje jak vinylový methoxyl, tak i α , β -nenasycený ketonový kruh C. O distichaminu je známo, že významně ovlivňuje přenašeč serotoninu (78). V posledních letech bylo několik studií zaměřeno na jeho možnou protinádorovou aktivitu. Výsledky *in vitro* studií prokázaly, že distichamin působí proti různým lidským buněčným liniím, například HeLa, CEM, K562, MCF-7 a G-361 (IC_{50} 2,2 až 14,7 μM), přičemž nejcitlivější na expozici distichaminu byly buňky HeLa a nejnižší aktivitu vykazoval k buněčné linii G-361 (Tab. 6). Dalším testováním bylo zjištěno, že distichamin má také schopnost narušit fáze buněčného cyklu a vyvolat apoptózu v lidských leukemických buňkách CEM aktivací kaspas-3 a kaspasy-7 (78).



Obrázek 12 Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu s význačnou cytotoxickou aktivitou.

Tabulka 6 Hodnoty inhibičních aktivit vybraných Amaryllidaceae alkaloidů protirůzným liniím nádorových buněk.

Buněčná linie	Lykorin IC ₅₀ (μM)	Distichamin IC ₅₀ (μM)	Haemanthamin IC ₅₀ (μM)	Literatura
G-361	5,0 ± 0,3	14,7 ± 0,1	3,7 ± 0,4	78
K562	3,6 ± 1,2	4,1 ± 0,9	3,4 ± 1,6	78
CEM	1,6 ± 0,0	4,5 ± 1,6	2,1 ± 0,4	78
MCF-7	0,8 ± 0,5	2,3 ± 0,8	0,8 ± 0,1	78
HeLa	0,9 ± 0,3	2,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	68, 78

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie pro izolaci alkaloidů

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

- Aceton p. a. (Me_2CO) (Penta)
- Amoniak p. a. (NH_3) (Penta)
- Chloroform p. a. (CHCl_3) (Penta)
- Cyklohexan p. a. (CH_x) (Penta)
- Diethylamin p. a. (Et_2NH) (Penta)
- Diethylether p. a. (Et_2O) (Penta)
- Destilovaná voda (H_2O)
- Ethanol 95 %, denaturovaný methanolem, p. a. (EtOH) (Penta)
- Ethylacetát p. a. (EtOAc) (Penta)
- Lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (LB) (Penta)
- Toluén p. a. (To) (Penta a.s.)

4.1.2 Mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii

- S_1 - To: Et_2NH (9:1)
- S_2 - To: EtOAc : Et_2NH (15:75:10)
- S_3 - CH_x : Me_2CO : NH_3 (30:60:1)

4.1.3 Chromatografické adsorbenty

- Oxid hlinitý (Al_2O_3), deaktivovaný 6 % vody, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS)
- SiO_2 F 254
- Lité skleněné desky 15 × 15 cm, Kiesegel 60 GF 254
- Komerční desky o rozměrech 20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm, Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck)

4.1.4 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich).
- Filtrační papír
- Vata

4.1.5 Přístroje

- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Germany)
- Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi Labortechnik AG, Switzerland)
- Vakuová odparka Laborota 4001 – efficient, Heidolph, Germany
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD (Agilent Technologies Santa Clara, USA)

4.1.6 Činidla použitá na detekci alkaloidů

- Dragendorffovo činidlo (podle Muniera)
- Mayerovo činidlo

4.1.7 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master byly získány od firmy Lukon Glands (Sadská, Česká republika). Verifikace provedena Prof. RNDr. L. Opletalem, Csc. Dokladové vzorky jsou uloženy v herbáři Katedry farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

4.2 Metody

4.2.1 Všeobecné postupy

4.2.1.1 Příprava rozpouštědel

Veškerá použitá rozpouštědla byla přečištěna destilací. Destilační předek (cca 5 %) byl z důvodu možného znečištění vodou zachycen a odstraněn. Zbylá část rozpouštědla byla predestilována a následně uchovávána v hnědých skleněných lahvích chráněných před světlem.

4.2.1.2 Odpařování rozpouštědel z extraktů

Veškeré extrakty, získané frakce a roztoky byly odpařeny na vakuové odparce s vodní lázní o teplotě 40 °C za sníženého tlaku nebo odpařeny na vodní lázni o teplotě 80 °C proudem vzduchu. Získané frakce a čisté látky byly dosušeny v exikátoru nad vrstvou silikagelu za sníženého tlaku minimálně 24 hodin.

4.2.1.3 Sloupcová chromatografie

Chromatografická kolona byla připravena nalitím suspenze adsorbentu v mobilní fázi. Rostlinný extrakt byl nanesen do kolony v podobě roztěru, připraven rozpuštěním vzorku v malém množství rozpouštědla, s adsorbentem v poměru 1:5 a samotný separační proces probíhal formou stupňovité eluce.

4.2.1.4 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Pro preparativní tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity skleněné desky o rozměrech 15 x 15 cm. Jejich povrch byl očištěn chloroformem a následně byla rovnoměrně nalita suspenze (6,5 g silikagelu a 20,5 ml vody). Takto připravené desky byly poté sušeny při laboratorní teplotě alespoň 24 hodin.

4.2.1.5 Preparativní TLC

Alkaloidní extrakt byl rozpuštěn v CHCl_3 a EtOH (1:1) a v úzké lince rovnoměrně nanesen na TLC desky. Po odpaření rozpouštědla byly desky vyvíjeny v chromatografických komorách za použití vhodné mobilní fáze.

4.2.1.6 Detekce alkaloidů na TLC deskách,

Přítomnost alkaloidů byla detekována pod UV lampou při vlnových délkách 254 nm a 366 nm s následným postřikem Dragendorffovým činidlem a UV-detekcí. Přítomnost alkaloidů se projevila vznikem intenzivně oranžového zbarvení.

4.3 Izolace alkaloidů z extraktu rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master

Příprava a sloupcová chromatografie sumárního alkaloidního extraktu byla provedena v rámci doktorského studia Mgr. Danielou Hulcovou. Zde uvádím stručný popis přípravy a zpracování alkaloidního extraktu.

Celkem bylo zpracováno 27,2 kg čerstvých cibulí rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, které byly rozemlety a po dobu 30-ti minutového varu důkladně extrahovány (500 g 2x 2 l EtOH 96%) pod zpětným chladičem. Jednotlivé ethanolové extrakty byly nejprve zfiltrvány, slity a nashromážděný extrakt byl následně odpařen na vakuové odparce. Vzniklý odparek o hmotnosti 450 g byl převeden do 2% HCl o objemu 1 l (pH 1-2) a doplněn destilovanou vodou na objem 5 l. Získaná suspenze byla dále filtrována přes křemelinu a poté následovalo přečištění alkaloidů pomocí vytřepání do organického rozpouštědla.

Alkaloidní roztok byl nejprve vytřepáván Et₂O (3x 1,5 l). Pro zalkalizování vodného roztoku na pH 9-10 byl použit 10% Na₂CO₃ a roztok byl extrahován do EtOAc (3x 1,5 l). Bylo získáno 95 g sumárního alkaloidního extraktu, který byl zahuštěn na vakuové odparce. Dále následovalo jeho rozpuštění v 500 ml 2% HCl, vytřepání Et₂O (3x 300 ml), zalkalizování kyselého roztoku pomocí 10% Na₂CO₃ na pH 9-10 a extrakce do Et₂O (4x 350 ml).

Ve vodné fázi byl obsah zbylých alkaloidů detekován za pomoci Mayerova činidla prokazatelnou pozitivní reakcí, a tudíž byla vodná fáze dále vytřepávána CHCl₃ (4x 350 ml). Et₂O i CHCl₃ výtřepky byly spojeny a celkem bylo získáno 58,52 g alkaloidního extraktu.

4.3.1 Sloupcová chromatografie

Parametry kolony:

- Průměr: 7,1 cm
- Stacionární fáze: 2 500 g Al₂O₃ deaktivovaný 6 % H₂O, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS)
- Mrtvý objem: 2300 ml
- Frakce: 250 ml

Alkaloidní extrakt byl dále separován pomocí gradientové sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs CHCl₃:LB v 10- ti různých poměrech se stoupající

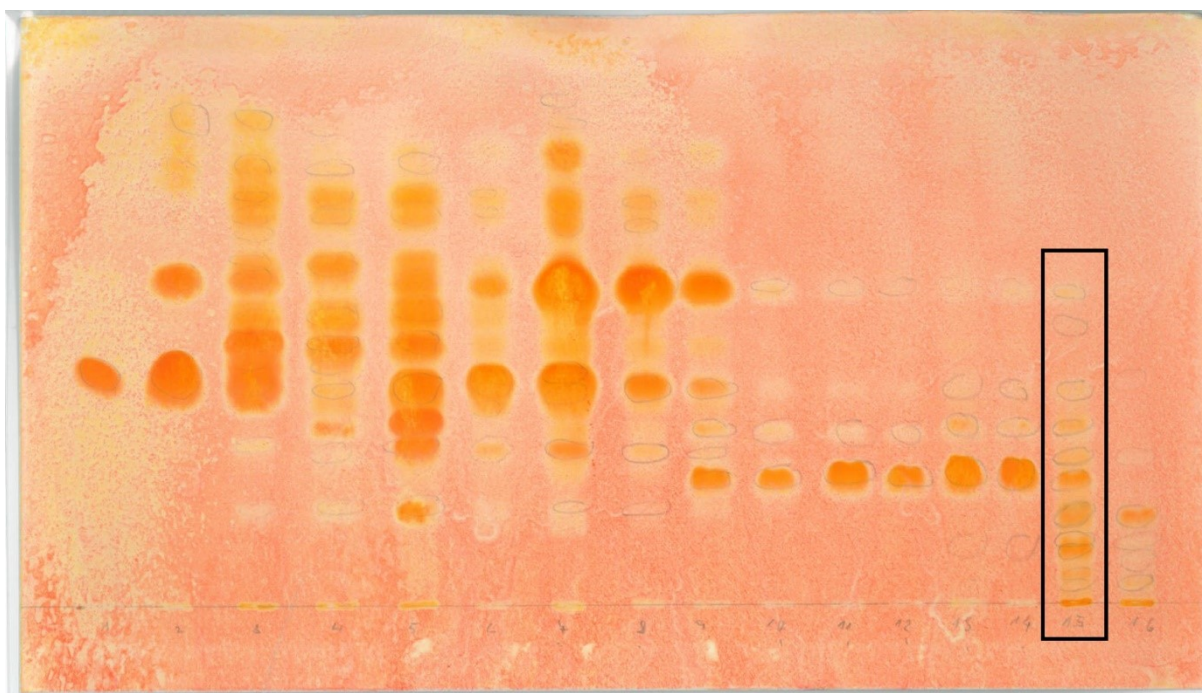
polaritou (3:7, 2:3, 1:1, 11:9, 3:2, 13:7, 3:1, 4:1, 17:3, 9:1), CHCl₃ a CHCl₃ s EtOH (1:1). Během chromatografie byla mobilní fáze konstantně přiváděna na kolonu. Jednotlivé frakce byly testovány na přítomnost alkaloidů pomocí TLC s následným postříkem Dragendorffovým činidlem. Celkem bylo odebráno 301 frakcí, alkaloidy se stejnými retenčními faktory byly sloučeny a celkově bylo získáno 16 frakcí.

Přehled jednotlivých alkaloidních frakcí, jejich mobilních fází a hmotností získaných ze sloupcové chromatografie je uveden v následující tabulce (Tab. 7).

Tabulka 7 Získané alkaloidní frakce ze sloupcové chromatografie.

Frakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Výtěžek (g)
ND 1	46-51	LB: CHCl ₃ (60:40)	0,40
ND 2	51-57	LB: CHCl ₃ (50:50)	1,11
ND 3	58-82	LB: CHCl ₃ (50:50)	9,38
ND 4	83-94	LB: CHCl ₃ (50:50)	2,48
ND 5	95-138	LB: CHCl ₃ (45:55)	7,84
ND 6	139-165	LB: CHCl ₃ (45:55)	3,21
ND 7	166-194	LB: CHCl ₃ (45:55)	4,82
ND 9	195-206	LB: CHCl ₃ (60:40)	1,10
ND 11	207-289	LB: CHCl ₃ (65:35)	14,93
ND 15	290-292	LB: CHCl ₃ (75:25), (80:20), (85:15), (90:10), CHCl ₃ (100)	7,24
ND 16	293-301	CHCl ₃ : EtOH (1:1)	1,68
Celkem			54,23

Souhrnná TLC byla zhotovena po odpaření rozpouštědel a vyvíjena v soustavě S₁. Souhrnný obrázek kontrolní TLC spojených frakcí vizuálně znázorňuje zpracování alkaloidního extraktu (Obr. 13). V rámci předložené diplomové práce byla zpracovávána frakce ND 15-9.



Obrázek 13 Souhrnná TLC 16 spojených frakcí z alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master se zvýrazněnou frakcí č. 15 (Adsorbent SiO₂ F 254, mobilní fáze S₁, počet vyvíjení 1x, dráha 8,5 cm, detekce Dragendorffovým činidlem).

4.3.2 Zpracování frakce ND 15

Chromatografie s následujícími parametry:

- Adsorbent: 6,5 g Al₂O₃ deaktivovaný 6 % H₂O, velikost zrn 40-200 μm (ACROSS)
- Průměr kolony: 5,8 cm
- Mrtvý objem: 1360 ml
- Objem frakce: 400ml

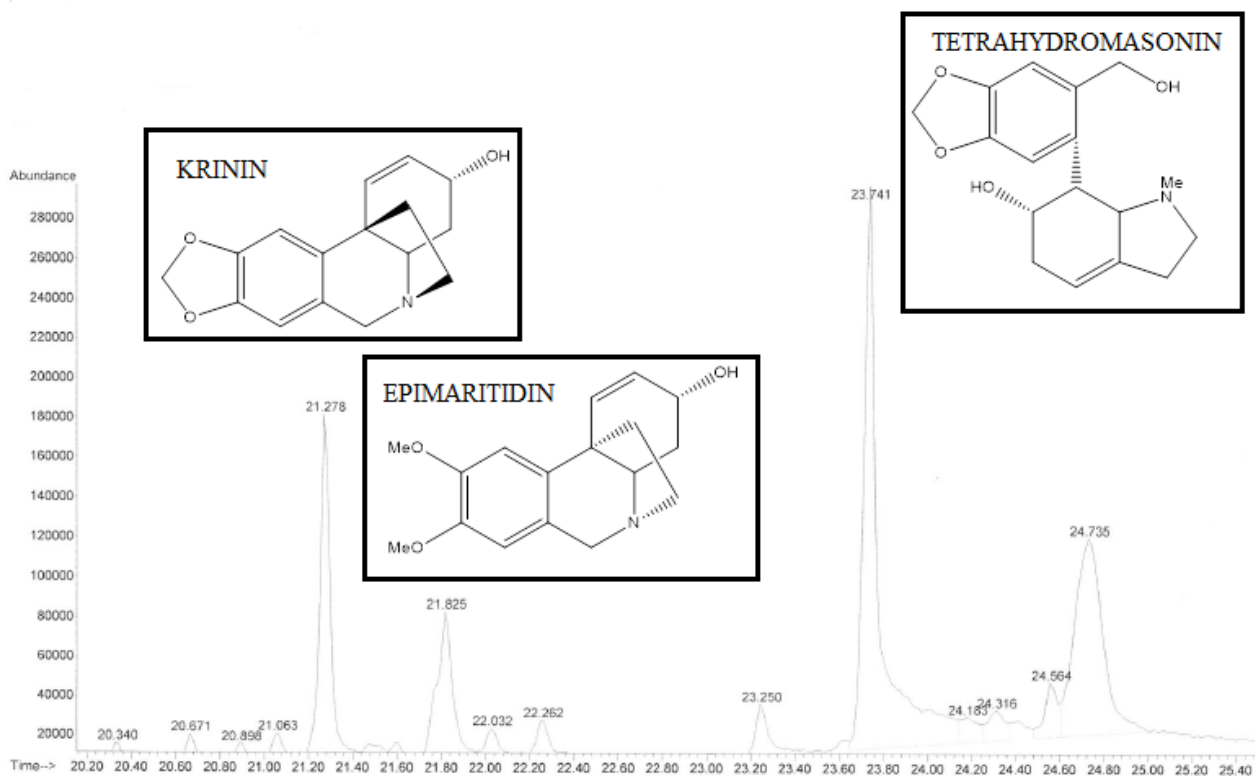
V následující tabulce je shrnuto 10 nově vzniklých podfrakcí, použité mobilní fáze a výtěžky jednotlivých frakcí připravených k izolaci alkaloidů (Tab. 8).

Tabulka 8 Přehled nově vzniklých frakcí během sloupcové chromatografie.

Název podfrakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Hmotnost frakcí (g)
ND 15-1	4-7	CHCl ₃ : EtOH (97:3)	0,0942
ND 15-2	8-12	CHCl ₃ : EtOH (97:3)	0,1840
ND 15-3	13-16	CHCl ₃ : EtOH (97:3)	0,5247
ND 15-4	17-39	CHCl ₃ : EtOH (97:3)	1,3144
ND 15-5	40-47	CHCl ₃ : EtOH (19:1)	0,2835
ND 15-6	48-91	CHCl ₃ : EtOH (23:2, 9:1)	0,9829
ND 15-7	92-104	CHCl ₃ : EtOH (17:3)	0,2301
ND 15-8	105-108	CHCl ₃ : EtOH (17:3)	0,2237
ND 15-9	109-127	CHCl ₃ : EtOH (17:3)	0,7181
ND 15-10	128-154	CHCl ₃ : EtOH (4:1, 1:1)	0,4336
Celková hmotnost extraktu			4,9892

4.3.3 Separace alkaloidů z podfrakce ND 15-9

V rámci této diplomové práce byla zpracovávána podfrakce ND 15-9 o hmotnosti 718,1 mg. Před vlastním zahájením izolačních prací byla frakce podrobena GC/MS analýze (Obr. 14).



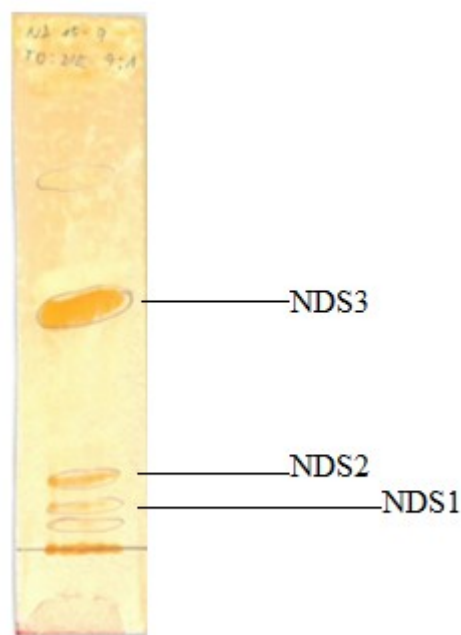
Obrázek 14 EI/MS spektrum ND 15-9.

Vzorek byl rozpuštěn ve směsi EtOH a CHCl₃ (1:1) a nanesen v jedné lince o přibližné délce 13 cm na lité skleněné desky. Celkem bylo nanášeno 20 desek, které byly dvakrát vyvinuty v mobilní fázi S₁ a vysušeny.

Tabulka 9 Podmínky preparativní TLC při zpracování frakce ND 15-9.

Frakce ND 15-9	718,1 mg
Adsorbent	Kieselgel 60 GF ₂₅₄ (Merck, CZ)
Chromatografické desky	15x15 cm, nanáška v lince o délce 13 cm
Počet desek	20
Chromatografická soustava	To: Et ₂ NH (9:1)
Vyvíjení	2x
Detekce	UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo

Po vyvinutí a vysušení chromatografických desek byly pod UV lampou viditelně odděleny, označeny a následně separovány tři zóny, které byly označeny NDS₁ – NDS₃. TLC jednotlivých zón je znázorněna na následujícím obrázku (Obr. 15). Separované zóny byly smíseny s křemelinou v poměru 1:1 a eluovány směsí EtOH: CHCl₃ (1:1). Eluát byl poté odpařen, krystalizován ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1). Vzniklé krystaly byly odfiltrovány, promyty malým množstvím EtOH a CHCl₃ (9:1), vysušeny ve vakuovém exsikátoru a v malých baňkách uloženy do lednice.



Obrázek 15 TLC jednotlivých zón ND 15-9 v soustavě S₁ (2x vyvinuto).

Zóna NDS₃ byla zpracována jako první. Odpařením eluátu vznikaly v baňce krystaly, které byly rekrystalizovány ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1). Hmotnost čisté látky činila 201,1 mg. Vzorek byl odeslán na GC/MS analýzu a NMR pomocí níž byl identifikován jako tetrahydromasonin.

Dále byla zpracovávána zóna NDS₂ s celkovou hmotností 48 mg. Vzorek byl přečištěn na 2 komerčních deskách (20x10 cm; dráha 8,5 cm) pomocí preparativní TLC za požití mobilní fáze S₂, 2x vyvinuto. Pomocí UV-detekce byly vypreparovány 2 zóny, které byly přečištěny stejným způsobem jako je uvedeno u zón NDS₁ – NDS₃. Vzorek z první zóny byl pomocí GC/MS předběžně identifikován jako tetrahydromasonin. Pro ověření byla provedena srovnávací TLC se standardem izolovaným z předchozí zóny, kdy zóna vzorku vykazovala

shodný retenční faktor jako zóna standardu. Z druhé zóny bylo získáno 22,2 mg čisté látky, která byla identifikována jako krinin.

Zóna NDS₁ o hmotnosti 25,3 mg byla přečištěna na jedné komerční desce (20x10 cm; dráha 8,5 cm), mobilní fáze S₂, 2x vyvinuto. Byla získána čistá látka o hmotnosti 8,4 mg, která byla identifikována jako epimaritidin.

Tabulka 10 Hmotnosti izolovaných látek a podmínky během jejich izolace.

Zóna	Hmotnost (mg)	Mobilní fáze	Hmotnost čisté látky (mg)
NDS ₁	25,3	S ₂	8,4
NDS ₂	48,0	S ₂	22,2
NDS ₃	221,1	S ₁	201,1

4.3.4 Strukturní identifikace alkaloidů

4.3.4.1 GC/MS analýza

Vlastní analýza izolovaných alkaloidů a měření jejich hmotnostních spekter byly provedeny na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracující v režimu elektronové ionizaci 70 eV. Separace probíhala na koloně DP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). Teplotní gradient byl zvyšován rychlostí 15 °C/min z počáteční teploty 100 °C do teploty 180 °C, která byla udržována 1 minutu. Dále byla teplota zvyšována rychlostí 5 °C/min až do výše 300 °C a byla stabilizována po dobu 40 minut. Rychlost průtoku nosného plynu helia byla nastavena na 0,8 ml/min. Nástřik vzorku (1 mg/ml) o objemu 1 μl byl proveden injektorem nastaveným na teplotu 280 °C ve split mode“ při poměru 1:10. Teplota detektoru byla 200 °C a detekční rozmezí m/z 35–600. K vlastní identifikaci alkaloidů bylo využito porovnání jejich hmotnostních spekter se spektry knihovně spekter NIST, s daty publikovanými v literárních zdrojích a rovněž se spektry látek, které byly izolovány v laboratoři Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

4.3.4.2 Nukleární magnetická rezonance

NMR spektra (¹H-NMR a ¹³C-NMR) byla naměřena na přístroji Varian Iniova 500 s pracovní frekvencí 499,87 MHz pro ¹H a 125,70 MHz pro ¹³C. Měření bylo provedeno

doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, Ph.D. při teplotě 25 °C v deuteriochloroformu (CDCl₃). Spektra ¹H byla měřena pomocí inverzní 5 mm ID PGF sondy za použití standartních pulzních frekvencí a na měření ¹³C spekter bylo využito 5 mm SW širokopásmové sondy.

4.3.4.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost alkaloidních roztoků byla měřena na polarimetru P3000 v prostředí chloroformu (1 mg/ml) za laboratorní teploty. Podle následujícího vzorce byla vypočítána specifická otáčivost:

$$[\alpha]_t^D = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

t – teplota měření; D – sodíková čára D čára = 589,3 nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace měřeného alkaloidu [g·100 ml⁻¹]; l – délka kyvety [dm].

4.4 Testování biologické aktivity

4.4.1 Chemikálie

- acetylthiocholin jodid – (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)
- butyrylthiocholin jodid – (Sigma-Aldrich) (použit 10mM roztok)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% – (Sigma-Aldrich) (použit 5mM roztok)
- huperzin A 95 % (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- galanthamin hydrobromid 95 % (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4
- 5mM Fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného
- 100mM Fosfátový pufr pH 7,4

4.4.2 Příprava hemolyzátu a plazmy

Hemolyzát lidských erytrocytů byl použit jako zdroj AchE a lidská plazma sloužila jako zdroj BuChE. Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané krve zdravých dobrovolníků, ke které byl přidán citrát sodný jako protisrážlivé činidlo (18 ml krve + 2 ml 3,4 % roztoku citrátu). Ihned po odběru byla krev stejnoměrně rozdělena do zkumavek po 5 ml a byla

odstředěna centrifugací s rychlostí 4000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byla ze zkumavek odebrána plazma bez erytrocytů a byla následně uchována do doby stanovení aktivity BuChE při teplotě 4 °C. Zbytek plazmy byl odstraněn pomocí bezpopelného filtračního papíru a po změření objemu erytrocytární masy bylo k tomuto sedimentu přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM chloridu sodného, aby byl objem suspenze 13 ml. Poté byla provedena centrifugace stejným způsobem, jako je uvedeno výše při oddělování plazmy. Promytí bylo provedeno celkem 3x, promývací kapalina byla dokonale odstraněna a poté bylo přidáno potřebné množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, k dosažení poměru erytrocyty:pufr 1+ 8-9. Směs byla následně zhomogenizována, přelita do Erlenmayerovy baňky a ponechána spontánní hemolýze za míchání teflonovým míchadlem rychlostí 300 ot./min. Okamžitě po skončení hemolýzy byla u suspenze stanovena její acetylcholinesterasová aktivita, přičemž bylo možné upravit hodnotu absorbance 5mM fosfátovým pufrem na požadovanou hodnotu 0,08 – 0,15. Hemolyzát byl uchováván do doby použití při -22 °C a butyrylcholinesterasová aktivita plazmy byla stanovena obdobným způsobem, přičemž hodnota absorbance musí být 0,15-0,20.

4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči AChE/ BuChE

Ke stanovení hodnoty inhibiční aktivity (IC_{50}) byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [$\lambda = 436$ nm (AChE)/ $\lambda = 412$ nm (BuChE)]. Estery thiocholinu, které sloužily jako substrát, jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu vytvářející s DTNB žlutý produkt. Při spektrofotometrii byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu pomocí programu GraphPad Prism (verze 5.02 pro Windows, Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE byla vypočítána nelineární regresí hodnota IC_{50} v μ M. Ta byla následně porovnána s hodnotami IC_{50} referenčních látek galanhtaminem a huperzinem A. Inhibice v % byla přepočítána pomocí vzorce:

$$I = 100 - [\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}] * 100,$$

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Stanovení aktivity enzymů: bylo měřeno v 6 - ti mikrotitračních destičkách, do kterých bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Po promíchání na třepačce 1 minutu byla směs inkubována v komoře Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA) při 37 °C po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu - 10 mM acetylthiocholinjodid/10 mM butyrylthiocholinjodid, po 2 minutách byla změřena absorbance žlutého barevného produktu, který vznikl navázáním SH-skupiny z thiocholinu na DTBN, při příslušné vlnové délce (AChEhemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm).

Stanovení aktivity látek: bylo provedeno stejným způsobem – byly použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), ale do poslední šesté řady byly namísto samotného DMSO přidány navíc roztoky měřené látky o koncentracích 40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM.

4.4.4 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči POP

Tato biologická aktivita byla měřena ve spolupráci s Centrem pokročilých studií fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové a její podrobný popis je možné najít v následujícím literárním zdroji (98).

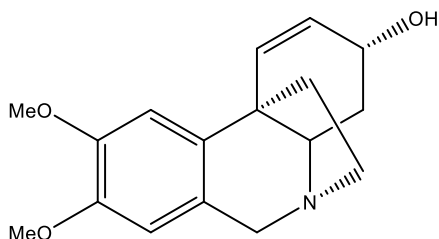
5 VÝSLEDKY

5.1 Přehled izolovaných alkaloidů a jejich strukturní analýza

V rámci této diplomové práce byly izolovány 3 látky v čistém stavu z podfrakce ND 15-9. Látky byly označeny jako NDS1, NDS2 a NDS3 a byly podrobeny identifikaci pomocí NMR a GC/MS analýzy. Výsledky byly porovnány s daty publikovanými v literatuře a izolace dalších alkaloidů by již byla nad rámec této práce.

5.1.1 Strukturní analýza epimaritidinu (NDS1)

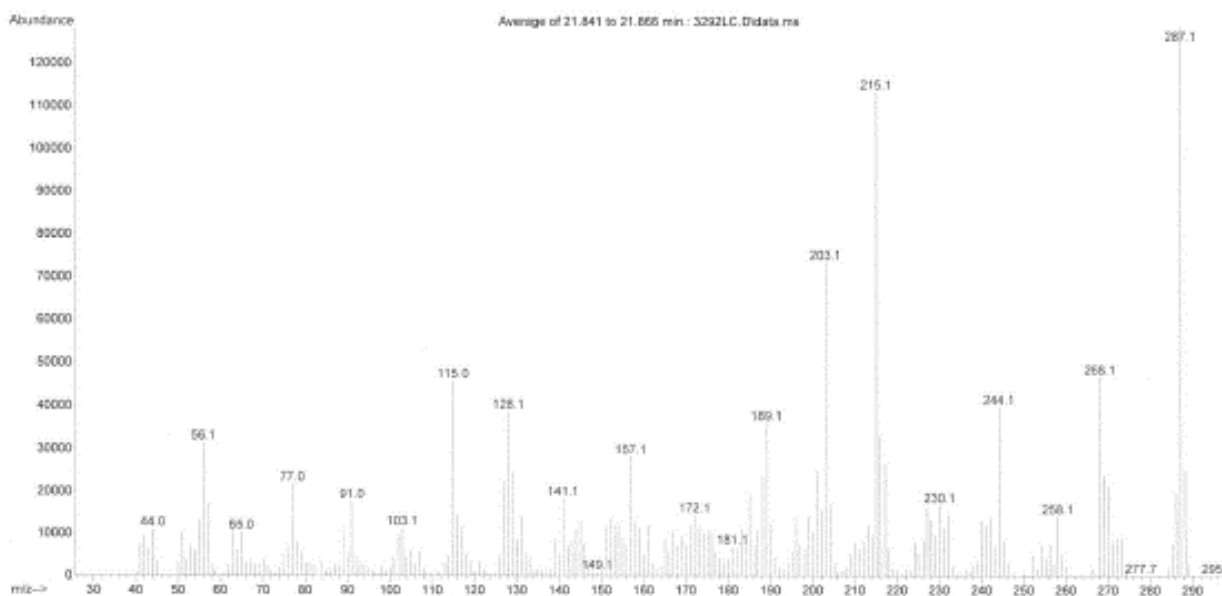
Bílé drobné krystaly označené látky NDS1 byly určeny jako epimaritidin (99).



Obrázek 16 Epimaritidin.

5.1.1.1 MS analýza

EI-MZ (m/z) 287(100), 215(88), 203(57), 268(36), 115(35), 244(30), 128(30), 189(28), 216(26), 56(24).



Obrázek 17 EI-MS spektrum epimaritidinu.

5.1.1.2 NMR analýza

5.1.1.2.1 ¹H NMR spektrum epimaritidinu

¹H NMR (499.9 MHz; δ, CDCl₃, 25 °C):

6.81 (1H, s, H₁₀), 6.52 (1H, s, H₇), 6.50 (1H, dd, J = 10.2, 2.1 Hz, H₁), 5.80 (1H, d, J = 10.2 Hz, H₂), 4.44 (1H, d, J = 16.8 Hz, H₆), 4.46 (1H, m, H₃), 3.88 (3H, s, OMe), 3.82 (3H, s, OMe), 3.81 (1H, d, J = 16.8 Hz, H₆), 3.45 (1H, ddd, J = 14.3, 10.5, 4.6 Hz, H₁₂), 3.27 (1H, dd, J = 13.2, 3.2, H_{4a}), 2.94 (1H, ddd, J = 14.3, 8.9, 5.8 Hz, H₁₂), 2.26 – 2.05 (3H, m, H₄, H₁₁, H₁₁), 1.63 (1H, ddd, J = 12, 12, 12 Hz, H₄).

5.1.1.2.2 ¹³C NMR spektrum epimaritidinu

¹³C NMR (125.7 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

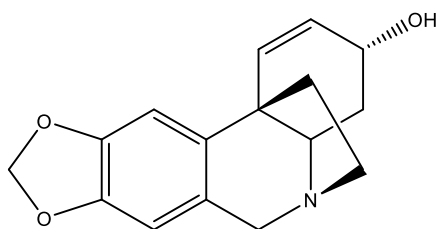
147.4, 137.5, 131.5, 128.9, 124.7, 107.9, 105.6, 67.7, 66.8, 61.9, 56.1, 55.9, 53.3, 45.1, 44.1, 35.0.

5.1.1.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -127,6$$

5.1.2 Strukturní analýza krininu (NDS2)

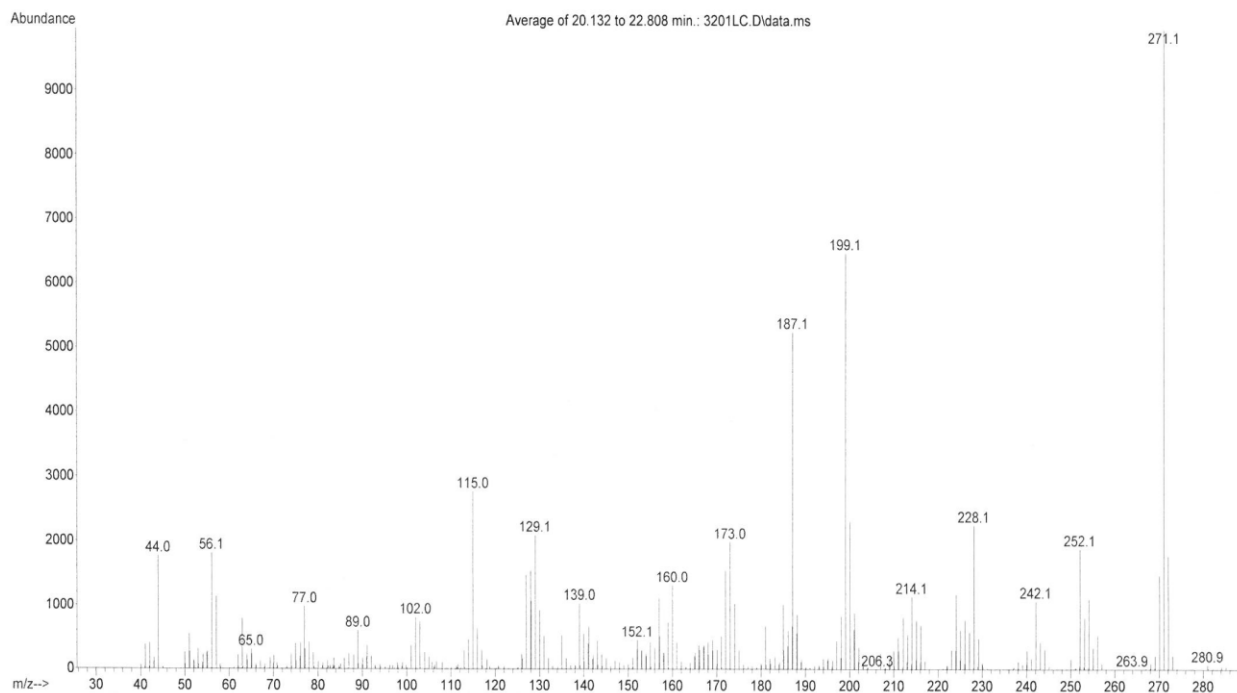
Bílá látka práškovitého charakteru označená NDS2 byla určena jako krinin (100).



Obrázek 18 Krinin.

5.1.2.1 MS analýza

EI-MZ (m/z) 271(100), 199(66), 187(60), 115(28), 128(27), 228(23), 173(21), 56(19).



Obrázek 19 EI-MS spektrum krininu.

5.1.2.2 NMR analýza

5.1.2.2.1 ^1H NMR spektrum krininu

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.85 (s, 1H), 6.57 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.97 (dd, $J = 10.0, 5.2$ Hz, 1H), 5.91 (dd, $J = 6.0, 1.2$ Hz, 2H), 4.43 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.36 (bs, 1H), 3.81 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.46 – 3.38 (m, 2H), 2.92 (ddd, $J = 14.0, 9.2, 6.8$ Hz, 1H), 2.68 (bs, 1H), 2.20 (ddd, $J = 12.4, 9.2, 4.4$ Hz, 1H), 2.06 – 2.01 (m, 1H), 1.94 (ddd, $J = 16.8, 10.8, 6.0$ Hz, 1H), 1.75 (td, $J = 13.6, 4.0$ Hz, 1H).

5.1.2.2.2 ^{13}C NMR spektrum krininu

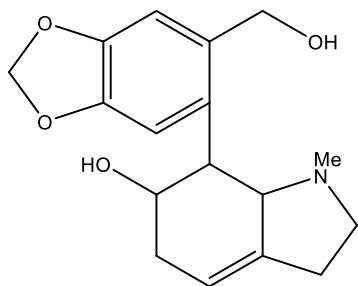
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 147.0, 146.6, 138.6, 132.4, 128.4, 126.2, 107.7, 103.6, 101.5, 64.5, 63.6, 62.7, 54.1, 45.0, 44.5, 33.1.

5.1.2.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -17,5$$

5.1.3 Strukturní analýza tetrahydromasoninu (NDS3)

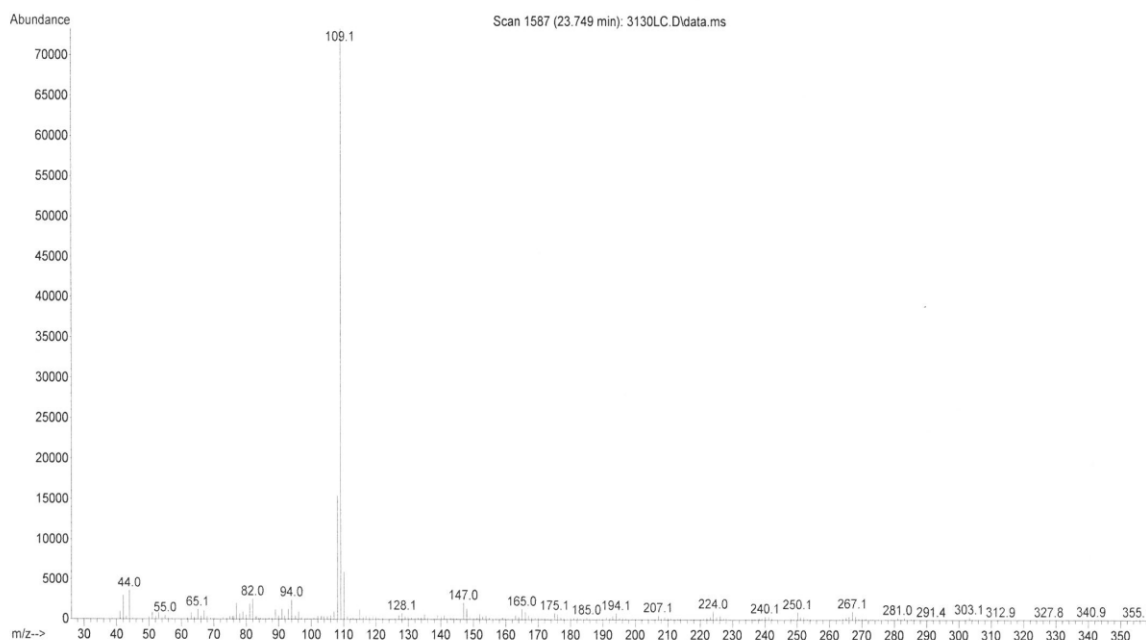
Bílé velké krystaly látky označené NDS3 byly určeny jako tetrahydromasonin (101).



Obrázek 20 Tetrahydromasonin.

5.1.3.1 MS analýza

EI-MZ (m/z) 303 (<1), 109(100), 44(5), 94(3), 82(3).



Obrázek 21 EI-MS spektrum tetrahydromasoninu.

5.1.3.2 NMR analýza

5.1.3.2.1 ^1H NMR spektrum tetrahydromasoninu

^1H NMR (500 Hz, CD_3OD): δ 7.31 (1H, s, H_6'), 6.86 (1H, s, H_3'), 5.93-5.92 (2H, m, OCH_2O), 5.52-5.48 (1H, m, H_4), 4.59 (1H, d, $J=12.3$ Hz, $\text{C}2'-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.55 (1H, d, $J=12.3$ Hz, $\text{C}2'-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.00-3.96 (1H, m, H_6), 3.26-3.20 (1H, m, H_{7a}), 3.06 (1H, ddd, $J=9.4$ Hz, $J=8.2$ Hz, $J=2.7$ Hz, H_2), 2.98 (1H, dd, $J=10.0$ Hz, $J=1.4$ Hz, H_7), 2.61-2.52

(2H, m, H₃, H₅), 2.51-2.42 (1H, m, H₃), 2.36 (1H, dd, $J=18.7\text{Hz}$, $J=9.4\text{Hz}$, H₂), 2.29-2.22 (1H, m, H₅), 1.85 (3H, s, NCH₃).

5.1.3.2.2 ¹³C NMR spektrum tetrahydromasoninu

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 148.2, 147.3, 140.7, 135.9, 133.7, 117.6, 110.4, 110.3, 102.2, 71.1, 66.2, 63.5, 56.2, 45.4, 43.2, 36.7, 28.7.

5.1.3.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = -9,26^\circ$$

5.2 Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Výsledky *in vitro* testovaných alkaloidů na inhibiční aktivitu vůči lidské AChE a BuChE jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 11).

Tabulka 11 Přehled inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE.

Alkaloid	IC ₅₀ , AChE (μM)	IC ₅₀ , BuChE (μM)
Epimaritidin	> 1000	> 1000
Krinin	> 1000	> 1000
Tetrahydromasonin	> 1000	> 1000
Galanthamin ^R	1,71 ± 0,07	42,30 ± 0,10
Huperzin A ^R	0,033 ± 0,001	> 1000
Berberin ^R	0,71 ± 0,01	30,7 ± 3,5

^R = referenční látka

Výsledky testů inhibice prolyl oligopeptidasy jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 12).

Tabulka 12 Přehled inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů vůči POP.

Alkaloid	IC₅₀, POP (mM)
Epimaritidin	0,79 ± 0,37
Krinin	> 1000
Tetrahydromasonin	0,75 ± 0,89
Berberin	0,14 ± 0,02
<i>Z-Pro-prolinal</i>^R	2,75 · 10 ⁻⁶ ± 0,00 · 10 ⁻⁶

^R = referenční látka

5.3 Příprava derivátů izolovaných alkaloidů

Vzhledem k nízkému množství alkaloidů, které se podařilo izolovat z rostlinného materiálu, deriváty těchto látek nebyly v rámci diplomové práce připraveny.

6 DISKUZE

Po mnoho let je výzkum přírodních produktů jedním z nejdůležitějších a hlavních prostředků k nalezení nových skupin léčiv. Izolace prvního alkaloidu lykorinu z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* (1877) je považována za podstatný a důležitý krok v rozvoji a zkoumání amarylkovitých alkaloidů (8). Dodnes získané výsledky z různých studií činí z lykorinu zajímavý příklad. Dokládají, že přírodní sloučeniny jsou schopné léčit onemocnění, jako je například nemalobuněčný karcinom plic (74), i když zůstávají stále relativně nevyužitým fytochemickým zdrojem (8).

Předmětem této diplomové práce byla izolace alkaloidů z frakce ND 15-9, která byla získána ze sumárního alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Tato rostlina byla vybrána pro fytochemickou analýzu jako zdroj sekundárních metabolitů rostlin s potenciální biologickou aktivitou na základě získaných dat ze screeningových studií provedených v minulých letech na katedře farmaceutické botaniky. Výzkum na tomto pracovišti je dlouhodobě zaměřen na hledání látek přírodního původu, potenciálně využitelných v terapii AD a v protinádorové terapii.

Frakce ND 15-9 byla nejprve podrobena GC/MS analýze za účelem zjištění přítomnosti izolovatelných alkaloidů. Frakce byla zpracována pomocí preparativní TLC a byly získány tři látky v čistém stavu. Na základě výsledků MS, NMR analýzy a optické otáčivosti byly izolované látky identifikovány jako epimaritidin, krinin a tetrahydromasonin. Alkaloid epimaritidin se vyskytuje v rostlinách čeledi Amaryllidaceae v minoritním množství a byl prozatím izolován z cibulí *Zephyranthes rosea* (99). Z hlediska biologické aktivity této látky nebyla v literárních pramenech prozatím věnována větší pozornost. Další alkaloid krinin byl již dříve nalezen v mnoha rostlinách čeledi Amaryllidaceae. Lze zmínit zástupce z rodů *Nerine bowdeni*, *Narcissus poeticus*, *Boophone haemanthoides* a *Boophone disticha*, *Crinum lugardiae*, *Zephyranthes robusta*, *Bunsvigia radulosa* a *Brunsvigia littoralis* (8; 28; 37; 46) a další. Alkaloidy krininového typu, do kterého jsou řazeny oba diskutované alkaloidy, mají obecně slabé inhibiční působení vůči AChE (66) či jsou zcela biologicky neaktivní, jak je tomu u krininu. Tetrahydromasonin byl v rámci provedených izolačních prací izolován vůbec poprvé. Je řazen do skupiny homolykorinového typu alkaloidů. Jeho struktura je v literatuře sice známá, ale látka byla doposud připravena polosyntetickou cestou z alkaloidu odulinu

(101). Absolutní konfigurace této látky prozatím není známá a v současné době se řeší ve spolupráci s Univerzitou Pardubice za využití X-ray metod.

Ostatním látkám nebyla věnována větší pozornost. Bylo zjištěno, že se nejednalo o alkaloidní sloučeniny či ve frakci ND 15-9 byly přítomny látky, které se vyskytovaly pouze ve stopovém množství. Jedním z cílů předložené diplomové práce byla příprava derivátů izolovaných alkaloidů za účelem rozšíření spektra biologických aktivit testovaných látek. Z důvodu izolace malých množství bylo od přípravy polosyntetických derivátů upuštěno.

Izolované látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči cholinesterásám za využití Ellmanovy metody. Jejich hodnoty IC_{50} byly porovnány se standardy hodnot IC_{50} galanthaminem ($IC_{50, AChE} 1,71 \pm 0,07 \mu M$ a $IC_{50, BuChE} = 42,30 \pm 0,10 \mu M$), huperzinem A ($IC_{50, AChE} = 0,033 \pm 0,001 \mu M$ a $IC_{50, BuChE} > 1000 \mu M$) a berberinem ($IC_{50, AChE} = 0,71 \pm 0,01 \mu M$ a $IC_{50, BuChE} = 30,7 \pm 3,5 \mu M$). Dle získaných výsledků ani jeden z izolovaných alkaloidů nevykazoval výraznou inhibici vůči AChE a BuChE ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Dále byly alkaloidy podrobeny testům na jejich POP inhibiční aktivitu. POP je cytosolová serinová peptidáza, která se účastní při biosyntéze a štěpení peptidických molekul, které se hojně vyskytují v různých tkáních těla včetně mozku a její inhibice pravděpodobně souvisí se zlepšováním kognitivních funkcí (97). Inhibiční aktivita vůči POP byla porovnána se standardem berberinem ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,02 mM$) a *Z-Pro*-prolinalem ($IC_{50} = 2,75 \cdot 10^{-6} \pm 0,00 \cdot 10^{-6} mM$). Mírná inhibiční POP aktivita byla zjištěna u tetrahydromasoninu ($IC_{50} = 0,75 \pm 0,89 mM$) a epimaritidinu ($IC_{50} = 0,79 \pm 0,37 mM$), krinin byl vůči POP neaktivní.

Doposud není k dispozici literatura, ve které jsou popsány inhibiční aktivity vůči POP u izolovaných alkaloidů. Z Amaryllidaceae alkaloidů, které vykazovaly inhibiční aktivitu vůči POP, lze uvést alkaloid krininového typu bufanidrin ($IC_{50} = 0,37 \pm 0,04 mM$) a alkaloid lykorinového typu 1-*O*-acetyllykorin ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,05 mM$) (60).

Látky budou dále testovány ve spolupráci s Univezitou v Bologni na jejich potenciální inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β , neboť tento enzym se podílí na tvorbě neurofibrilárních klubek a hraje významnou roli v rozvoji AD (56).

Z hlediska výsledků testovaných inhibičních aktivit zmíněných enzymů se látky prozatím jeví jako biologicky nezajímavé.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A PRAMENŮ

1. Bala K. M., Sri P. A., Shiva K. R., Ramu V., Satyanarayana D., Madhu P.: Drug interaction: principles, methodology and applications (general aspects). *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* 2011, 2: 1-4.
2. Singh A., Desgagne-Penix I.: Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today* 2014, 1: 114-120.
3. Hao B., Shen S. F., Zhao Q. J.: Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Molecules*, 2013, 18: 2458-2468.
4. Sramek J. J., Franckiewicz J.E., Cutler R.N.: Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2000, 9: 2393-2402.
5. Nair J. J., Van Staden J.: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 2014, 151: 12-26.
6. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha 2009: Karolinum.
7. Nair J. J., Staden J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 62: 262-275.
8. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., Andrade J. P., Martinez V., Codin C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Sciences*, 2011: 65-100.
9. Tian Y. Q., Zhang C. Y., Guo M. Q.: Comparative analysis of Amaryllidaceae alkaloids from three *Lycoris* species. *Molecules* 2015, 20: 21854-21869.
10. Zhan G., Liu J., Zhou J., Sun B., Aisa H.A., Yao G.: Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017, 127: 771-780.
11. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L., Cahlíková, L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potencionální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* 2013, 107: 701-708.
12. Křesadlová L., Vilím S.: *Encyklopedie tulipánů, hyacintů, begonií a dalších cibulnatých a hlíznatých rostlin*. Computer Press: Brno 2009, 452-455.
13. Nair J. J., Rarova L., Strnad M., Bastida J., Staden J.: Mechanistic insight to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications* 2015, 10: 171-182.
14. Fernandes A.: Keys to the identification of native and naturalized taxa of the genus *Narcissus* L. *Daffodil and Tulip Year Book*, The Royal Horticultural Society: London 1968, 37-66.
15. Jacobi K.: *Cibuloviny pro zahradu a dům*. Priroda: Bratislava 1997, 40-43.

16. Graham S. W., Barrett S. C. H.: Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 2004, 91: 1007-1021.
17. http://www.sharnoffphotos.com/nature/wild_plants/wild_plantsMN/narcissus_tazetta_orientalis.jpg, staženo 5. ledna 2018
18. <https://www.floravascular.com/index.php?spp=Narcissus%20serotinus.jpg>, staženo 5. ledna 2018
19. https://twitter.com/plantsman_jp/status/787204133166067713.jpg, staženo 5. ledna 2018
20. <http://www.broadleigh-bulbs-autumn.co.uk/shop/index.php?app=gbu0&ns=prodshow&ref=narcyclamineus.jpg>, staženo 5. ledna 2018
21. Berkov S., Martinez-Frances V., Bastida J., Codina C., Rios S.: Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry* 2014, 99: 95–106.
22. Fernandes A.: L'évolution chez le genre *Narcissus* L. *Anales Instituto Botanico A. J. Cavanilles* 1975, 32: 843–872.
23. Dweck C. A.: The folklore of *Narcissus*. *Narcissus and Daffodils* (Gordon R. Hanks), Chapter 2, *Medicinal and Aromatic Plants*, Taylor and Francis: London and New York 2002, 21: 19-29.
24. Caamal-Fuentes E., Torress-Tapia L. W., Sima-Polanco P., Pereza-Sanchez S. R., Moo-Puc R.: Screening of plants used in Mayen traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 135: 19-24.
25. Ingrassia L., Lefranc F., Mathieu V., Darro F., Kiss R.: Amaryllidaceae isocarbostryril alkaloids and their derivatives as promising antitumor agents. *Translational Oncology* 2008, 1: 1-13.
26. Kornieko A., Evidente A.: Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* 2008, 108: 1982-2014.
27. Tallini L.R., Andrade J.P., Kaiser M., Viladomat F., Nair J. J., Zuanazzi J. A. S., Bastida J.: Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules* 2017, 22: 1437-1449.
28. Naira J. J., Bastida J., Codina C., Viladomat F., Stadena von J.: Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a Review. *Natural Product Communications* 2013, 8: 1335–1350.
29. Cabezas F., Ramirez A., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2003, 51: 315-317.
30. Liu Z. M., Huang X. Y., Cui M. R., Zhang X. D., Chen Z., Yang B. S., Zhao X. K.: Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and antiinflammatory activities. *Fitoterapia* 2015, 101:188-193.

31. Nair J. J., Standen J., Bastida J.: Cytotoxic alkaloid constituents of the Amaryllidaceae. *Studies in Natural Product Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.), Chapter 3, Elsevier: Amsterdam 2016, 49: 107-156.
32. Nair J.J., Bastida J., Valadomat F., Staden J.V.: Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications* 2012, 7: 1677-1688.
33. Eckert G. P.: Traditional used plants against cognitive decline and Alzheimer disease. *Frontiers in Pharmacology* 2010, 139: 1-10.
34. McNulty J., Nair J. J., Singh M., Crankshaw D. J., Holloway A. C., Bastida J.: Selective cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19: 3233–3237.
35. Takos A-M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14: 11713-11741.
36. Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., Viladomata F., Bastida J.: Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC–MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops and Products* 2014, 56: 211–222.
37. Jin Z.: Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Natural Product Reports* 2011, 28: 1126–1142.
38. Krstenansky J. L.: Mesembrine alkaloids: Review of their occurrence, chemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 195: 10–19.
39. Cahlíková, L., Macáková, K., Benešová, N., Chlebek, J., Hošťálková, A., Opletal L.: Natural compounds (Small Molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease: A Critical Review. *Studies in Natural Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.), Chapter 6, Elsevier: Amsterdam 2014, 42: 153-194.
40. Raboch, J.: Duševní poruchy, Alzheimerova choroba. *Psychiatrie. Praha: Galén*, 2001, 149-154.
41. Coman H., Nemes B.: New therapeutic targets in Alzheimer's disease. *International Journal of Gerontology* 2017, 11: 2-6.
42. Castillo W. O., Aristizabal-Pachon A. F.: Galantamine protects against beta amyloid peptide-induced DNA damage in a model for Alzheimer's disease. *Neural rRgeneration Research* 2017, 12: 916-917.
43. Bozkurt B., Coban G., Kaya G. I., Onur M. A., Unver-Somer N.: Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*. *South African Journal of Botany* 2017, 113: 119–127.
44. Bajic V., Milovanovic E.S., Spremo-Potparevic B., Zivkovic L., Milicevic Z., Stanimirovic J., Bogdanovic N., Isenovic E. R.: Treatment of Alzheimer's disease: classical therapeutic approach. *Current Pharmaceutical Analysis* 2016, 12: 82–90.
45. Jiráček R., Vnoučková K.: Rivastigminum. *Remedia* 2003, 13:372–378.

46. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity* 2013, 10: 1120-1127.
47. Sadowsky C. H., Farlow M. R., Meng X.: Safety and tolerability of rivastigmine transdermal patch compared with rivastigmine capsules in patients switched from donepezil: data from three clinical trials. *International Journal Clinical Practise* 2010, 64: 188-193.
48. Salloway S., Mintzer J., Cummings J. L.: Subgroup analysis of US and non-US patients in a global study of high-dose donepezil (23 mg) in moderate and severe Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias* 2012, 27: 421-432.
49. Corey-Bloom J.: Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *International Journal Clinical Practise* 2003, 57: 219-223.
50. Cortesa N., Alvarez R., Osorio E. H., Alzatec F., Berkovd S., Osorio E.: Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015, 102: 222-228.
51. Lopez S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 2002, 71: 2521-2529.
52. Zöeller B., Hock C., Kull H.: Rational therapy of Alzheimer's dementia based on current clinical studies. *Praxis* 2001, 90: 827-834.
53. Eketjall S., Janson J., Kassperson K.: AZD3293: a novel, orally active BACE1 inhibitor with high potency and permeability and markedly slow off-rate kinetics. *Journal of Alzheimers Disease* 2016, 50: 1109-1123.
54. Delacourte A., Sergeant N., Wattez A.: Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Experimental Gerontology* 2002, 37: 1291-1296.
55. Maqbool M., Mobashir M., Hoda N.: Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: a therapeutic target for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 107: 63-81.
56. Cai Z., Zhao Y., Zhao B.: Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 2012, 9: 864-879.
57. Wang D., Fu Q., Zhou Y.: β_2 adrenergic receptor, protein kinase A (PKA) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways mediate tau pathology in Alzheimer disease models. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288: 10298-10307.
58. Habartová K., Cahlíková L., Řežáčková M., Havelek R.: The Biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications* 2016, 11: 1587-1594.
59. He M. M., Qu C. R., Gao O. D., Hu X. M., Hong X. C.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *Royal Society of Chemistry Advances* 2015, 5: 16562-16574.

60. Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., Hulcová D.; Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková S., Opletal L.; Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdeni* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* 2016, 6: 80114-80120.
61. Cahlíková L., Doskočil I., Hošťálková A., Benešová N., Šafratová M., Kuneš J.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 2015, 13: 394–398.
62. Elgorashi E. E., Malan S. F., Stafford G. I., van Staden J.: Quantitative structure–activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *South African Journal of Botany* 2006, 72: 224–231.
63. McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., Brennan J. D., Bastida J.: Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, 20: 5290–5294.
64. Kaya G. I., Uzuna K., Bozkurt B., Onur M. A., Somer N. U., Glatzel D. K., Fürst R.: Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*. *South African Journal of Botany* 2017, 108: 256–260.
65. Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: N-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008, 18: 2263-2266.
66. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications* 2013, 8: 1541-1544.
67. Rivlin N., Brosh R., Oren M., Rotter V.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Genes Cancer* 2011, 2: 466-474.
68. Havelek R., Muthna D., Tomšík P., Královec K., Seifrtová M., Cahlíková L., Hošťálková A., Šafratová M., Perwein M., Čermáková E., Řezáčová M.: Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions* 2017, 275: 121-132.
69. Havelek R., Cmielová J., Královec K., Brůčková L., Bílková Z., Fousová I., Šinkorová Z., Vavrová J., Řezáčová M.: Specific inhibition of Wee1 kinase and Rad51 recombinase: a strategy to enhance the sensitivity of leukemic T-cells to ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, 453: 569–575.
70. Beskow B., Skikuniene J., Holgersson A., Nilsson B., Lewensohn R., Kanter L., Viktorsson K.: Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. *British Journal of Cancer* 2009, 101: 816–821.
71. Gogineni V. R., Nalla A. K., Gupta R., Dinh D. H., Klopfenstein J. D., Rao J. S.: Chk2-mediated G2/M cell cycle arrest maintains radiation resistance in malignant meningioma cells. *Cancer Letters* 2011, 313: 64–75.

72. Snyder A. R., Morgan W. F.: Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer and Metastasis Reviews* 2004, 23: 259–268.
73. Sun Y. F., Wink M.: Tetrandrine and fangchinoline, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* can reverse multidrug resistance by inhibiting p-glycoprotein activity in multidrug resistant human cancer cells. *Phytomedicine* 2014, 21: 1110-1119.
74. Sun Y., Wu P., Sun Y., Sharopov F. S., Yang Q., Chen F., Wang P., Liang Z.: Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/b-catenin signaling and epithelialmesenchymal transition (EMT). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018, 495: 911-921.
75. Nair J. J., Staden J.: Cytotoxicity Studies of Lycorine Alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural Product Communications* 2014, 9: 1193–1210.
76. Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A.: (-)-Amarbellisine, a lycorinetype alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* 2004, 35: 2113-2118.
77. Çitoglu S. G., Acıkara O. B., Yılmaz B. S.: Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* 2012, 83: 81-87.
78. Nair J. J., Rarova L., Strnad M., Bastida J., van Staden J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, 26: 6195-6199.
79. Liu J., Hu W. X., He L. F., Ye M., Li Y.: Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Letters* 2004, 17: 245-250.
80. Li L., Dai H. J., Ye M., Wang S. L., Xiao X. J., Zheng J., Chen H. Y., Luo Y. H., Liu J.: Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell International* 2012, 12: 1-6.
81. Michels J., Johnson P. W., Packham G.: Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005, 37: 267-271.
82. Hu M., Peng S., He Y., Qin M., Cong X., Xing Y., Liu M., Yi Z.: Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget* 2015, 6: 15348-15361.
83. Peng Y. Y., He Y. H., Chen C.: NLRC5 regulates cell proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting the Wnt/b-catenin signaling pathway. *Cancer Letters* 2016, 376: 10.
84. Incassati A., Chandramouli A., Eelkema R.: Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: b-catenin. *Breast Cancer Research* 2010, 12: 213.
85. Cao Z., Yu D., Fu S., Zhang G., Pan Y., Bao M., Tu J., Shang B., Guo P., Yang P., Zhou Q.: Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicology Letters* 2013, 218: 174-185.

86. Barthelmes H. U., Niederberger E., Roth T., Schulte K., Tang W. C., Boege F., Fiebig H. H., Eisenbrand G., Marko D.: Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *British Journal of Cancer* 2001, 85: 1585-1591.
87. Goietsenoven G., Mathieu V., Lefranc F., Kornienko A., Evidente A., Kiss R.: Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryrils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Medicinal Research Reviews* 2013, 33: 439-455.
88. Lefranc F., Sauvage S., Goietsenoven G., Megalizzi V., Lamoral-Theys D., Debeir O., Spiegl-Kreinecker S., Berger W., Mathieu V., Kiss R.: Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009, 8: 1739-1750.
89. McLachlan A., Kekre N., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* 2005, 10: 619-630.
90. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 2011, 38: 1549-1556.
91. Siedlakowski P., McLachlan-Burgess A., Griffin C., Tirumalai S. S., McNulty J., Pandey S.: Synergy of pancratistatin and tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biology and Therapy* 2008, 7: 376-384.
92. Havelek R., Seifrtová M., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L., Dalecká M., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková Z.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* 2014, 21: 479-490.
93. Jitsuno M., Yokosuka A., Sakagami H., Mimaki Y.: Chemical constituents of the bulbs of *Habranthus brachyandrus* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2009, 57: 1153-1157.
94. Nair J. J., Manning J. C., Staden J.: Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophone* Herb. (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany* 2012, 83: 89-91.
95. Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. Special issue article, DOI: 10.1002/chir.22719.
96. Cedron J. C., Ravelo A. G., Leon L. G., Padron J. M., Estevez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 2015, 20: 13854-13863.
97. Orhan I. E.: Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry* 2012, 19: 2252-2261.
98. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudencio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives Pharmacal Research* 2018, 41: 208-218.

99. Ghosal S., Singh S. K., Srivastava R. S.: Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 9. (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry* 1985, 24: 635-637.
100. Thanh Tam N., Ch-G. Cho.: Total Synthesis of (\pm)-Crinine via the Regioselective Stille Coupling and Diels–Alder Reaction of 3,5-Dibromo-2-pyrone. *Organic letters* 2008, 10: 601-603.
101. Kreh M., Matusch R.: *O*-Methyloduline and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry* 1995, 38: 1533-1535.

ABSTRAKT

Schickerová Julie: Alkaloidy *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master: izolace, strukturní identifikace, příprava analog, biologická aktivita. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové, 2018, 73 s.

Náplní této diplomové práce byla izolace látek z frakce ND 15-9, která byla získána za využití sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Pro rozdělení této frakce byla využita metoda preparativní TLC a podařilo se izolovat tři látky v čistém stavu označené NDS1-NDS3. Pro určení jejich struktury bylo použito NMR, GC/MS a optické otáčivosti. Získané údaje byly porovnány s daty v literatuře a dále byly provedeny studie na jejich biologické aktivity.

Izolované látky byly identifikovány jako epimaritidin, krinin a tetrahydromasonin. Jejich inhibiční aktivity ($IC_{50} \text{ AChE} > 1000 \mu\text{M}$, $IC_{50} \text{ BuChE} > 1000 \mu\text{M}$) vůči lidské erytrocytární AChE a plazmatické BuChE byly neaktivní v porovnání se standardy galanthaminem ($IC_{50, \text{ AChE}} = 1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{ BuChE}} = 42,30 \pm 0,10 \mu\text{M}$), huperzinem A ($IC_{50, \text{ AChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{ BuChE}} > 1000 \mu\text{M}$) a berberinem ($IC_{50, \text{ AChE}} = 0,71 \pm 0,01 \mu\text{M}$, $IC_{50, \text{ BuChE}} = 30,7 \pm 3,5 \mu\text{M}$). Na základě získaných dat lze konstatovat, že z hlediska inhibice cholinesteras se jedná o látky potenciálně nevyužitelné v terapii AD. Výsledky inhibičních aktivit vzhledem k POP jsou u krininu zanedbatelné, u epimaritidinu je $IC_{50} 0,79 \pm 0,37 \text{ mM}$ a u tetrahydromasoninu $IC_{50} 0,75 \pm 0,89 \text{ mM}$. Všechny tři izolované alkaloidy vykazaly slabou inhibiční aktivitu vůči POP v porovnání s použitým standardem berberinem $IC_{50} 0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$.

Klíčová slova: *Narcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloidy cholinesterasy, Alzheimerova choroba, cytotoxická aktivita

ABSTRACT

Schickerová Julie: Alkaloids of *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master: isolation, structural identification, preparation of analogues, biological activity. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2018, 73 p.

The purpose of this diploma thesis was to isolate the substances from the fraction ND 15-9, which was obtained by column chromatography of the alkaloid extract of *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. The method of preparative TLC was used to separate this fraction, and the three purified compounds were isolated in the pure state NDS1-NDS3. NMR, GC/MS and optical rotation were used to determine their structure. The obtained data were compared with data in the literature and further studies on their biological activity were performed.

Isolated substances were identified as epimaritidine, crinine and tetrahydromasonine. Their inhibitory activities ($IC_{50, AChE} > 1000 \mu M$, $IC_{50, BuChE} > 1000 \mu M$) versus human erythrocyte AChE and plasma BuChE were inactive compared to galanthamine standards ($IC_{50, AChE} = 1.71 \pm 0.07 \mu M$, $IC_{50, BuChE} = 42.30 \pm 0.10 \mu M$), huperzin A standards ($IC_{50, AChE} = 0.033 \pm 0.001 \mu M$, $IC_{50, BuChE} > 1000 \mu M$) and berberin standards ($IC_{50, AChE} = 0.71 \pm 0.01 \mu M$, $IC_{50, BuChE} = 30.7 \pm 3.5 \mu M$). On the basis of the obtained data, it can be concluded that in terms of the inhibition of cholinesterases, these are substances potentially unusable in AD therapy. The results of POP inhibitory activities are negligible in the crinin, for epimaritidine the IC_{50} is 0.79 ± 0.37 mM and for tetrahydromasonine IC_{50} 0.75 ± 0.89 mM. Both alkaloids showed from a low POP inhibition compared to the berberin standard of IC_{50} 0.14 ± 0.02 mM.

Keywords: *Narcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae, alkaloids, cholinesterases, Alzheimer's disease, cytotoxic activity