

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Amaryllidaceae alkaloidy jako předlohové struktury pro vývoj nových
potenciálních léčiv

Amaryllidaceae alkaloids as model structures for the development
of new potential drugs

Vedoucí katedry: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Hradec Králové, září 2021

Soňa Knápková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením PharmDr. Daniely Hulcové, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, které byly použity pro vypracování této diplomové práce, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, září 2021

Soňa Knápková

Děkuji PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za odborné vedení, vřelý přístup, pomoc, ochotu, cenné rady a poskytnuté materiály k vypracování diplomové práce. Zároveň PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. děkuji i za asistenci při přípravě derivátů vittatinu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči acetylcholinestráse a butyrylcholinesteráse. Za odborné rady ohledně syntézy derivátů vittatinu děkuji i prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. Za identifikaci látek a interpretaci NMR analýzy bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Janě Maříkové, Ph.D. Dále děkuji prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za provedení HRMS analýzy. Na závěr bych ráda poděkovala pracovnímu kolektivu z Katedry farmakognozie a Katedry farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a milý přístup.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	ČELEĎ AMARYLLIDACEAE	12
3.1.1	Charakteristika čeledi.....	12
3.2	ROD HIPPEASTRUM	13
3.2.1	Charakteristika rodu <i>Hippeastrum</i>	13
3.2.2	Vybraní zástupci rodu <i>Hippeastrum</i>	14
3.2.2.1	<i>Hippeastrum argentinum</i> (Pax) Hunz.	14
3.2.2.2	<i>Hippeastrum aulicum</i> (Ker Gawl.) Herb.....	16
3.2.2.3	<i>Hippeastrum morelianum</i> Lem.	16
3.2.2.4	<i>Hippeastrum vittatum</i> (L'HÉR.) Herb.	17
3.2.2.5	<i>Hippeastrum papillio</i> (Ravenna) Van Scheepen.....	18
3.2.2.6	<i>Hippeastrum reticulatum</i> Herb.....	19
3.2.2.7	<i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Voss.	20
3.2.2.8	<i>Hippeastrum psittacinum</i> (Ker Gawl.) Herb.....	21
3.2.2.9	<i>Hippeastrum</i> cv. Ferarri	21
3.2.3	Amaryllidaceae alkaloidy.....	23
3.2.3.1	Lykorinový strukturní typ.....	27
3.2.3.2	Homolykorinový strukturní typ.....	29
3.2.3.3	Haemanthaminový strukturní typ.....	30
3.2.3.4	Krininový strukturní typ	31
3.2.3.5	Montaninový strukturní typ.....	32
3.2.3.6	Tazettinový strukturní typ.....	35
3.2.3.7	Narciklasinový strukturní typ	36
3.2.3.8	Galanthaminový strukturní typ.....	37
3.2.3.9	Belladinový strukturní typ.....	38
3.2.4	Vittatin.....	39
3.2.4.1	Fyzikální a chemické vlastnosti vittatinu	39
3.2.4.2	Zdroje vittatinu	40
3.2.4.3	Biologické aktivity vittatinu.....	41
3.3	Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů	41

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	50
4.1	Použitý materiál a chemikálie.....	50
4.1.1	Použitá rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla	50
4.1.2	Rostlinný materiál	51
4.1.3	Stacionární fáze pro analytickou a preparativní TLC.....	51
4.1.4	Mobilní fáze pro analytickou a preparativní TLC	52
4.2	Použité metody.....	52
4.2.1	Metody použité při přípravě derivátů.....	52
4.2.1.1	Příprava polosyntetických derivátů	52
4.2.1.2	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	56
4.2.2	Strukturní analýza derivátů vittatinu	56
4.2.2.1	ESI-HRMS analýza.....	56
4.2.2.2	NMR analýza	56
4.2.2.3	Optická otáčivost	57
4.2.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasám.....	57
4.2.3.1	Chemikálie.....	57
4.2.3.2	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE.....	58
4.2.3.3	Pufry.....	58
4.2.3.4	Enzymy	58
4.2.3.5	Vlastní stanovení inhibiční aktivity	58
4.2.4	Stanovení protinádorové aktivity.....	59
5	VÝSLEDKY	61
5.1	Polosyntetické deriváty vittatinu, strukturní analýza.....	61
5.1.1	3-O-hexanoylvittatin (VIT 24).....	61
5.1.2	3-O-(2-nitrobenzoyl)vittatin (VIT 25)	62
5.1.3	3-O-(3-chlorobenzoyl)vittatin (VIT 26).....	63
5.1.4	3-O-pentanoylvittatin (VIT 27)	64
5.1.5	3-O-acetylvittatin (VIT 28).....	65
5.1.6	3-O-heptanoylvittatin (VIT 29)	66
5.1.7	3-O-oktanoylvittatin (VIT 30)	67
5.1.8	3-O-benzylvittatin (VIT-O-1).....	68
5.1.9	3-O-(2-chlorobenzyl)vittatin (VIT-O-2).....	69
5.2	Výtěžnost reakcí	70
5.3	Inhibiční aktivita proti AChE a BuChE	70

5.4	Protinádorová aktivita	72
6	DISKUZE A ZÁVĚR	73
7	POUŽITÁ LITERATURA	76
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
9	SEZNAM TABULEK	86
10	ABSTRAKT	87
11	ABSTRACT	88

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Amaryllidaceae alkaloid(y)
AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
AIA	antigenem indukovaná artritida
BuChE	butyrylcholinesterasa
CIA	kolagenem indukovaná artritida
DMARDs	nemoc modifikující antirevmatická léčiva
EC ₅₀	poloviční efektivní koncentrace
GSK-3β	glykogen syntasa kinasa-3β
HDAC2	histondeacetylasa 2
HEB	hematoencefalická bariéra
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CH ₂ Cl ₂	dichlormethan
CHCl ₃	chloroform
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická rezonance
p53	tumor supresorový gen
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PAMPA	paralelní test propustnosti umělé membrány
POP	prolyloligopeptidasa
Rh-123	rhodamin-123 (fluorescenční barvivo)
TLC	tenkovrstvá chromatografie

Tabulka 1: Seznam buněčných linií uvedených v textu diplomové práce

Buněčné linie (BL)	
Zkratka	Název
HT29	Adenokarcinom tlustého střeva
H460	Nemalobuněčný karcinom plic
RXF393	Karcinom ledviny
MCF7	Karcinom prsu
OVCAR3	Adenokarcinom vaječníků
L6	BL z potkaních kosterních myoblastů
Jurkat	Akutní leukémie T-buněk
MOLT-4	Akutní lymfoblastická leukémie
A549	Epiteliální karcinom plic
PANC-1	Epiteliální karcinom slinivky břišní
A2780	Epiteliální karcinom vaječníků
HeLa	Karcinom děložního hrdla
SAOS-2	Osteosarkom
MRC-5	Nenádorová BL – zdravé plicní fibroblasty
Vero	BL odvozená z ledvin africké zelené opice (kočkodan – <i>Cercopithecus aethiops</i>)
HepG2	Hepatoceulární karcinom
P-388	BL myší lymfocytární leukémie
BL6	BL myšího melanomu
Hs578T	Karcinom prsního epitelu
MDA-MB-231	Adenokarcinom prsu
HCT-15	Adenokarcinom tlustého střeva
SK-MEL-28	Maligní melanom
L5178 MDR	BL myšího lymfomu
SW1573	Karcinom plic
T47-D	Karcinom prsu
WiDr	Karcinom tlustého střeva

1 ÚVOD

Lidé se odjakživa snaží léčit neduhy pomocí přírodních látek. Zpočátku je užívali ve směsi v podobě různých rostlinných nebo živočišných drog, buď přímo nebo ve formě léčivých přípravků. S rozvojem chemie, a především fytochemie, se objasnilo, co stojí za léčivými účinky rostlin. Je to řada primárních a sekundárních metabolitů, které mají nejrůznější biologické účinky. Mezi jedny z nejdůležitějších a biologicky velmi aktivních látek patří alkaloidy.

Alkaloidy jsou přírodní látky organické povahy a ve své struktuře obsahují dusík nejčastěji vázaný v heterocyklu. Jedná se o sekundární metabolity rostlin, které na rozdíl od primárních metabolitů nejsou nezbytné pro základní životní funkce. Prekurzory syntézy alkaloidů jsou obvykle aminokyseliny. Výskyt alkaloidů je typický ve vyšších rostlinách, avšak identifikovány byly i u kapradin, například u plavuní a přesliček, a dokonce i u některých hub jako jsou námelové alkaloidy produkované paličkovicí nachovou, *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. (Clavicipitaceae). U živočichů se alkaloidy vyskytují pouze výjimečně. V živočišném organismu se mohou objevit, když je alkaloid přijímán potravou nebo ho umí sám syntetizovat, jako je tomu v případě exkretů kožních žláz mloka nebo stonožky, u které působí jako repelent. Úloha alkaloidů pro rostlinu dosud není zcela objasněna. Jejich přítomnost může plnit ochrannou funkci rostliny před parazity, chorobami a okusu býložravci.

Jak již bylo řečeno, alkaloidy disponují velkou řadou biologických účinků, které mohou být často až toxické, samozřejmě v závislosti na dávce. Účinek alkaloidů může být i druhově selektivní, kdy například listy rulíku jsou pro člověka toxické, ale pro králíka nikoli, jelikož má v krvi enzym, který dokáže L-hyoscyamin rozštěpit na kyselinu tropovou a tropin. Již zmíněný L-hyoscyamin má spasmolytické a mydriatické účinky a používá se ve formě racemické směsi jako atropin v očním lékařství. Ze skupiny námelových alkaloidů se ergometrin uplatňuje jako uterotonikum k zastavení děložního krvácení v porodnictví a pro zvládnutí migrenózních stavů je používán ergotamin. Kurare obsahuje směs alkaloidů, které stojí za účinkem šířového jedu, jenž vyvolává postupné ochrnutí svalstva včetně dýchacích svalů, čehož je využíváno indiány při lovu zvěře. Při zevním použití kapsaicin dráždí nervová zakončení v kůži a vyvolává pocit tepla a prokrvení, a proto se používá ve formě náplastí při revmatismu, neuralgiích a neuropatických bolestech. Dalším příkladem jsou alkaloidy opia, morfin a kodein. S indikací těchto dvou látek se můžeme běžně setkat v praxi, kdy je morfin používán jako

analgetikum-anodynum a kodein disponuje účinky analgetickými a antitusickými. Tlumí tedy dráždivý kašel. V klinické praxi našel indikaci i galanthamin, Amaryllidaceae alkaloid, a to v terapii Alzheimerovy nemoci (AD), kdy galanthamin působí jako kompetitivní reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy (AChE). [1] [2]

Amaryllidaceae alkaloidy (AA) jsou specifickou skupinou alkaloidů, které se takřka výhradně nacházejí v čeledi Amaryllidaceae, podle které dostaly i svůj název. Doposud bylo izolováno a popsáno více než 500 AA různé chemické struktury, podle které se řadí do jednotlivých typů. Mezi nejdůležitější a nejprozkoumanější rody této čeledi patří: *Narcissus* L., *Galanthus* L., *Lycoris* Herb., *Haemanthus* L. a *Nerine* Herb. Dalším zajímavým rodem je rod *Hippeastrum* Herb., který obsahuje AA jako jsou haemanthamin, lykorin, homolykorin, montanin, ambellin, galanthamin a vittatin. Některé z nich vykazují významnou cytotoxickou aktivitu a řadu dalších biologických účinků, jako jsou účinky antibakteriální, antivirové a antiprotozoální. Díky jejich chemické struktuře je také možno připravit polosyntetické deriváty, a tak ovlivnit jejich vlastnosti.

Příprava chemických derivátů přírodních látek je jedna z cest, jak najít nová a bezpečná léčiva. Touto cestou lze změnit farmakologické a farmakokinetické vlastnosti dané látky. Látka se může stát aktivnější, může se ovlivnit její prostupnost nebo odstranit či zmírnit její negativní působení v organismu. Již z praxe je známá řada derivátů alkaloidů, které se v dnešní době úspěšně používají v terapii nejrůznějších onemocnění. Příkladem je syntetický derivát fyzostigminu, rivastigmin, který se používá v terapii AD. K přípravě rivastigminu vedly nevýhodné vlastnosti fyzostigminu, jako je nízký terapeutický index a krátký biologický poločas.

Od cytotoxických vinka alkaloidů byly odvozeny analogy vinorelbin a vinflunin, jejichž mechanismus účinku spočívá ve vazbě na tubulin a následné inhibici mitózy během metafáze buněčného cyklu. V terapii různých nádorových onemocnění se dále uplatňuje paklitaxel získávaný polosyntetickou cestou z 10-deacetylbatatinu III, který je izolován z jehlic tisu červeného, *Taxus baccata* L. (Taxaceae). Mimo jiné syntéza derivátů může pomoci objasnit vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou látek. [3] [4]

Jak již bylo uvedeno, i z některých AA byly připraveny polosyntetické analogy, které zatím nejsou používány, ale již ukázaly zajímavé výsledky. Mezi ty nejdůležitější patří deriváty haemanthaminu, lykorinu, ambellinu a vittatinu.

2 CÍL PRÁCE

Hlavní náplní diplomové práce byla příprava polosyntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu pro studium vztahu struktura účinek, identifikace jejich struktur a hodnocení jejich biologických aktivit.

Dílčí cíle diplomové práce zahrnují úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na téma rod *Hippeastrum* a biologické aktivity alkaloidů a jejich derivátů existujících v tomto rodě a shrnout současné znalosti na toto téma.
- 2) Příprava polosyntetických derivátů vittatinu a jejich identifikaci.
- 3) Stanovení biologických aktivit připravených derivátů.
- 4) Vyhodnocení výsledků a vypracování diplomové práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ČELEĎ AMARYLLIDACEAE

3.1.1 Charakteristika čeledi

Čeleď Amaryllidaceae zahrnuje asi 65 rodů a cca 850 druhů, avšak udávané počty rodů a druhů se mohou lišit podle zdroje informací. Rostliny této čeledi jsou volně rozšířeny v mírných, subtropických i tropických oblastech. Nejvíce se vyskytují v jižní Africe, Jižní a Střední Americe a na evropském kontinentu v oblasti Středomoří. Mnozí ze zástupců se pěstují i pro okrasné účely, například klívie, která je označována jako řemenatka díky vzhledu svých listů. Mezi nejrozšířenější a nejznámější rody patří: *Leucojum* L., *Galanthus* L., *Narcissus* L., *Crinum* L., *Amaryllis* L., *Clivia* L. *Haemanthus* L., *Hippeastrum* Herb., *Sternbergia* Waldst. & Kit., *Agapanthus* L'Her. a mnoho dalších. [5][6][7]

Také na území České republiky se můžeme setkat s některými zástupci této čeledi, jimiž je například sněženka podsněžník (*Galanthus nivalis* L.), bledule jarní (*Leucojum vernum* L.) a různé druhy rodu *Narcissus* L. [8], které zkrášlují zahrady a parky každý rok na jaře.



Obrázek 1 zleva – *Galanthus nivalis* L., *Leucojum vernum* L.

Zástupci čeledi Amaryllidaceae jsou vytrvalé byliny. Charakteristickým rysem jsou pro ně podzemní orgány ve formě oddenků, hlíz nebo cibulí. Stonek mají zpravidla bezlistý a listy vyrůstají rovnou z cibulí, hlíz či oddenků. Tvar listů bývá úzký mečovitý a jsou podélně čárkovité. Květy amaryllidových jsou oboupohlavné, pravidelné a se spodním semeníkem, který je tvořen třemi plodolisty. Okvětí se skládá nejčastěji ze 6 lístků a tyto lístky mohou být

srostlé. Květy u většiny zástupců této čeledi obsahují šest tyčinek a plodem amarylkovitých je tobolka nebo bobule. [5]

Rostliny čeledi Amaryllidaceae produkují specifické alkaloidy, takzvané Amaryllidaceae alkaloidy, díky kterým na sebe tato čeleď upoutala vědeckou pozornost. Tyto látky jsou přítomny v celé rostlině, ale jejich nejvyšší koncentrace se nachází v podzemní části rostlin. První použití alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je datováno již ve 4. století př. n. l., kdy Hippokrates s Kósu aplikoval extrakt z narcisu bílého (*Narcissus poeticus* L.) v terapii děložních nádorů. Z rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo izolováno již více než 500 látek alkaloidní povahy s řadou významných biologických účinků. Prvním izolovaným alkaloidem byl lykorin, který vykazuje silný cytotoxický efekt. Další velice významný alkaloid je galanthamin, který se používá již v klinické praxi v terapii AD jako inhibitor acetylcholinesterasy. AA ovlivňují i řadu dalších fyziologicky významných enzymů, jako například butyrylcholinesterasu (BuChE) a prolyloligopeptidasu (POP) a mimo jiné působí také antibakteriálně, antivirotický, antimykotický nebo antimalarický. [8]

3.2 ROD HIPPEASTRUM

3.2.1 Charakteristika rodu *Hippeastrum*

Rod *Hippeastrum* je jedním z mnoha rodů patřících do čeledi Amaryllidaceae. Jeho taxonomické zařazení znázorňuje tabulka 2.

Tabulka 2: Taxonomické zařazení rodu *Hippeastrum* [11]

	Latinsky	Česky
Třída	Liliopsida	Jednoděložné rostliny
Řád	Asparagales	Chřestotvaré
Čeleď	Amaryllidaceae	Amarylkovité
Podčeleď	Amaryllidoideae	Amarylkové
Rod	<i>Hippeastrum</i>	Hvězdník

Zástupci rodu *Hippeastrum*, česky hvězdník, bývají často mylně označováni jako amarylis. Amarylis je název rostlinného druhu *Amaryllis belladonna* L. [12] Tento druh je taktéž řazen do čeledi Amaryllidaceae, avšak nepatří do rodu *Hippeastrum*. *Amaryllis belladonna* L. představuje jediného zástupce rodu *Amaryllis*, česky nazývaného jako zornice. Pro tuto rostlinu je typický výskyt v Kapské oblasti Jižní Afriky. Rozdíl mezi rostlinami těchto dvou

zmiňovaných rodů spočívá ve stavbě stonku. U *Hippeastrum* je stonek dutý kdežto u *Amaryllis* nikoli. [13][14][15]

Rod *Hippeastrum* zahrnuje asi 70 druhů. Udávaný počet druhů se ale může se zdrojem informací lišit. Druhy rodu *Hippeastrum* se typicky vyskytují v tropickém a subtropickém klimatu na území Jižní Ameriky, konkrétně v Brazílii a Peru. Ve zmíněných lokalitách se hvězdníky pěstují volně v zahradách a pěstovány jsou i v květináčích. Hvězdníky také úspěšně zavítaly na Evropský kontinent, kde se v Holandsku a Dánsku pěstují především za účelem řezu. Zároveň jsou okrasou parapetu mnoha evropských domácností. [12] [15]

V současné době převažuje pěstování hybridních odrůd, které jsou vyšlechtěny ze dvou počátečních druhů, a sice *Hippeastrum vittatum* Herb. a *Hippeastrum leopoldii* Dombran. [12]

Rod *Hippeastrum* zahrnuje vytrvalé rostliny, jejichž podzemní část je tvořena cibulemi. Cibule jsou velké a dorůstají v průměru až 13 cm. Pro rostlinu cibule představují zásobárnu vody a živin v období sucha. Mečovitě listy jsou bezřapíkaté a vyrůstají přímo z cibule a svojí délkou dosahují až 70 cm. Kromě listů z cibule vyrůstá také dutý, bezlistý a nevětvený stonek (stvol). Počet stonků je obvykle 1 až 2 a každý je zakončen květem nebo květenstvím skládajícím se ze 2-10 květů. Květenství bývá uspořádáno do okolíku, ve kterém květy zaujímají vzpřímenou, vodorovnou nebo visící pozici. Květy rostlin rodu *Hippeastrum* hrají všemi barvami. Jsou známy druhy s červenými, bělavými, žlutými i pruhovanými či žíhanými květy. Na povrchu okvětí se nacházejí chomáčky chlupů. Samčí pohlavní orgány, tyčinky, jsou připojeny k okvětní trubici a je jich obvykle 6. Směrem z květu se nejdříve odkloní dolů a na svém konci jsou zahnuté směrem nahoru. Tyčinky jsou tvořeny nitkou a prašníkem, ve kterém vznikají pylová zrna. Samičím pohlavním orgánem je pestík. Skládá se z blizny, čnělky a semeníku, ve kterém vznikají vajíčka. Plodem je kulovitá tobolka či tobolky skládající se ze 3 laloků. Semena jsou černá a zploštělá. [9] [10]

3.2.2 Vybraní zástupci rodu *Hippeastrum*

Zástupci byli vybráni na základě provedené rešerše článků týkajících se fytochemických studií a biologických aktivit rostlin tohoto rodu. Nejzajímavějších 9 je zde uvedeno.

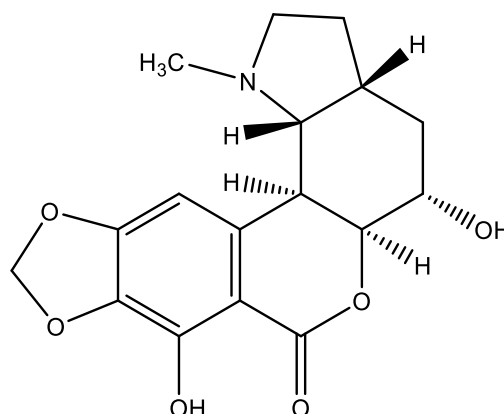
3.2.2.1 *Hippeastrum argentinum* (Pax) Hunz.

Hippeastrum argentinum je také známa pod synonymy jako je *Amaryllis argentina* (Pax) Ravenna, *Amaryllis candida* (Staph) Traub&Uphof, *Crinum argentinum* Pax, *Hippeastrum tucumanum* E. Holmb. Pro tuto rostlinu jsou charakteristické bílé květy. [16] [17]

Z cibulí tohoto druhu byly izolovány dva nové alkaloidy, 4-*O*-methylnangustin a 7-hydroxyklivonin, zastupující montaninový a homolykorinový typ alkaloidů. Společně s nimi byly izolovány i další čtyři již známé alkaloidy – lykorin, montanin, pankracin a hamayn. Uvedené izolované látky byly *in vitro* testovány na inhibiční efekt proti AChE a BuChE. Původ enzymů byl v případě AChE z elektrického úhoře a BuChE byla získána z koňského séra. Výsledky provedené studie byly vyjádřeny jako IC₅₀ v μM. IC₅₀ je koncentrace, při které je enzym inhibován z 50 %. Jako kontrolní vzorek byl použit galanthamin. Výchozí chloroformový (CHCl₃) extrakt měl mírnou aktivitu proti AChE a slabou proti BuChE. 7-hydroxyklivonin vykazoval slabou inhibici AChE a až střední inhibiční aktivitu proti BuChE, což značí vyšší selektivitu 7-hydroxyklivoninu vůči BuChE. Zároveň se jedná o doposud nejvyšší naměřenou inhibiční aktivitu u alkaloidu homolykorinového typu. Hodnoty inhibičních koncentrací jsou shrnuty v tabulce 3. [18]

Tabulka 3: IC₅₀ (μM) alkaloidů izolovaných z *H. argentinum*

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BuChE
4- <i>O</i> -methylnangustin	>200	>200
7-hydroxyklivonin	114,07 ± 0,08	97,3 ± 0,09
CHCl ₃ extrakt	50,2 ± 0,12 (μg/ml)	115,5 ± 0,13 (μg/ml)
Galanthamin	0,48 ± 0,03	22,39 ± 0,09



Obrázek 2 *Hippeastrum argentinum* [16], struktura 7-hydroxyklivoninu [18]

3.2.2.2 *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb.

Hippeastrum aulicum představuje epifytický druh. Termín epifyt označuje vyšší rostliny, které nekoření v půdě a vyrůstají nad její úrovní, typicky na větvích a kmenech stromů. [16] [19]

Existují dvě odrůdy – var. *glaucophyllum* a var. *platypetallum* a dvě formy – f. *robustum* a f. *stenopetallum*. *Hippeastrum aulicum* f. *robustum* je, jak napovídá i název, nápadná velkými robustními listy a květy. [16]

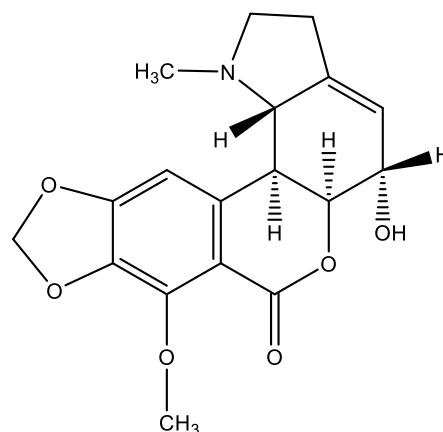
Rostlina obsahuje alkaloidy lykorinového typu – lykorin, pseudolykorin, galanthin, norpluviin, narcissidin. Dále obsahuje alkaloidy montanin, ambellin a chlidanthin. [20]



Obrázek 3 *Hippeastrum aulicum* var. *robustum* [21]

3.2.2.3 *Hippeastrum morelianum* Lem.

Ze 2 kilogramů čerstvých cibulí této rostliny bylo macerací v 96% ethanolu při pokojové teplotě získáno 100 gramů surového extraktu. Po přečištění tohoto extraktu následovala izolace alkaloidů prostřednictvím preparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC) a vakuové kapalinové chromatografie. Z cibulí *H. morelianum* byly izolovány tyto alkaloidy: 2 α ,7-dimethoxyhomolykorin, kandimin, tazettin, pretazettin, 3-*epi*-makronin, haemanthamin, hamayn a trispheridin. [22] O jejich aktivitách pojednává další kapitola.



Obrázek 4 *Hippeastrum morelianum* [23], struktura kandiminu

3.2.2.4 *Hippeastrum vittatum* (L'HÉR.) Herb.

Extrakty z cibulí druhu *Hippeastrum vittatum* byly podrobeny *in vitro* studii na cytotoxickou aktivitu proti pěti humánním nádorovým buněčným liniím – adenokarcinom tlustého střeva HT29, nemalobuněčný karcinom plic H460, karcinom ledviny RXF393, karcinom prsu MCF7 a epiteliální karcinom vaječníků OVCAR3. U dichlormethanového (CH_2Cl_2) a *n*-butanolového extraktu se potvrdila výrazná antiproliferativní aktivita vůči všem testovaným buněčným liniím. Z *H. vittatum* byly v čisté formě izolovány dva alkaloidy, montanin a vittatin, které taktéž byly hodnoceny na protinádorové působení proti zmíněným buněčným liniím a vyšší cytotoxicitu prokázal montanin, který je pravděpodobně i zodpovědný za aktivitu extraktů. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} (mg/ml) a shrnuty v tabulce 4. [24]

Tabulka 4: Cytotoxická aktivita extraktů a alkaloidů izolovaných z *H. vittatum* [24]

vzorek	Buněčné linie:				
	HT29	H460	RXF 393	MCF7	OVCAR3
CH_2Cl_2 extrakt	$0,68 \pm 0,21$	$0,62 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,52$	$1,60 \pm 0,34$	$0,84 \pm 0,29$
<i>n</i> -butanolový extrakt	$4,08 \pm 0,61$	$3,34 \pm 0,30$	$2,93 \pm 0,60$	$3,74 \pm 0,29$	$3,56 \pm 0,25$
montanin	$0,71 \pm 0,10$	$0,57 \pm 0,57$	$0,65 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,11$
vittatin	$21,91 \pm 1,61$	$15,88 \pm 3,28$	$29,57 \pm 12,66$	nestanoveno	nestanoveno

U montaninu získaného z rostliny *H. vittatum* byl proveden psychofarmakologický screening, při kterém bylo zjištěno, že snižuje pohybovou aktivitu a má sedativní, anxiolytické,

antikonvulzivní a antidepresivní účinky u myši. Více informací o provedení screeningu a vyhodnocení získaných dat je dostupných ve článku s názvem Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*, z roku 2006. [25]



Obrázek 5 *Hippeastrum vittatum* [26]

3.2.2.5 *Hippeastrum papillio* (Ravenna) Van Scheepen

Ze 2 kilogramů čerstvých cibulí *Hippeastrum papillio*, které byly rozemlety a macerovány v 96% ethanolu po dobu 48 hodin při pokojové teplotě, bylo po odpaření za sníženého tlaku získáno 50 g surového extraktu. Po jeho přečištění pomocí acidobazického vytřepání byly získány tři extrakty označené písmeny A, B a C, které se mezi sebou lišily použitým rozpouštědlem pro extrakci. Pro extrakt A byl použit *n*-hexan, pro extrakt B ethylacetát a pro extrakt C byla použita směs ethylacetátu a methanolu v poměru 3:1. Z extraktu A byl krystalizací z acetonu získán galanthamin. Extrakt B byl rozdělen do tří frakcí, z nichž frakce I obsahovala 150 mg galanthaminu a získán byl opět krystalizací z acetonu. Nicméně v rámci článku provedené studie není uvedeno celkové množství izolovaného galanthaminu. Dále došlo k izolaci 11 β -hydroxygalanthaminu, který byl hodnocen na inhibiční aktivitu proti AChE elektrického úhoře a získané hodnoty IC₅₀ činily 14,50 \pm 0,33 μ M. Mimo dva uvedené alkaloidy se v rostlině dále vyskytoval narwedín, haemanthamin, 11-hydroxyvittatin, 8-*O*-demethylmaritidin a vittatin. Extrakce alkaloidů byla provedena i z jednoho kilogramu čerstvých listů *H. papillio*, ale nedošlo k izolaci žádných nových alkaloidů, než které byly získány doposud. [27]



Obrázek 6 *Hippeastrum papillio* [28]

3.2.2.6 *Hippeastrum reticulatum* Herb.

Z rostliny *Hippeastrum reticulatum* bylo celkem izolováno 12 alkaloidů. Osm z nich bylo již popsáno, avšak zbývající čtyři sloučeniny byly izolovány poprvé. Jednalo se o isoretikulinin, retikulinin, 6α -hydroxymaritidin a 6β -hydroxymaritidin. 6α -hydroxymaritidin a 6β -hydroxymaritidin byly ve formě směsi epimerů testovány proti několika původcům protozoálních onemocnění a na inhibici enzymů AChE a BuChE. Hodnoceno bylo i jejich cytotoxické působení. Retikulinin a isoretikulinin se nepodařilo získat v dostatečném množství, a tak nebyly podrobeny hodnocení biologické aktivity.

Antiprotozoální účinek epimerní směsi byl nízký proti všem testovaným parazitům. Nejlepší aktivita byla proti *Trypanosoma cruzi* s hodnotou $IC_{50} = 66,11 \mu\text{g/ml}$, která ale i tak byla nízká ve srovnání s benznidazolem, jehož IC_{50} je $1,08 \mu\text{g/ml}$. U směsi již zmíněných epimerů byla stanovena i cytotoxicita proti savčí buněčné linii L6, která byla získaná z potkaních kosterních myoblastů. Ve srovnání s cytotoxickým podofylotoxinem ($IC_{50} = 0,007 \mu\text{g/ml}$) je cytotoxické působení testované směsi nízké ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$). *In vitro* hodnocení inhibičních aktivit proti AChE a BuChE ukázalo, že směs epimerů inhibuje AChE pouze slabě, $IC_{50} = 90,43 \pm 4,26 \mu\text{M}$, a vůči BuChE je neaktivní. Jako pozitivní kontrola byl použit galanthamin. [29]

V rámci jiné studie alkaloidní extrakt *Hippeastrum reticulatum* ukázal *in vitro* inhibiční aktivitu proti AChE s hodnotami $IC_{50} = 39,85 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$. Dále byly provedeny *in vivo* testy na myších, kde bylo sledováno jejich chování po aplikaci extraktu v dávce 15 mg/kg. Výsledky

ukázaly, že extrakt ovlivnil krátkodobou paměť, vedl ke zlepšení deficitu paměti a rozpoznávání, avšak neměl vliv na pohybovou aktivitu myši. [30]



Obrázek 7 *Hippeastrum reticulatum* [31]

3.2.2.7 *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Voss.

Hippeastrum puniceum je okrasná rostlina, jejíž čerstvé cibule se v tradiční medicíně používají k hojení ran, terapii nádorů, hemoroidů a při léčbě zánětlivých poruch a otoků. [32]

Z druhu *H. puniceum* byl izolován alkaloid 3-*O*-acetylnarcissidin, u kterého byly zjištěny protipožerové a toxické účinky, kterými se podobá methyllykakonitinu. Methyllykakonitin působí jako konkurenční antagonist na nikotincholinergních receptorech hmyzu a obratlovců, z čehož lze přepokládat možné působení studovaného alkaloidu i na člověka. Na *Spodoptera littoralis*, hmyzího škůdce mnoha pěstovaných plodin, však 3-*O*-acetylnarcissidin působil sice protipožerově, za to ne toxicky. Současně byla studována fytotoxická aktivita, při které bylo pozorováno zpomalení kořenového růstu, vývoje kořenů a klíčení několika druhů plevelu a plodin. [33]



Obrázek 8 *Hippeastrum puniceum* [34]

3.2.2.8 *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb

Jedná se o brazilský endemický druh, který je ohrožený vyhynutím. V tradiční medicíně existují záznamy o používání této rostliny ve formě vodného extraktu z kořenů, cibulí či listů. Vodný extrakt z kořenů, které vyrůstají z cibule, vykazuje detoxikační a afrodiziakální účinky, které jsou popisovány jako vzrušující. Jako afrodiziakum pro navození erekce působí i vodný extrakt z cibulí *H. psittacinum*, které je také označováno a známo pod názvem Alho-bravo nebo Alho-do-campo. Extrakt z listů našel uplatnění v lidovém léčitelství, konkrétně v léčbě kašle.

In vitro studie prokázaly AChE inhibiční aktivitu, která byla nejméně výraznější u surového ethanolového extraktu z cibulí tohoto druhu s hodnotami $IC_{50} = 11,20 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$. U rostliny byla také zaznamenána slabá antioxidační aktivita, nízká cytotoxicita a výrazný protizánětlivý potenciál, který pravděpodobně zodpovídá za schopnost neuroprotektce ethanolového extraktu *H. psittacinum*. [35] [36] [37]



Obrázek 9 *Hippeastrum psittacinum* [38]

3.2.2.9 *Hippeastrum* cv. Ferrari

Tento kultivar se vyznačuje velkými sytě červenými květy, které se vyskytují v počtu 4 až 5 na jednom stonku a mají tvar hvězdy. Doba kvetení je okolo 15 dní. *Hippeastrum* cv. Ferrari je nápadný svojí výškou, která dosahuje až 63 cm, pro kterou je využíván jako řezaná květina. Také listy vynikají svojí délkou, která se pohybuje okolo 49 cm a obvykle je jejich počet v rozmezí 4–5. [39]

Výhoda pěstování kultivarů rodu *Hippeastrum* spočívá v dobré dostupnosti přírodních zdrojů pro produkci a získávání velkého množství Amaryllidaceae alkaloidů. Kultivar Ferrari byl podroben společně s dalšími pěti kultivary (Pretty Nymph, Artic Nymph, Daphne, Double

King a Spartacus) fytochemické studii. V extraktu z cibulí bylo identifikováno dvacet sloučenin s hmotnostními spektry typickými pro AA. Z toho osmnáct alkaloidů bylo popsáno na základě hmotnostních spekter, retenčního času a retenčního indexu. Jednalo se především o látky zastupující krininový, haemanthaminový, galanthaminový, homolykorinový, lykorinový, montaninový a tazettinový strukturní typ AA.

Za použití preparativní TLC bylo ze zmíněných kultivarů izolováno pět AA v čisté formě, které lze najít i v *H. cv. Ferrari*. U třech z nich, montaninu, vittatinu a hippeastrinu, bylo provedeno hodnocení protinádorové aktivity za použití devíti lidských nádorových buněčných linií a jedné nenádorové (MRC-5), aby byla zjištěna případná toxicita na nenádorové buňky. Alkaloidy byly testovány v koncentraci 10 μM . Alkaloid montanin působil nejvíce cytotoxicky ze třech testovaných alkaloidů. Nejvyšší aktivitu prokázal montanin proti buňkám Jurkat, MOLT-4 a A549. Výsledné hodnoty IC_{50} jsou shrnuty v tabulce 5. [13]

Tabulka 5: Hodnoty IC_{50} montaninu na rakovinné a nerakovinné buňky

Buněčná linie	IC_{50} (μM)
Jurkat	1,04 \pm 0,14
MOLT-4	1,26 \pm 0,11
A549	1,09 \pm 0,31
HT-29	1,35 \pm 0,47
PANC-1	2,30 \pm 0,45
A2780	1,67 \pm 0,29
HeLa	1,99 \pm 0,22
MCF-7	1,39 \pm 0,21
SAOS-2	1,36 \pm 0,49
MRC-5	1,79 \pm 0,50

Hippeastrum cv. Ferrari bylo následně podrobena větší fytochemické studii, při které došlo k izolaci 14 AA. Po identifikaci alkaloidů pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem, vysokoúčinné hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance, byla jejich struktura určena jako montanin, haemanthamin, tazettin, 1,2-*O,O'*-diacetyl-dihydrolykorin, ismin, 3-*epi*-makronin, vittatin, lykorin, homolykorin, 11-hydroxyvittatin, pankracin, 9-*O*-demethylhomolykorin, dihydrolykorin a zephyranthin. [40]



Obrázek 10 *Hippeastrum* cv. *Ferrari* [41]

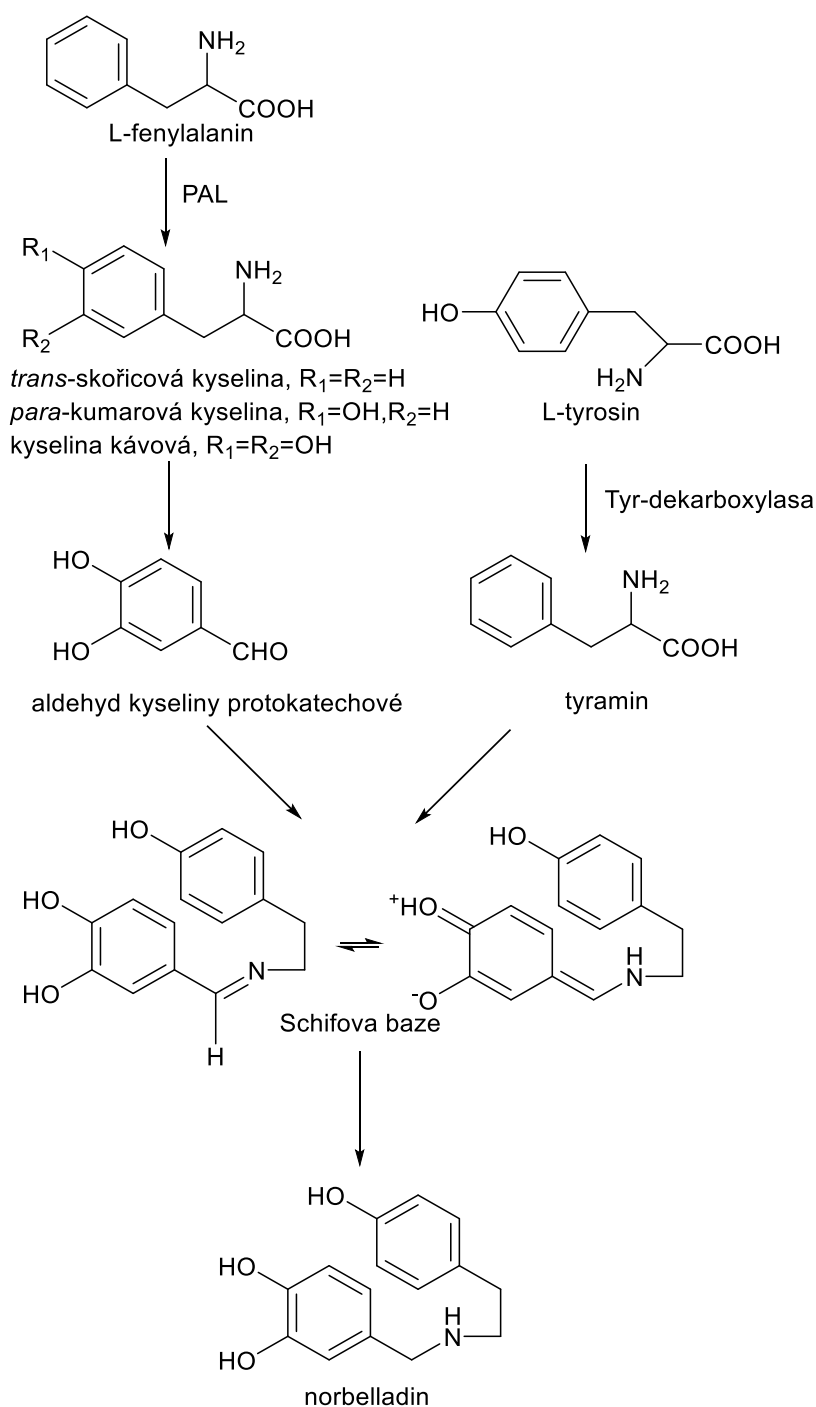
3.2.3 Amaryllidaceae alkaloidy

Jak již bylo řečeno, AA jsou rozsáhlou skupinou specifických alkaloidů vyskytujících se především v čeledi Amaryllidaceae, kam patří i rod *Hippeastrum*.

Alkaloidy jsou lokalizovány v celé rostlině. Nacházet se mohou jak v podzemních, tak i v nadzemních částech rostliny, jako jsou listy, stonky a květy. V mnoha případech je nejvyšší koncentrace alkaloidů přítomna v podzemních orgánech rostliny, kdy tyto části jsou hojně využívány pro izolaci alkaloidů. Vedle alkaloidů se v rostlinách nacházejí i jiné sekundární metabolity, jako jsou například flavonoidy a saponiny.

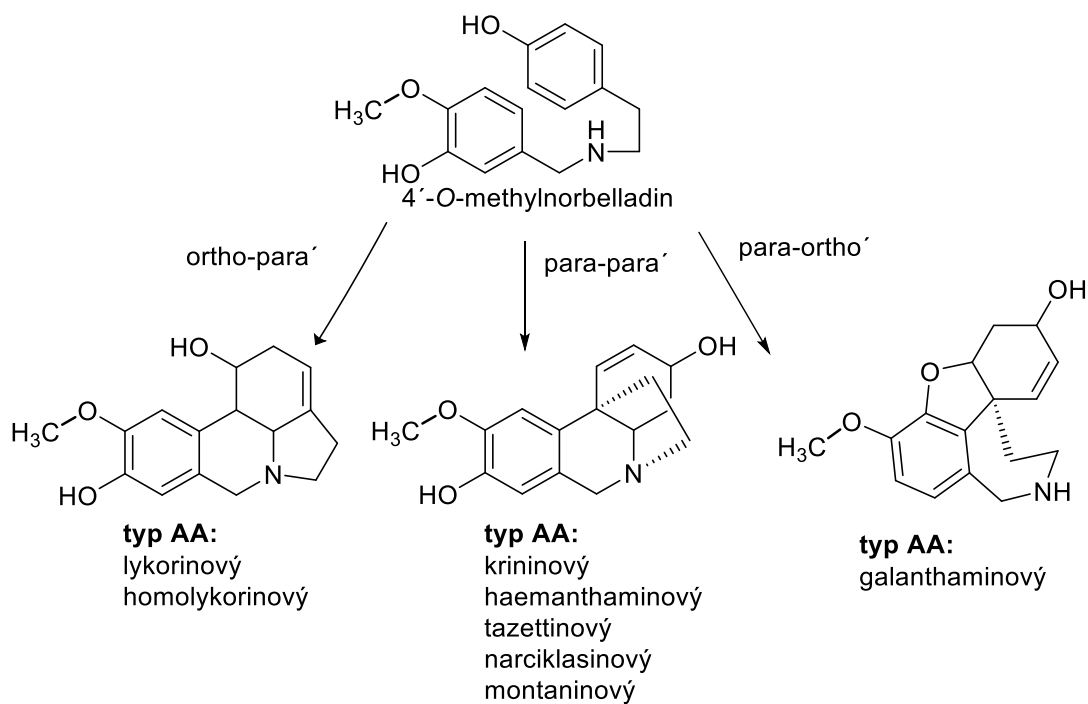
Základem struktury AA je isochinolinový skelet, který je základní strukturou i dalších alkaloidů jako jsou papaverin, noskapin, berberin, jatrorrhizin, morfin, thebain a emetin. [1]

Prekurzory pro biosyntézu těchto alkaloidů jsou deriváty aromatické aminokyseliny L-fenylalaninu a tyramin odvozený od L-tyrosinu. Přeměna výchozích substancí probíhá prostřednictvím enzymů fenylalaninamoniaklyasy (PAL) a tyrosindekarboxylasy, za vzniku meziproductů. Tyto meziproducty následnou kondenzací dávají vzniknout tetrahydroisochinolinovému jádru norbelladinu, který je společným výchozím bodem biosyntézy různých strukturních typů AA, obrázek 11.



Obrázek 11 Syntéza norbelladinu [42]

Předpokládá se, že dále následuje 4'-*O*-methylace norbelladinu za vzniku 4'-*O*-methylnorbelladinu, který slouží jako meziprodukt, ze kterého vychází více drah syntézy k různým strukturním typům AA. Dalším krokem biosyntézy AA je fenolová cyklizace 4'-*O*-methylnorbelladinu, ke které může dojít v polohách *ortho-para*, *para-ortho* a *para-para*. Vznikají tak tři základní struktury, od kterých se odvíjí tvorba různých strukturních typů AA, obrázek 12.



Obrázek 12 Fenolová oxidační cyklizace [42]

Jednotlivé kroky syntézy jsou řízeny enzymaticky, tudíž to, jaký strukturní typ a jaký konkrétní alkaloid vznikne, je dáno přítomností specifických enzymů, díky jejichž působení je produkce AA typická a ojedinělá jen pro tuto čeleď, po které nesou i název. [1] [43]

Podle chemické struktury můžeme AA rozdělit na 9 základních typů: lykorinový, homolykorinový, haemanthaminový, krinanový, tazettinový, pankratistatinový, galanthaminový, montaninový a norbelladinový, tabulka 6. [8] Jednotlivé typy budou popsány níže.

Tabulka 6: Přehled strukturních typů AA, jejich zástupců a druhů rodu *Hippeastrum*, ze kterého byly izolovány [18] [20] [44] [29]

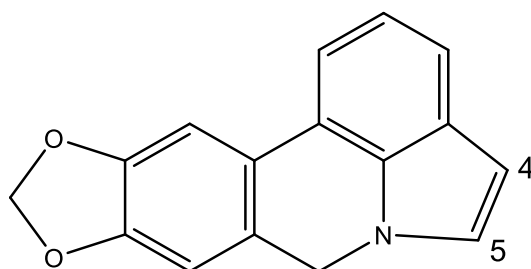
Strukturní typ	Hlavní zástupce	Alkaloidy	Druhy rodu <i>Hippeastrum</i>
lykorinový typ	lykorin	pseudolykorin galanthin pluviin norpluviin hippamin hippadin hippacin narcissidin 3- <i>O</i> -narcissidin anhydrolykorin 11,12-dehydroanhydrolykorin urgeremin isoretikulinin	<i>H. vittatum</i> <i>H. aulicum</i> <i>H. candidum</i> <i>H. equestre</i> <i>H. puniceum</i> <i>H. solandriflorum</i> <i>H. psittacinum</i> <i>H. santacatarina</i> <i>H. striatum</i> <i>H. breviflorum</i> <i>H. reticulatum</i>
homolykorinový typ	homolykorin	hippeastrin lykorenin kandimin odulin 9- <i>O</i> -demethylhomolykorin 8- <i>O</i> -demethylhomolykorin nerinin 2-hydroxyhomolykorin 2-methoxyhomolykorin 2 α ,7-dimethoxyhomolykorin deoxylykorenin 7-hydroxyklivonin	<i>H. vittatum</i> <i>H. equestre</i> <i>H. glaucescens</i> <i>H. morelianum</i> <i>H. psittacinum</i> <i>H. breviflorum</i> <i>H. argentinum</i>
haemanthaminový typ	haemanthamin	vittatin 8- <i>O</i> -demethylmaritidin 11-hydroxyvittatin maritidin hamayn	<i>H. vittatum</i> <i>H. rutilum</i> <i>H. equestre</i> <i>H. puniceum</i> <i>H. solandriflorum</i> <i>H. morelianum</i> <i>H. santacatarina</i> <i>H. papillio</i>
krininový typ	krinin	krinidin ambellin powellin undulatin krinamidin	<i>H. brachyandrum</i> <i>H. aulicum</i>
montaninový typ	montanin	panckracin 4- <i>O</i> -methylnangustin	<i>H. vittatum</i> <i>H. aulicum</i> <i>H. argentinum</i>

tazettinový typ	tazettin	3- <i>O</i> -demethyltazettin pretazettin 3- <i>epi</i> -makronin 3- <i>epi</i> -deoxytazettin deoxytazettin 6-methoxypretazettin tazettamid	<i>H. vittatum</i> <i>H. equestre</i> <i>H. morelianum</i> <i>H. psittacinum</i> <i>H. santacatarina</i> <i>H. papillio</i> <i>H. breviflorum</i>
narciklasinový typ	narciklasin	<i>N</i> -methylkrinasiadin phamin trisphaeridin	<i>H. equestre</i> <i>H. morelianum</i> <i>H. psittacinum</i> <i>H. santacatarina</i> <i>H. glaucescens</i> <i>H. striatum</i> <i>H. papillio</i> <i>H. breviflorum</i>
galanthaminový typ	galanthamin	chlidanthin <i>N</i> -formylnorgalanthamin sanguinin <i>N</i> -demethylgalanthamin 3- <i>epi</i> -norgalanthamin narwedin 11 β -hydroxygalanthamin anhydrogalanthamin	<i>H. vittatum</i> <i>H. aulicum</i> <i>H. equestre</i> <i>H. glaucescens</i> <i>H. morelianum</i> <i>H. psittacinum</i> <i>H. striatum</i> <i>H. santacatarina</i> <i>H. papillio</i>
belladinový typ	belladin	norbelladin <i>O</i> -methylbelladin	Zatím z tohoto rodu nebyl izolován

3.2.3.1 Lykorinový strukturní typ

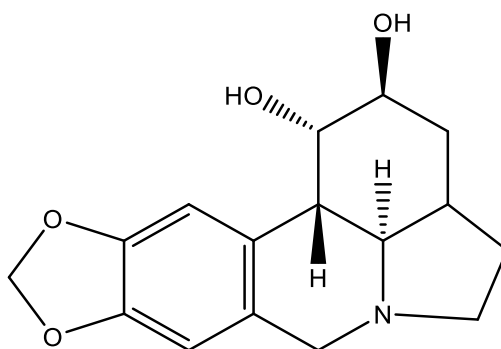
Lykorin byl izolován jako první alkaloid z čeledi Amaryllidaceae, a to již v roce 1877, z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. Z pohledu chemické struktury se jedná o pyrrollofenanthridinový cyklický alkaloid. [8]

V rodě *Hippeastrum* jsou hojně zastoupeny lykorinové alkaloidy, jako je lykorin, pseudolykorin, galanthin, pluviin, norpluviin, hippamin, hippadin, hippacin, narcissidin, 3-*O*-acetylnarcissidin, anhydrolykorin a urgeremin. [20] Dalším zástupcem je 11,12-dehydroanhydrolykorin, který byl izolovaný z *H. vittatum* a dále například z rostliny *Crinum erubescens* Aiton a z rostlin rodu *Hymenocallis* Salibs. [45] [46] [47]



Obrázek 13 Struktura 4,5-dehydroanhydrolykorinu[46]

V literatuře se můžeme setkat i s 4,5-dehydroanhydrolykorinem, kdy se jedná o molekulu strukturálně totožnou s 11,12-dehydroanhydrolykorinem. Podle pravidel číslování orthokondenzovaných heterocyklů, kdy maximální počet kruhů má být lokalizovaný na vodorovné ose x a zároveň se má nejvíce cyklů nacházet v pravém horním kvadrantu, je správně název 4,5-dehydroanhydrolykorin.



Obrázek 14 Struktura lykorinu

Lykorin je alkaloid, který je hojně zastoupen v rostlinách čeledi Amaryllidaceae. Předností alkaloidů lykorinového typu, díky které jsou intenzivně studovány, je široká škála biologických aktivit. Navíc benefitem lykorinu je to, že jeho terapeutická dávka se projevuje velmi nízkou toxicitou pro normální nenádorové buňky. U lykorinu byly prokázány účinky antileukemické, protinádorové, antiangiogenetické, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé a antimalarické. Dále byla zjištěna jeho schopnost inhibovat topoizomerasu I a hodnocen byl i jeho inhibiční efekt proti acetylcholinesterase. Bohužel prokázal pouze slabou inhibici. Lykorin dále disponuje schopností potlačit biosyntézu kyseliny askorbové a ovlivnit délku cirkadiálního rytmu ve smyslu prodloužení. [20] [48] Lykorin byl již také testován na antivirové působení proti koronaviru SARS-CoV-2 a výsledky ukázaly, že jeho působením došlo k inhibici replikace nového koronaviru, který stojí za infekčním respiračním onemocněním a zapříčinil celosvětovou pandemii, která propukla v roce 2019 v Číně. [49] Lykorin prokázal také účinek

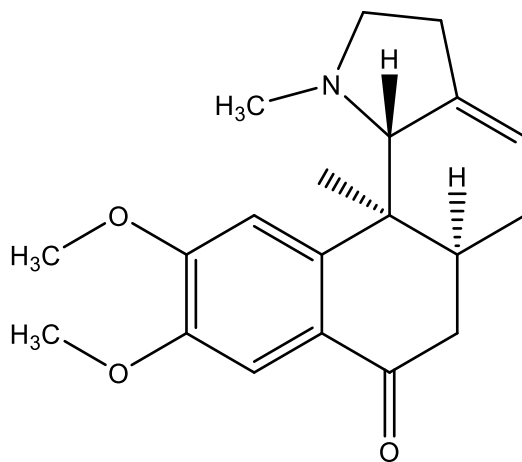
proti kobylce pouštní, *Schistocerca gregaria*, kdy došlo ke snížení požeru zelí, které bylo ošetřeno roztokem lykorinu o koncentraci 0,05 %. [50]

Anhydrolykorin byl ve formě inkluzivních komplexů s cyklodextriny studován na cytotoxicitu *in vitro* na lidských buněčných liniích rakoviny tlustého střeva a předběžné studie uvádějí, že tyto komplexy představují potenciální látky, které by se mohly uplatnit v chemoterapii tohoto typu rakoviny. [51]

Dalšími alkaloidy lykorinového typu, u kterých byla zjištěna zajímavá biologická aktivita, jsou 3-*O*-acetylnarcissidin a urgeremin. U sloučeniny 3-*O*-acetylnarcissidinu, izolované z rostliny *Hippeastrum puniceum* Lam., bylo zjištěno, že působí protipožerově na hmyzího škůdce *Spodoptera littoralis* [33] a u urgereminu byla pozorována schopnost inhibovat lidské a bakteriální topoizomerasy. [52]

3.2.3.2 Homolykorinový strukturní typ

Z pohledu chemické struktury se jedná o sloučeniny odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Mezi nejdůležitější alkaloidy tohoto typu patří homolykorin, hippeastrin, lykorenin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, kandimin a odulin. [8] [20]



Obrázek 15 Struktura homolykorinu

U hlavního zástupce, homolykorinu, bylo zjištěno antivirové působení proti retrovirům, mezi které patří virus HIV. Tento virus je původcem onemocnění označovaného jako syndrom získaného selhání imunity. [53] U sloučeniny 11C-*S*-homolykorinu byla prokázána slabá inhibiční aktivita proti lidské AChE ($IC_{50} = 63,70 \pm 4,30 \mu M$) a BuChE ($IC_{50} = 151,00 \pm 15,20 \mu M$) v porovnání se silnými inhibitory lidských cholinesteras jako je galanthamin a huperizin A. [54]

Homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin a lykorenin byly podrobeny *in vivo* studii na potkanech, která se zabývala účinkem Amaryllidaceae alkaloidů na krevní tlak. Alkaloidy

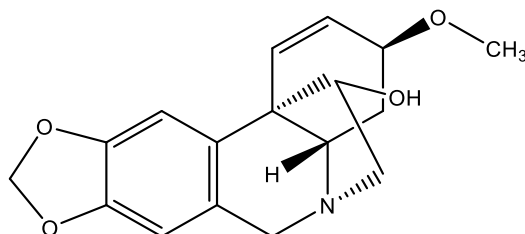
byly aplikovány intravenózně v dávkovém rozmezí od 1 do 5 mg na kilogram. U všech tří zmíněných látek byl zaznamenán hypotenzní efekt. Podobná studie proběhla již v roce 1980, kdy byl lykorenin aplikován potkanům a psům. U potkanů došlo ke snížení krevního tlaku při intravenózní dávce 7,5 mg/kg lykoreninu, zatímco u psů byl pozorován hypertenzní efekt a zvýšení srdeční frekvence při lykoreninových dávkách 5 mg/kg a 7,5 mg/kg. [55] [56]

Vedle homolykorinu prokázal antivirový efekt i alkaloid hippeastrin, který byl myším infikovaným virem Zika aplikován subkutánně v dávce 100 mg/kg denně. Tato dávka potlačovala růst Zika viru. [57] U hippeastrinu bylo zaznamenáno i protivirové působení na virus ptačí chřipky H5N1. [58] Vedle antivirového účinku má hippeastrin i účinek antiprotozoální proti parazitickému prvoku *Trypanosoma cruzi*. [59] Další schopností tohoto alkaloidu je inhibice topoizomerasy I *in vitro*. Tato schopnost byla vysvětlena molekulárním dokováním. [60] Dalším pozorovaným účinkem hippeastrinu je antimykotické působení proti kvasince *Candida albicans* a slabý protipožerový efekt na hmyz. [20] [61]

Významnou biologickou aktivitu prokázal i kandimin, který byl testován proti prvoku *Trichomonas vaginalis*, kdy bylo zjištěno, že má schopnost inhibovat enzymy charakteristické právě pro tohoto prvoka. [62] V rámci jiné studie byl kandimin izolován z cibulí *H. morelianum* a při biologickém hodnocení byla pozorována buněčná smrt *T. vaginalis*, při které došlo k výrazné tvorbě vakuol v cytoplasmě. [44] Kandimin tudíž představuje potenciální antiprotozoální léčivo nebo alespoň předlohou strukturu pro syntézu látek s tímto účinkem.

3.2.3.3 Haemanthaminový strukturní typ

Alkaloidy haemanthaminového typu svojí strukturou vycházejí z ethanofenanthridinu. [8] Do této skupiny alkaloidů patří haemanthamin, vittatin, 8-O-demethylmaritidin, 11-hydroxyvittatin a hamayn. [63]



Obrázek 16 Struktura haemanthaminu

U haemanthaminu byla *in vitro* zjištěna schopnost inhibovat replikaci retrovirů, konkrétně retroviru HIV-1. [53] Antivirové působení tohoto alkaloidu bylo pozorováno také proti viru ptačí chřipky, kdy výsledky byly vyjádřeny jako EC₅₀, což je efektivní koncentrace,

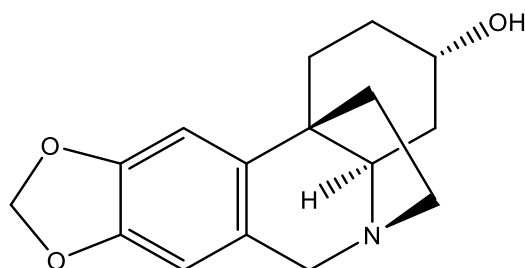
kteřá je potřeba k dosažení 50% účinku testované látky. Zjištěné hodnoty EC_{50} haemanthaminu byly $1,48 \pm 0,00 \mu\text{M}$. Tyto hodnoty potvrdily silné antivirové působení, a proto se studoval i antivirový mechanismus účinku haemanthaminu, který pravděpodobně spočívá v inhibici komplexu ribonukleoproteinu v jádře během replikace viru. [58] Haemanthamin má dále antikancerózní účinky. Tyto účinky byly prokázány i u buněk, které jsou odolné vůči vyvolání apoptózy, a tak se předpokládá, že mechanismus účinku haemanthaminu je jiný. Ve studii, která se zabývala objasněním mechanismu protirakovinného účinku tohoto alkaloidu bylo zjištěno, že haemanthamin působí na velké ribozomální podjednotce, zároveň inhibuje biogenezi ribozomu, působí jako spouštěč nukleárního stresu a vede ke stabilizaci p53 (tumor supresorový gen) v rakovinných buňkách. [64]

Dalšími látkami se zajímavými biologickými aktivitami jsou 11-hydroxyvittatin a vittatin. U sloučeniny 11-hydroxyvittatinu byla stanovena slabá inhibiční aktivita na vir ptačí chřipky s hodnotami $EC_{50} 6,70 \pm 0,04 \mu\text{M}$. [58] Dále tento alkaloid prokázal antibakteriální aktivitu proti grampozitivnímu *Staphylococcus aureus* a slabé antimykotické působení proti kvasince *Candida albicans*. [61] Biologické účinky vittatinu jsou probrány v samostatné kapitole.

3.2.3.4 Krininový strukturní typ

Základní kostrou struktury alkaloidů krininového typu je takéž ethanofenantridin, jako je tomu u alkaloidů haemanthaminového strukturního typu. Rozdíl mezi těmito strukturními typy spočívá v orientaci ethanolového můstku v polohách 5 a 10b, kdy v případě krininu je orientován jako β (nad rovinu) a u haemanthaminu jako α (pod rovinu). [65]

Mezi zástupce alkaloidů krininového typu, kteří byli izolováni z rodu *Hippeastrum*, patří ambellin, krinidin, powellin, undulatin a krinamidin. [20][63]



Obrázek 17 Struktura krininu

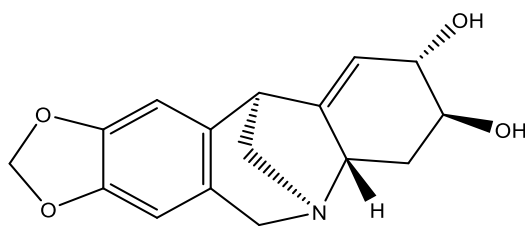
Alkaloid ambellin prokázal slabou antiproliferativní aktivitu na HeLa, Vero, MOLT-4 a HepG2 nádorové buněčné linie. Na druhou stranu proti myši P-388 lymfocytární leukémii prokázal silný protinádorový účinek. [66] Dále byl testován i proti buněčné linii BL6 myšního melanomu, ale byl zjištěn pouze slabý cytotoxický efekt. Ambellin byl kromě protinádorové aktivity hodnocen i jako potenciální antimalarikum, kdy testování probíhalo proti chlorochin-citlivému a chlorochin-rezistentnímu *Plasmodium falciparum*. V obou případech ambellin působil pouze slabě. V téže studii byl připraven i derivát ambellinu, 11-O-acetylambellin, ale ani touto modifikací struktury nedošlo k výraznému zvýšení protinádorové ani antimalarické aktivity. Pro porovnání účinku byla použita známá antimalarika, chlorochin a artemisinin. [67]

U 21 Amaryllidaceae alkaloidů byla testována jejich schopnost inhibovat vodíkovou vazbu citalopramu na serotoninový transportér. Mezi nimi byli i zástupci krininového typu, krinin a powellin, u kterých byla zjištěna afinita k transportnímu proteinu zpětného vychytávání serotoninu. [68] Jelikož je příčina deprese vysvětlována právě nedostatkem serotoninu a zmíněné alkaloidy by mohly ovlivňovat jeho množství, lze tedy krinin a powellin považovat za potenciální léčiva, která by mohla najít uplatnění v terapii deprese.

Z rostliny *H. brachyandrum* H. G. Boit a W. Döpke z Chemického ústavu Humboldtovy univerzity v Berlíně v roce 1959 izolovali undulatin. [69] Později tento alkaloid vykázal potenciál inhibovat lidskou AChE a POP. Dle zjištěných hodnot lze považovat inhibiční efekt undulatinu za selektivní k lidské AChE s hodnotami $IC_{50} = 23,00 \pm 1,00 \mu M$, jelikož proti BuChE se prokázal jako neaktivní. Vůči POP byl stanoven inhibiční efekt undulatinu s hodnotami $IC_{50} 1,96 \pm 0,12 \mu M$. Jako referenční látky byly použity známé inhibitory uvedených enzymů. Pro porovnání inhibice AChE byl použit eserin s hodnotami $IC_{50} 0,06 \pm 0,00 \mu M$. Jako standard inhibiční aktivity POP sloužil bajkalin s $IC_{50} = 0,61 \pm 0,02 \mu M$. Současně byla hodnocena schopnost undulatinu procházet přes biologické bariéry pomocí paralelního testu umělé penetrace (PAMPA), který prokázal, že undulatin je schopen projít přes hematoencefalickou bariéru pasivním transportem. [70] [71]

3.2.3.5 Montaninový strukturní typ

Skelet alkaloidů montaninového typu je odvozen od 5,11-methanomorphanthridinového jádra. Zástupci, kteří byli izolováni z rostlin rodu *Hippeastrum*, jsou montanin, pankracin a 4-O-methylangustin. [72]



Obrázek 18 Struktura montaninu

Alkaloid montanin byl studován jako chorobu modifikující antirevmatické léčivo, tzv. DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs). Testování se uskutečnilo na dvou modelech artritidy *in vivo* na myších. Antigenem indukovaná artritida (AIA) představovala první model. Druhým modelem byla artritida vyvolaná kolagenem (CIA). Montanin byl aplikován intraperitoneálně dvakrát denně. V případě AIA byla pozorována nocicepce a migrace leukocytů do kolenního kloubu. U CIA byl pozorován vývoj a závažnost artritidy klinickými a histologickými hodnoceními a kloubní nocicepcí. Dosažené výsledky popisují slibné působení montaninu jako antirevmatického léčiva. Prokázala se schopnost montaninu snižovat zánětlivé markery a počty leukocytů v kolenu u myši s AIA. Preventivní podávání montaninu u myši s CIA zpozdilo nástup onemocnění téměř o sedm dní. Zároveň preventivní podávání montaninu snížilo závažnost onemocnění během celého sledovaného období. Jako preventivní dávka byla podávána 0,25 a 0,5 mg/kg. I při aplikaci montaninu až poté, co artritida již propukla, montanin v dávce 0,5 mg/kg snižoval závažnost onemocnění. U myši s CIA montanin potlačil histologický nález zánětu a poškození chrupavky. Terapie montaninem snížila proliferaci lymfocytů *in vitro* o 54 %. Montanin vyvolal snížení *in vitro* invazivity u synoviocytů podobným fibroblastům, které stojí za klíčovým procesem při kloubní destrukci. [73]

Dále byla pro montanin stanovena a ověřena inhibiční aktivita na růst buněčných kultur *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* a *Escherichia coli*. Byl u něj prokázán i antioxidační účinek. Dále byl hodnocen i na protizánětlivé působení, které bylo testováno jako inhibice migrace leukocytů. Avšak v testované dávce montanin neprokázal významné protizánětlivé působení. [74]

Jak je již uvedeno výše v kapitole *H. vittatum*, montanin disponuje výrazným cytostatickým účinkem. Hodnoty protinádorového působení montaninu jsou shrnuty v tabulce 4. [24] V rámci jiné studie se montanin také nechal působit proti panelu šesti lidských rakovinných buněčných linií. Jednalo se o tři druhy rakoviny prsu (MCF7, Hs578T,

MDA-MB-231), tlustého střeva (HCT-15), plic (A549) a melanomu (SK-MEL-28). Po 48 hodinách působení montaninu bylo pozorováno výrazné snížení životaschopnosti testovaných buněk. Montanin tento efekt vykazoval už při velmi nízkých mikromolárních koncentracích ve všech testovaných buněčných liniích s výjimkou vysoce metastatických buněk melanomu SK-MEL-28, tabulka 7. Současně došlo k vytvoření hypotézy o mechanismu cytostatického účinku montaninu, která vychází z dokladů o afinitě montaninu k serotoninovému transportnímu proteinu a tvrzení, že serotonin ovlivňuje růst a přežití lidských rakovinných buněk. V mnoha rakovinných buňkách se totiž vyskytují vyšší hladiny serotoninu nebo jeho prekurzoru, 5-hydroxytryptofanu, a jeho syntetizující enzym, tryptofanhydroxylasa. Dá se tedy předpokládat, že rakovinné buňky obsahují serotoninový transportní protein, na který se může navázat montanin a vyvolat tak inhibici růstu rakovinných buněk rozvrtem jejich serotoninového systému. [75]

Tabulka 7: *In vitro* IC₅₀ montaninu v μM

Rakovinné buněčné linie	IC ₅₀ montaninu (μM)
A549	1,90 ± 0,40
HCT15	6,80 ± 0,50
SK-MEL-28	23,20 ± 1,90
MCF7	4,40 ± 0,40
MDA-MB-231	3,40 ± 0,90
Hs578T	3,60 ± 1,70

U montaninu, jakožto alkaloidu s významnou biologickou aktivitou, bylo provedeno i stanovení inhibiční schopnosti vůči AChE. Tento enzym byl získán z hippokampu dospělých potkanů a montanin při koncentraci 1 mM vyvolal 50% inhibici AChE. [20] [76] V *in vivo* studii na myších byl pozorován sedativní, anxiolytický, antikonvulzivní a antidepressivní účinek navozený podáváním montaninu. Jaký je mechanismus těchto účinků však dosud není přesně známo. [25] [72]

Stejně tak u alkaloidu pankracinu proběhl screening na jeho cytotoxické vlastnosti. Pankracin prokázal snížení životaschopnosti devíti rakovinných buněčných linií a silné potlačení růstu lidských nádorů z tkáně vaječníků, plic, prsu a tlustého střeva. [72] [77] [78] Dále byla u pankracinu testována jeho antibakteriální a antifungální aktivita

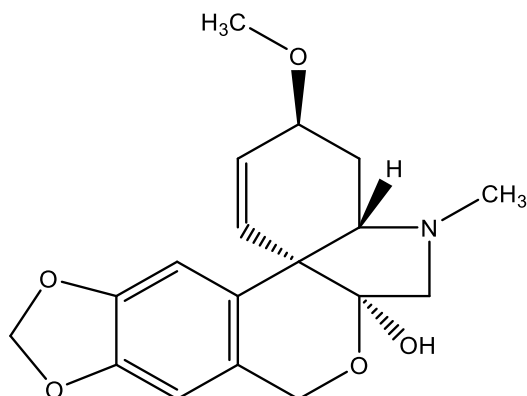
proti grampozitivní bakterii *S. aureus*, gramnegativním bakteriím *E. coli* a *P. aeruginosa* a kvasince *C. albicans* prostřednictvím agarové difúzní techniky. Výsledky ukázaly, že pankracin má antibakteriální účinek proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*, ale pouze mírný antimykotický efekt proti *C. albicans*. [61] [72] [74]

Alkaloidy nangustin a pankracin byly podrobeny testování na antiprotozoální aktivitu *in vitro* proti prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *Leishmania donovani* a *P. falciparum*. Bohužel nangustin nevykázal žádnou aktivitu a pankracin působil pouze slabě proti *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi* a *P. falciparum*. [20] [72] [79]

Posledním zmíněným montaninovým alkaloidem je 4-*O*-methylnangustin, u kterého bylo provedeno hodnocení na inhibici AChE, avšak nebyly prokázány významné výsledky. [18] [72]

3.2.3.6 Tazettinový strukturní typ

Struktura vychází z 2-benzopyrano-[3,4-*c*]indolu. [8] Do tohoto strukturního typu alkaloidů patří například tazettin, pretazettin, 3-*O*-demethyltazettin, deoxytazettin, tazettamid. [63]



Obrázek 19 Struktura tazettinu

U pretazettinu bylo pozorováno výrazné prodloužení života myší s leukémií. Navíc prokázal antivirovou aktivitu v myších buňkách 3T3, které byly infikovány Rauscherových virem. Současně u alkaloidu tazettinu nebyl pozorován výrazný účinek na životaschopnost u leukemických myší a pro inhibici růstu virů v buňkách byl potřeba ve vyšší koncentraci než pretazettin. [80] Hodnoceno bylo také protinádorové působení pretazettinu proti intraperitoneálně implantovanému Lewisovu plicnímu karcinomu u alogenních (dárce a příjemce nejsou totožní) a syngenních (dárce je jednovaječné dvojče) myší. U pretazettinu byla potvrzena aktivita proti tomuto typu nádoru. Současně u syngenních myší došlo

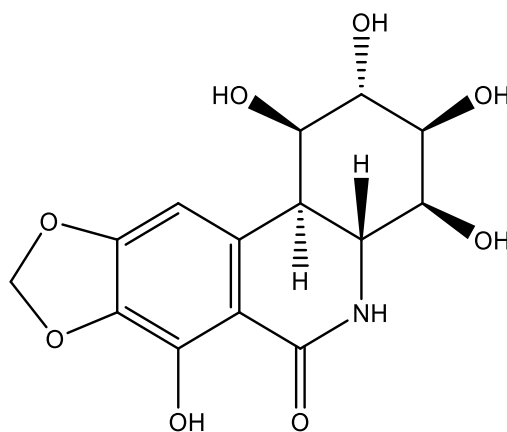
k prodloužení života. Během studie byla hodnocena i účinnost kombinací pretazettinu se standardními cytotoxickými léčivy, jako jsou adriamycin, *cis*-diamin-dichlorplatina, 5-fluoruracil, methotrexát a vinkristin. Pokud uvedená léčiva byla aplikována jednotlivě, jejich cytotoxický efekt proti Lewisovu plicnímu karcinomu nebyl dostatečný. Díky adjuvantnímu působení pretazettinu zmíněná léčiva dosáhla dostatečného protinádorového účinku. [20][81] Antikancerózní efekt pretazettinu-hydrochloridu byl prokázán jako účinný i proti Erlichově karcinomu ascitu. Opět byl pozorován adjuvantní účinek pretazettinu ve vztahu ke standardním protinádorovým léčivům jako je adriamycin, karmustin a cyklofosamid. [20] [82]

U pretazettinu byla hodnocena i inhibiční schopnost vůči AChE, ale nebylo dosaženo žádných významných výsledků. [20] [76]

3.2.3.7 Narciklasinový strukturní typ

V literatuře se můžeme setkat s označením narciklasinový typ nebo pankratistatinový typ. Oba tyto typy zahrnují obdobné spektrum chemických sloučenin. [8] [63]

Patří sem například alkaloidy *N*-methylkrinasiadin, famin a trisphaeridin. [20] Stavebním základem tohoto typu alkaloidů je fenanthridin. [8]



Obrázek 20 Struktura pankratistatinu

U trisphaeridinu byl zaznamenán slabý cytostatický efekt ve srovnání s cisplatinou. Hodnocena byla i schopnost trisphaeridinu inhibovat eflux léčiv z nádorových buněk zprostředkovaný P-glykoproteinem. Testování probíhalo v akumulčním testu barviva Rh-123 s buněčnou linií myšičího lymfomu L5178 MDR. Jako pozitivní kontrola sloužil verapamil. Při koncentraci 400 μ M trisphaeridin vyvolal významnou akumulaci Rh-123 uvnitř buněk, což svědčí o potlačení efluxu barviva P-glykoproteinem. Zjištěna též byla aditivní antiproliferativní

interakce doxorubicinu s triphaeridinem. Při testování indukce apoptózy HeLa buňky ošetřené trisphaeridinem vykazovaly apoptotické morfologické změny, buněčné smršťování a granulaci v jádře. [83] Dále byla u trisphaeridinu zjištěna antivirová aktivita prokázána jako inhibice HIV-1 replikace *in vitro*. [20] [53]

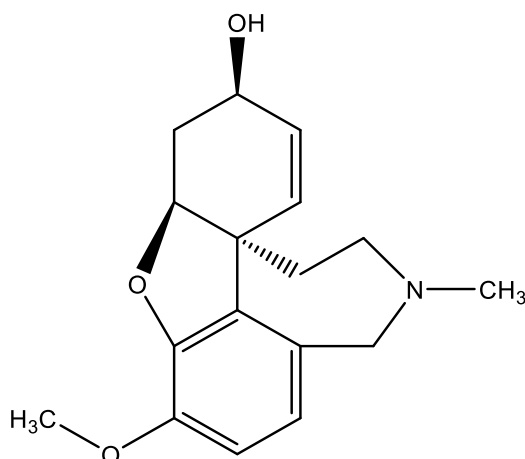
U rostliny *Hippeastrum elegans* byl detekován ve větším množství alkaloid narciklasin. [84] Tento alkaloid má výrazný antimitotický a protinádorový účinek. [20]

Dalšími alkaloidy narciklasinového typu jsou *N*-methylkrinasiadin a famin. Tyto látky byly izolovány z rostliny *H. equestre*. U *N*-methylkrinasiadinu zatím nebyly provedeny žádné biologické studie. [20] U alkaloidu faminu byla zjištěna zajímavá antimitotická aktivita. [85]

3.2.3.8 Galanthaminový strukturní typ

Základem struktury alkaloidů odvozených od galanthaminu je dibenzofuran. Alkaloid galanthamin je nejen předním zástupcem tohoto strukturního typu alkaloidů, ale zároveň představuje jednoho z nejdůležitějších alkaloidů celé čeledi Amaryllidaceae, a to zejména díky své biologické aktivitě, o které je více informací v následujícím textu.

Dalšími zástupci galanthaminového strukturního typu jsou chlidanthin, *N*-formylnorgalanthamin, sanguinin, *N*-demethylgalanthamin, 3-*epi*-norgalanthamin, narwedín, 11 β -hydroxygalanthamin a anhydrogalanthamin. [20][63]



Obrázek 21 Struktura galanthaminu

Galanthamin je prvním alkaloidem čeledi Amaryllidaceae, který je používán v klinické praxi. Konkrétně v terapii Alzheimerovy choroby. Toto chronické onemocnění postihuje nervovou soustavu, během čehož dochází k degeneraci neuronů, což se projevuje charakteristickými histopatologickými změnami. Společně s neuronální degenerací dochází i ke ztrátě synaptických spojení a je narušena produkce acetylcholinu. Neurotransmitter

acetylcholin je degradován enzymem AChE, čímž dochází ke snížení hladiny acetylcholinu a vzniku cholinu a acetátu. Pokud se zablokuje funkce enzymu AChE, vede to ke zvýšení hladiny acetylcholinu, což je při terapii Alzheimerovy choroby žádoucí. [86] [87]

U galanthaminu byla zjištěna právě schopnost inhibovat AChE. *In vitro* stanovené hodnoty poloviční inhibiční koncentrace IC_{50} proti lidské AChE se obvykle pohybují okolo $1,18 \pm 0,07 \mu\text{M}$. [27] Jeho farmakologický účinek spočívá ve vratné, kompetitivní, selektivní a dlouze působící inhibici tohoto enzymu. [8] [20] Zároveň galanthamin působí jako alosterický modulátor nikotinového receptoru, na který acetylcholin působí. [20] Neuroprotektivní účinek galanthaminu je připisován i jeho schopnosti vychytávat reaktivní formy kyslíku, tedy volné radikály, a potlačovat produkci těchto reaktivních forem, kdy oba tyto přístupy vedou ke snížení oxidačního stresu neuronů. [88] V odborné literatuře galanthamin hraje roli standardu a je často používán jako referenční látka pro porovnání inhibičního efektu jiných alkaloidů a nově syntetizovaných látek.

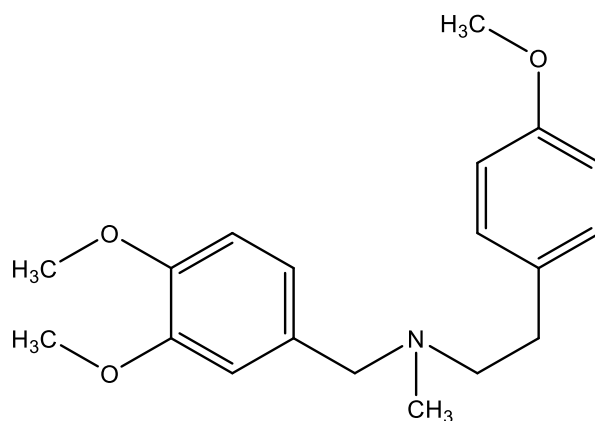
Prvně byl galanthamin izolován z cibule sněženky, později i z dalších rostlinných zdrojů čeledi Amaryllidaceae jako například z rostlin *H. psittacinum* a *H. vittatum*. [8] [76] Z rostliny *H. papillio* byla izolována sloučenina 11 β -hydroxygalanthamin, která oproti galanthaminu vykazala slabší inhibiční aktivitu proti AChE s hodnotami $IC_{50} = 14,50 \pm 0,33 \mu\text{M}$. [27]

Dále stojí za zmínku alkaloid sanguinin, který prokázal desetkrát silnější inhibiční účinek AChE než galanthamin. Silná inhibiční aktivita sanguininu pravděpodobně tkví v přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 9, která je tak k dispozici pro potenciální interakci s AChE. [20] [89] [90]

Posledním uvedeným alkaloidem galanthaminového typu je *epi-norgalanthamin*, který disponuje až desetkrát nižší inhibiční aktivitou vůči AChE než galanthamin. Snížení inhibičního efektu lze vysvětlit ztrátou methylové skupiny na dusíku. [90]

3.2.3.9 Belladinový strukturní typ

Syntéza alkaloidů amarylkovitých vychází ze struktury belladinového typu a zástupci, kteří jsou řazeni do této skupiny látek, jsou norbelladin, belladin a *O*-methylbelladin. [8]



Obrázek 22 Struktura belladinu

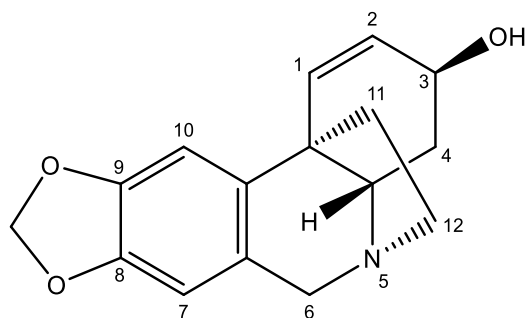
Alkaloidy belladinového strukturního typu však doposud nebyly izolovány z rostlin rodu *Hippeastrum*. Nicméně jejich izolace a následná identifikace proběhla u některých rostlin rodu *Nerine*, kdy byly získány látky belladin, 4'-*O*-demethylbelladin, 6-*O*-demethylbelladin a *N*-demethylbelladin. 4'-*O*-demethylbelladin a 6-*O*-demethylbelladin byly testovány na inhibiční aktivitu proti AChE, BuChE a POP, ale nevykázaly významné inhibiční schopnosti. [91] Dále byly identifikovány tři nové sloučeniny belladinového typu u *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton a byla u nich zjištěna selektivní inhibice BuChE. Více informací v článku Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase z roku 2020. [92] Belladinové alkaloidy také prokázaly, že mohou působit jako ligandy pro histondeacetylasi 2 (HDAC2). Tento enzym hraje roli v procesu deacetylace histonových proteinových řetězců, což vede k inhibici transkripce tumor supresorových genů, a tak zapříčiňuje růst rakovinných buněk. [93]

3.2.4 Vittatin

Vittatin je hlavní strukturní předlohou derivátů, kterými se zabývá tato diplomová práce. Polosyntetickou obměnou byly připraveny jeho deriváty ve formě esterů a etherů, u kterých byla stanovena jejich biologická aktivita.

3.2.4.1 Fyzikální a chemické vlastnosti vittatinu

Vittatin je alkaloid, který je řazen mezi haemanthaminový typ AA. Sumární vzorec vittatinu je $C_{16}H_{17}NO_3$. Synonyma, které též popisují strukturu vittatinu jsou (+)-krinin nebo (3 β , 5 α , 13 β , 19 α)-1,2-didehydro-crinan-3-ol a chemický název vittatinu je (3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-ethano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-3-ol.



Obrázek 23 Struktura vittatinu

Jedná se o pevnou látku nažloutlé barvy. Díky přítomnému dusíku v poloze 5 je vittatin terciální bazí. Teplota tání vittatinu se pohybuje v rozmezí 207-208 °C. Hodnota specifické optické otáčivosti byla stanovena $[\alpha]_D^{22} = +38^\circ$ ($c = 0,3$; CHCl_3). Molární hmotnost vittatinu je 271,31 g/mol. [24] [94] [95] [96]

Díky přítomnosti aktivních center v molekule vittatinu je tento alkaloid opticky aktivní a představuje enantiomer krininu. [94] [97] Tyto dva alkaloidy mají stejný sumární i strukturní vzorec, avšak jsou si navzájem svými zrcadlovými obrazy, což se projevuje opačným stáčením roviny polarizovaného světla.

3.2.4.2 Zdroje vittatinu

Vittatin je jedním z mnoha zástupců Amaryllidaceae alkaloidů. Začátek jeho biosyntézy vychází stejně, jako u ostatních alkaloidů, z prekursoru 4'-O-methylnorbelladinu. První krok představuje spojení v poloze *para-para'* a to v rámci molekuly 4'-O-methylnorbelladinu. Vzniká meziprodukt noroxomaritidin. Enzymatickým působením reduktasy dochází k redukci oxoskupiny na hydroxylovou funkční skupinu v poloze C-3 a vznikne vittatin. Sám vittatin je předlohou pro další alkaloidy jako je 11-hydroxyvittatin, ze kterého působením O-methyltransferasy vzniká haemanthamin. [98]

Vittatin byl poprvé izolován a identifikován H. G. Boitem v rostlině *Hippeastrum vittatum* (hvězdník proužkovaný) v roce 1956 na Chemickém institutu Humboldtovy univerzity v Berlíně. [94] [97] Další druhy rodu *Hippeastrum* obsahující vittatin jsou *H. puniceum*, *H. solandriiflorum*, *H. santacatarina*, *H. papillio* a *H. breviflorum*. [20]

Vittatin byl také izolován z rostlin jiných druhů čeledi Amaryllidaceae. Například z *Lycoris radiata* Herb. [97], *Amaryllis belladonna* L. [61], *Narcissus cantabricus* DC. [99], *Hymenocallis rotata* Herb. [100], *Crinum bulbispermum* L. [101], *Lycoris sanguinea* Maxim., *Narcissus pseudonarcissus* L. a *Pancratium maritimum* L. [102]

Dostupnost rostlinného materiálu a izolace, která představuje vcelku náročný proces, vedly k pokusům o zvládnutí totální syntézy Amaryllidaceae alkaloidů včetně vittatinu. Současně k tomu přispívá i zjištěná a studiem potvrzená biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů, díky níž je skupině těchto látek věnována velká pozornost.

První úspěšná chemická syntéza vittatinu je datována v roce 2006, kdy stereoselektivní syntéza (+)-vittatinu vycházela z D-glukózy. [103] Další možnost syntézy vittatinu byla zveřejněna ve studii z roku 2013, kdy se jednalo o enantioselektivní katalyticky řízenou Michaelovu adici alfa-kyanoketonů na akryláty. Dojde tak ke vzniku uhlíkatého kvarterního stereocentra, které umožňuje a je důležité pro chemickou syntézu opticky čistých *cis*-arylhydroindolových alkaloidů. [104] Totální syntézy vittatinu bylo také dosaženo prostřednictvím enantioselektivní dekarboxylativní allylace allylenolkarbonátů katalyzovaných palladiem. [105]

3.2.4.3 Biologické aktivity vittatinu

Jak je již řečeno výše, vittatin prokázal slabý cytotoxický efekt proti HT29 adenokarcinomu tlustého střeva, H460 nemalobuněčnému karcinomu plic a RXF393 karcinomu ledvinových buněk. [24] Slabé protinádorové působení bylo zjištěno i proti humánním nádorovým buněčným liniím A2780 karcinomu vaječnicků, SW1573 karcinomu plic, T47-D karcinomu prsu a WiDr karcinomu tlustého střeva. [78] U tohoto alkaloidu dále bylo zjištěno antimikrobiální působení konkrétně antibakteriální účinek proti grampozitivnímu *Staphylococcus aureus* a i proti gramnegativní *Escherichia coli*. Vittatin také prokázal antimykotický účinek proti *Candida albicans*. [61] Dále se u vittatinu prokázala antimalarická aktivita, která byla hodnocena proti *Plasmodium falciparum* kmene F-32. Tento kmen vyvolává nejzávažnější formy malárie a je citlivý na chlorochin, který byl při testování použit jako pozitivní kontrola s $IC_{50} = 0,04 \mu\text{M}$. Výsledky byly stanoveny po třech dnech inkubace a vyhodnoceny jako inhibice proniknutí parazitů do krve hostitele. Inhibiční aktivita pro vittatin vyjádřená jako IC_{50} činila $7,30 \pm 0,10 \mu\text{M}$. [67]

3.3 Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů

Jak již bylo řečeno, Amaryllidaceae alkaloidy mají řadu biologických účinků, ale kolikrát nedosahují takových hodnot jako používané standardy. Proto se v případě, že chemická struktura alkaloidu obsahuje vhodné funkční skupiny či seskupení pro obměnu molekuly, připravují polosyntetické deriváty.

Z cibulí *H. cv. Ferrari* bylo izolováno velké množství, 2,1 g, vittatinu. Tato skutečnost vybízela k syntéze vittatinových analogů, které vznikly modifikací hydroxylové skupiny v poloze C-3. Vodík z hydroxylové skupiny byl nahrazen různě substituovanými benzoylchloridy za vzniku třinácti aromatických esterů vittatinu. Připravené látky byly testovány na jejich inhibiční potenciál proti enzymům, které hrají roli v patogenezi Alzheimerovi choroby. Nejdříve byl proveden screening schopnosti inhibice derivátů při 100 μM . U sloučenin, které prokázaly inhibiční schopnost vyšší než 50 % proti jedné nebo oběma cholinesterasám, byly stanoveny hodnoty IC_{50} . Pouze dva deriváty, 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatin a 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatin, projevily inhibiční aktivitu proti lidské AChE. Na druhou stranu tři aromatické deriváty silně inhibovaly lidskou BuChE a jejich poloviční inhibiční koncentrace byla nižší než 10 μM , tabulka 8. Pro selektivitu k BuChE je zřejmě důležitá substituce v poloze dva a se zvyšující se vzdáleností aktivita klesá. U těchto tři sloučenin byla *in vitro* testována jejich propustnost přes hematoencefalickou bariéru (HEB) pasivní difúzí a bylo zjištěno, že všechny mají schopnost se dostat k cílovým strukturám na úrovni centrální nervové soustavy. Ve srovnání s hodnotami alkaloidu vittatinu je zřejmé, že příprava polosyntetických derivátů vedla k objevení látek s vyšším inhibičním potenciálem. [40]

Tabulka 8: Hodnoty IC_{50} vittatinu a jeho derivátů proti lidským cholinesterasám

Deriváty vittatinu	AChE IC_{50} (μM)	BuChE IC_{50} (μM)
vittatin	>100	>100
3- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)vittatin	60,00 \pm 2,00	56,00 \pm 1,00
3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)vittatin	12,00 \pm 0,00	1,40 \pm 0,10
3- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)vittatin	>100	5,40 \pm 0,10
3- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)vittatin	>100	8,00 \pm 0,10
galanthamin	1,70 \pm 0,10	42,00 \pm 1,00
eserin	0,06 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01

Dalším alkaloidem, u kterého proběhla příprava derivátů, je lykorin. Jelikož se lykorin prokázal jako alkaloid s antiprotozoálním účinkem, bylo od něj připraveno šest polosyntetických derivátů, které byly testovány proti *Trichomonas vaginalis*. Jejich modifikace spočívala v polohách 1-OH a 2-OH lykorinu a připravené deriváty měly povahu aromatických

a alifatických esterů. Jmenovitě se jednalo o 1,2-di-*O*-acetyllykorin, 2-*O*-lauryllykorin, 1,2-*O*-dibenzoyllykorin, 2-*O*-benzoyllykorin, 2-*O*-*p*-nitrobenzoyllykorin a 1-*O*-*p*-nitrobenzoyllykorin. *In vitro* hodnocení antiprotozoální aktivity těchto derivátů probíhalo za použití dvou koncentrací testovaných látek, konkrétně při 125 μM a 250 μM . Po 24 hodinách inkubace při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5$) byly odečteny výsledky, které byly vyjádřeny jako procento životaschopných prvoků a jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9: Antiprotozoální aktivita lykorinu a jeho derivátů

			Aktivita proti <i>T. vaginalis</i> (% životaschopných trofozoitů)	
sloučenina	R ₁	R ₂	125 μM	250 μM
lykorin	H	H	70	60
1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin	acetyl	acetyl	77	81
2- <i>O</i> -lauryllykorin	H	lauroyl	16	3
1,2- <i>O</i> -dibenzoyllykorin	benzoyl	benzoyl	68	66
2- <i>O</i> -benzoyllykorin	H	benzoyl	51	65
2- <i>O</i> - <i>p</i> -nitrobenzoyllykorin	H	<i>p</i> -nitrobenzoyl	40	21
1- <i>O</i> - <i>p</i> -nitrobenzoyllykorin	<i>p</i> -nitrobenzoyl	H	80	42

Aktivita lykorinu při obou testovaných koncentracích byla takřka stejná a nedošlo k vyvolání významného rozdílu v počtu životaschopných trofozoitů přesto, že koncentrace 250 μM je dvojnásobně vyšší než druhá testovaná koncentrace. Podobně aktivní jako lykorin byly i sloučeniny 1,2-di-*O*-acetyllykorin, 1,2-*O*-dibenzoyllykorin, 2-*O*-benzoyllykorin při obou koncentracích a 1-*O*-*p*-nitrobenzoyllykorin při 125 μM . U diesterifikovaných derivátů, 1,2-di-*O*-acetyllykorinu a 1,2-*O*-dibenzoyllykorinu, výsledky potvrdily, že i sloučeniny

modifikované současně na C-1 a C-2 jsou aktivními, a to bez ohledu na to, zda je substituent alifatické nebo aromatické povahy. 1-*O-p*-nitrobenzoyllykorin při 250 μM projevil značně lepší efekt, kdy zůstalo pouze 42 % trofozoitů přeživších. Derivát 2-*O-p*-nitrobenzoyllykorin byl při koncentraci 125 μM takřka stejně aktivní jako 1-*O-p*-nitrobenzoyllykorin při 250 μM . Nejlepší výsledky jsou jednoznačně evidovány u derivátu 2-*O*-lauryllykorin, který při obou testovaných koncentracích dosáhl výborných hodnot, při kterých zůstalo životaschopných pouze 16 % (125 μM) a 3 % (250 μM) trofozoitů. [106]

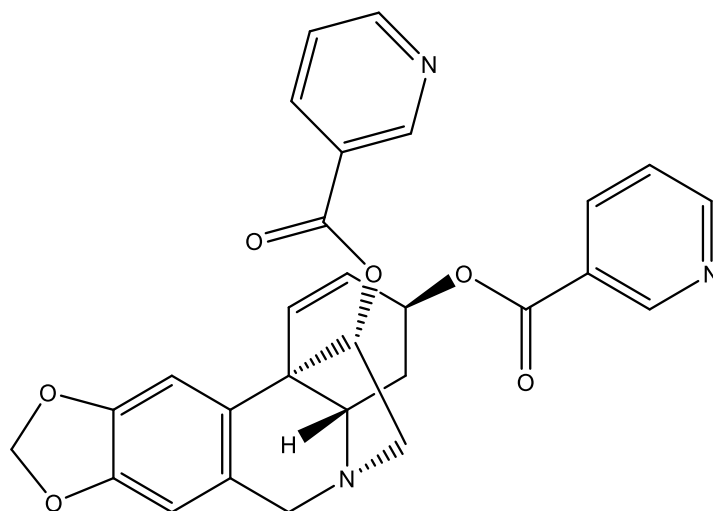
Jiných deset polosyntetických derivátů lykorinu bylo podrobena hodnocení na inhibiční efekt proti lidským cholinesterasám. Testované deriváty byly získány obměnou opět v poloze C-1 a C-2 na hydroxylových skupinách lykorinu a dále obměnou hydroxylové skupiny v poloze C-1 lykorin-2-onu. Jako referenční látky pro porovnání účinku byly použity známé inhibitory lidských cholinesteras, takrin a galanthamin. Derivát 2-*O-terc*-butyldimethylsilyl-1-*O*-(methylthio)methyllykorin prokázal inhibiční aktivitu proti lidské AChE a BuChE s hodnotami AChE $\text{IC}_{50} = 11,40 \pm 0,66 \mu\text{M}$ a BuChE $\text{IC}_{50} = 4,17 \pm 0,29 \mu\text{M}$. Významně aktivní byly i další čtyři deriváty, 1,2-*O,O'*-dibenzoyllykorin, 1,2-*O,O'*-di-*trans*-cinnamoyllykorin, 2-*O-trans*-cinnamoyllykorin, 1-*O-trans*-cinnamoyllykorin, jejichž hodnoty BuChE IC_{50} byly nižší než 20 μM . Z tabulky 10 je patrné, že polosyntetická analoga byla lepšími inhibitory humánní BuChE než AChE. Výsledky dále ukázaly, že 1-*O-trans*-cinnamoyllykorin působil silněji než 1-*O-trans*-cinnamoyllykorin-2-on, tudíž lze vyvodit, že oxidace v poloze C-2 snižuje inhibiční aktivitu. [107]

Tabulka 10: Inhibiční efekt lykorinových derivátů proti lidské AChE a BuChE

Polosyntetický derivát	IC_{50} (μM) AChE	IC_{50} (μM) BuChE
1,2- <i>O,O'</i> -dibenzoyllykorin	>50	$7,72 \pm 0,26$
2- <i>O</i> -benzoyllykorin	>50	>50
1,2- <i>O,O'</i> -di- <i>trans</i> -cinnamoyllykorin	$46,76 \pm 0,95$	$17,45 \pm 0,19$
2- <i>O-trans</i> -cinnamoyllykorin	>50	$19,74 \pm 1,37$
1- <i>O-trans</i> -cinnamoyllykorin	>50	$12,13 \pm 0,77$
1- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O-terc</i> -butyldimethylsilyllykorin	>50	>50

2- <i>O</i> - <i>terc</i> -butyldimethylsilyl-1- <i>O</i> -(methylthio)methyllykorin	11,40 ± 0,66	4,17 ± 0,29
lykorin-2-on	>50	>50
1- <i>O</i> -acetyllykorin-2-on	>50	44,46 ± 0,88
1- <i>O</i> - <i>trans</i> -cinnamoyllykorin-2-on	>50	20,91 ± 0,13
takrin	0,26 ± 0,015	0,02 ± 0,00
galanthamin	1,6 ± 0,14	18,30 ± 0,14

V medicíně se používají léčiva, která jsou buď přímo přírodního původu, nebo se jedná o polosyntetické či zcela syntetické látky, jejichž předlohou byly přírodní produkty. Jedním z mnoha příkladů je i rostlina *Artemisia annua*, pelyněk roční, ze které byl izolován artemisinin, který byl s úspěchem aplikován proti malarickým parazitům, které byly rezistentní na chlorochin. Při hledání nových antimalarik byla zjištěna tato potenciální aktivita i u AA, jako je lykorin, haemanthamin, haemantidin a krinamin. V roce 2012 byla provedena studie, během které bylo připraveno 31 derivátů AA haemanthaminového typu, konkrétně odvozených od haemanthaminu, haemanthidinu a 11-hydroxyvittatinu, které byly izolovány z cibulí *Pancretium canariense*. Modifikace struktury výše uvedených alkaloidů spočívala především v substituci na hydroxylových skupinách nebo na dvojně vazbě v kruhu D. Nově vzniklé deriváty měly například charakter esterů, ketonů, oximů či N-oxidů. Jak čisté alkaloidy, haemanthamin a haemanthidin ($IC_{50} = 1,30$ a $1,20 \mu M$), tak i některé deriváty vykazaly antimalarickou aktivitu. Nejlepší z derivátů ($IC_{50} = 0,80 \pm 0,06 \mu M$) byl získán acylací 11-hydroxyvittatinu kyselinou nikotinovou v polohách C-3 a C-11.



Obrázek 24 Struktura derivátu 11-hydroxyvittatinu s nejvyšší antimalarickou aktivitou

Antimalarické působení samotného 11-hydroxyvittatinu vyjádřené jako IC_{50} bylo $13,20 \pm 1,40 \mu M$, což je více jak patnáctkrát slabší efekt, než jaký prokázal připravený derivát. [108] V tomto případě došlo k potvrzení, že příprava polosyntetických analog přispěla k objevu látky s lepším biologickým účinkem.

Od haemanthaminu izolovaného z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master na Katedře farmaceutické botaniky FAF UK v rámci skupiny ADINACO byly připraveny polosyntetické deriváty, které vznikly obměnou na volné hydroxylové skupině v poloze C-11. Z celkem dvanácti esterových derivátů bylo pět získáno acylací s příslušnými anhydridy a zbývajících sedm esterů bylo připraveno acylací s různě substituovanými benzoylchloridy. Po jejich přípravě a identifikaci byly deriváty testovány na antiproliferativní aktivitu při $10 \mu M$. Výsledky byly překvapivé, protože žádný z derivátů nebyl významně toxický proti testovaným lidským buněčným liniím, přestože o haemanthaminu je známo, že působí cytotoxicky. V dalším kroku se hodnotila schopnost inhibice cholinesteras a glykogen-synthasy-kinasy-3 β (GSK-3 β). U alifatických derivátů byla pozorována buď pouze slabá nebo žádná aktivita. Zatímco u aromatických esterů se inhibiční účinnost prokázala na oba typy lidských cholinesteras. Nejsilnější inhibice byla zjištěna u 11-O-(4-nitrobenzoyl)haemanthaminu a 11-O-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu. O jeden řád nižší účinnost, než u dvou předešlých derivátů byla prokázána u analogu 11-O-benzoylhaemanthaminu, který je sice aromatickým derivátem, avšak bez substituce na benzylu. Účinek 11-O-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu byl neselektivní, inhiboval jak AChE, tak BuChE. U těchto tří derivátů byla hodnocena i schopnost inhibovat GSK-3 β , ale vykázal ji jen 11-O-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin

s IC_{50} $34,80 \pm 0,01 \mu M$. Získané hodnoty představují téměř totožné působení proti GSK-3 β při porovnání se známými inhibitory tohoto enzymu, mezi které patří i zástupci homolykorinového typu AA. Konkrétně se jedná o masonin a karanin a jejich IC_{50} je $27,81 \pm 0,05$ a $30,75 \pm 0,04 \mu M$. Výsledky hodnocení jsou shrnuty v tabulce 11. [65] [109] Z hodnot stanovených pro haemanthamin vyplývá, že i zde díky chemické obměně molekuly se podařilo získat mnohem aktivnější sloučeniny.

Tabulka 11: Působení derivátů haemanthaminu vůči lidským cholinestarásam (μM)

sloučenina	AChE IC_{50} (μM)	BuChE IC_{50} (μM)
haemanthamin	>500	>500
11- <i>O</i> -benzoylhaemanthaminu	$294,00 \pm 25,00$	$5,80 \pm 0,30$
11- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)haemanthaminu	$18,20 \pm 1,30$	$6,60 \pm 1,20$
11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemanthaminu	$14,70 \pm 1,80$	>500
huperizin A	$0,03 \pm 0,00$	>500
galanthamin	$1,70 \pm 0,10$	$42,30 \pm 1,30$

V rámci studia vztahu struktury a účinku, členové skupiny ADINACO připravily estery AA ambellinu v poloze C-11. Rozdíl struktury ambellinu a haemanthaminu spočívá pouze v orientaci 5,10b-ethanolového můstku a tím, že ambellin obsahuje v poloze C-7 další methoxy (CH₃O-) skupinu.

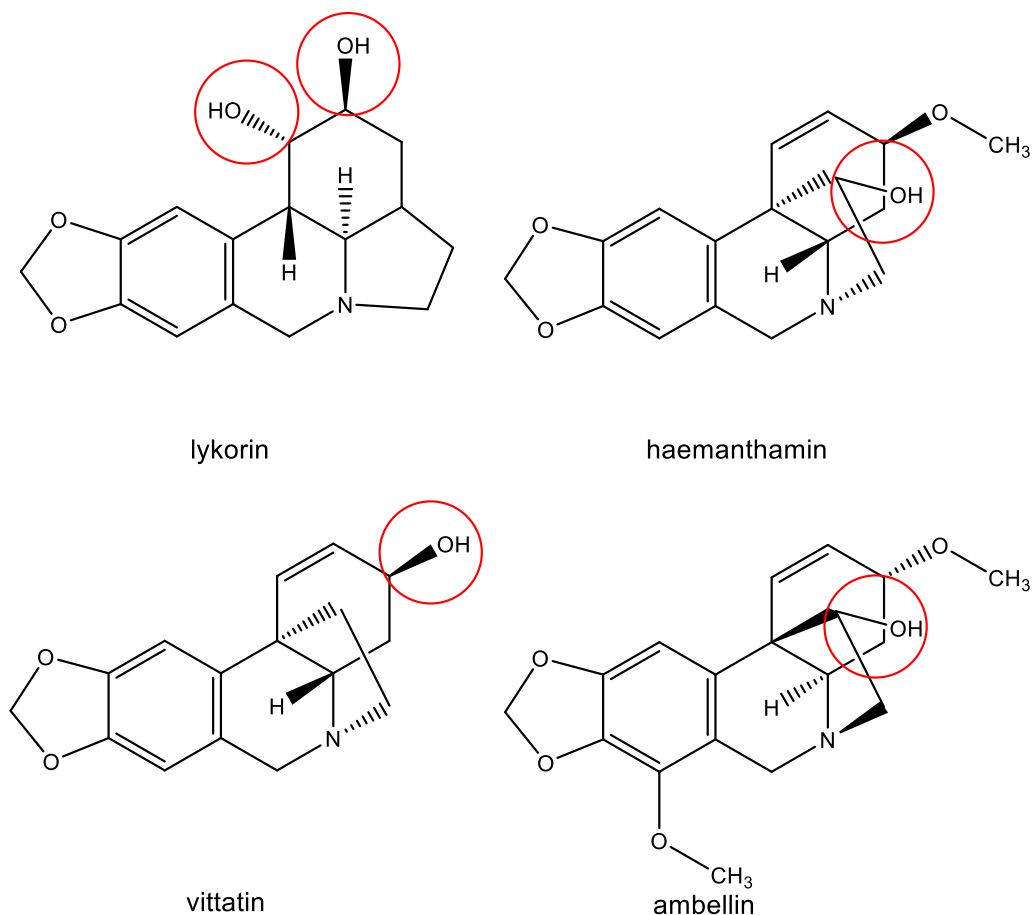
Tyto deriváty následně byly testovány na schopnost inhibovat lidské cholinestery. Nejprve proběhlo screeningové hodnocení derivátů. U sloučenin, které vykázaly při koncentraci 100 μM inhibici více než 50 %, byla stanovena hodnota IC_{50} . Z dvaceti derivátů pouze tři sloučeniny prokázaly inhibiční efekt vůči lidské AChE. Přesto ale zjištěné hodnoty nebyly příliš významné, jelikož se pohybovaly v rozmezí IC_{50} od 46 do 59 μM , což představuje stále nízkou inhibiční aktivitu v porovnání se známým inhibitorem galanthaminem, jehož IC_{50} je $1,70 \pm 0,10 \mu M$. Mnohem zajímavější výsledky byly pozorovány u inhibice lidské BuChE. U derivátů 11-*O*-(1-naftoyl)ambellinu, 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)ambellinu, 11-*O*-(2-methylbenzoyl)ambellinu a 11-*O*-(3-methylbenzoyl)ambellinu byly totiž stanoveny hodnoty IC_{50} , které jsou velmi blízké hodnotám známého inhibitoru BuChE, eserinu,

tabulka 12. [110] I v tomto případě došlo k přípravě látek s lepšími biologickými účinky, než které má předlohová molekula.

Tabulka 12: Inhibiční aktivita derivátů ambellinu vyjádřená jako IC₅₀ v μM

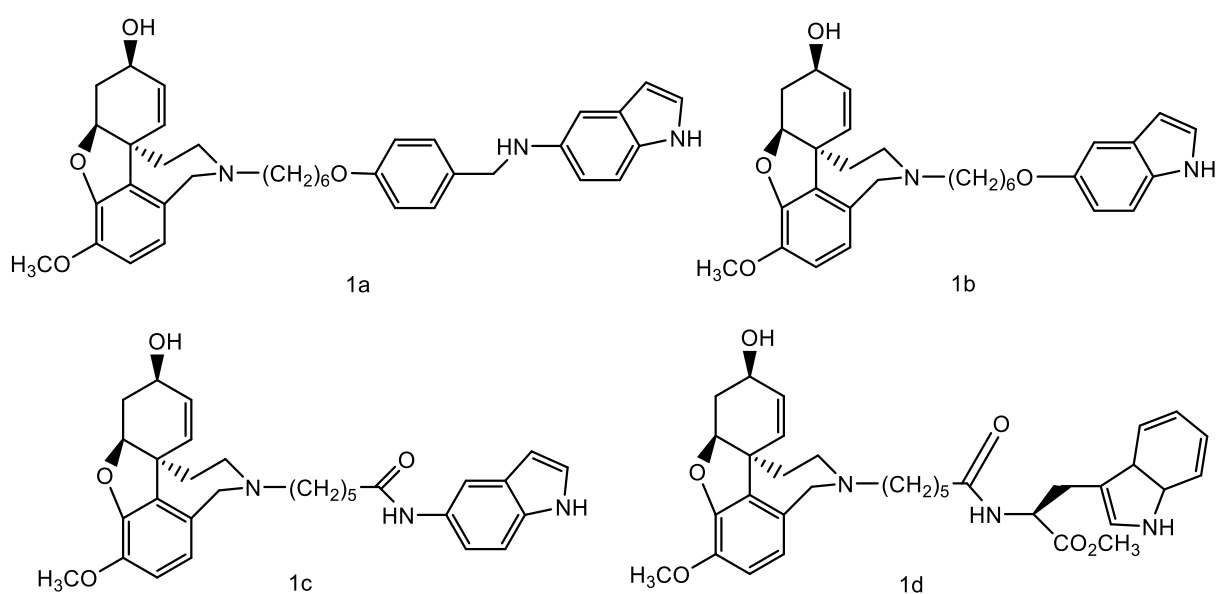
Derivát ambellinu	IC ₅₀ BuChE (μM)
ambellin	>100
11-O-(1-naftoyl)ambellin	0,10 ± 0,01
11-O-(2-methoxybenzoyl)ambellin	0,43 ± 0,04
11-O-(2-methylbenzoyl)ambellin	0,28 ± 0,02
11-O-(3-methylbenzoyl)ambellin	0,86 ± 0,03
eserin	0,13 ± 0,01

Na následujícím obrázku 25 jsou červeně vyznačeny polohy a funkční skupiny, které umožnily přípravu výše zmíněných analogů AA.



Obrázek 25 Struktura alkaloidů, u kterých proběhla příprava polosyntetických derivátů s vyznačením substituovaných hydroxylových skupin

V roce 2015 M. Atanasova et al. uskutečnili studii, která se zabývala deriváty galanthaminu. Nejprve bylo provedeno molekulové dokování na dvě série galanthaminových derivátů vázajících se na AChE a byly předpovězeny aktivity navržených derivátů galanthaminu, jejichž chemická modifikace probíhala na dusíku, na který byl připojen postranní řetězec zakončený indolem. Čtyři nejlepší deriváty znázorněné na obrázku 26 byly syntetizovány a následně hodnoceny na AChE inhibiční aktivitu. Enzym AChE byl získán z *Torpedo californica* z řádu rejnoků. Všechny čtyři připravené deriváty prokázaly výraznou aktivitu, a to v rozsahu 11 až 95krát vyšší než galanthamin. Získané hodnoty IC_{50} jsou shrnuty v tabulce 13. [111]



Obrázek 26 Indolové deriváty galanthaminu [111]

Tabulka 13: Hodnoty IC_{50} derivátů galanthaminu (μM)

Sloučenina	IC_{50} AChE (μM)	Aktivnější než galanthamin (krát)
1a	$0,01 \pm 0,00$	95
1b	$0,01 \pm 0,00$	93
1c	$0,01 \pm 0,00$	72
1d	$0,09 \pm 0,01$	11
Galanthamin	$1,07 \pm 0,16$	1

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a chemikálie

4.1.1 Použitá rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla

cyklohexan, č. (Penta) (cHx)

diethylamin, p. a. (Penta) (Et₂NH)

ethanol 95 %, č. (Penta) (EtOH)

ethylacetát, p. a. (Penta) (EtOAc)

chloroform, č. (Penta) (CHCl₃)

pyridin, p. a. (Penta)

toluen, p. a. (Penta) (To)

dimethylaminopyridin, p. a. (Penta) (DMAP)

chemikálie pro přípravu derivátů, ≥ 99% (Acros)

- hexanoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-chlorobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- anhydrid kyseliny valerové ≥ 99% (Acros)
- acetanhydrid, ≥ 99% (Acros)
- heptanoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- oktanoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- benzylbromid, ≥ 99% (Acros)
- 2-chlorbenzylbromid, ≥ 99% (Acros)
- tetrahydrofuran (THF)
- hydrid sodný
- argon

1M roztok suchého HCl v Et₂O

Dragendorffovo činidlo (podle Muniera)

Zásobní roztok se připraví smísením roztoku A (1,7 g bazického dusičnanu bismutitého, 20 g kyseliny vinné, 80 g destilované vody) a roztoku B (32 g jodidu draselného, 80 g destilované vody) v poměru 1:1.

Detekční roztok se připraví smísením 5 ml zásobního roztoku a roztoku 10 g kyseliny vinné 50 g destilované vody.

Oba roztoky jsou následně uchovávány v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.1.2 Rostlinný materiál

Jako výchozí látka pro přípravu polosyntetických derivátů byl použit Amarylidaceae alkaloid vittatin. Tento alkaloid byl získán izolací z cibulí *Hippeastrum* cv. Ferrari na Katedře farmaceutické botaniky v rámci disertační práce Lattifah Al Shammari a podrobnosti k fytochemické práci lze najít v článku Al Shammari L. et al. (2020). Botanická identifikace byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. a dokladový vzorek s číslem CUFPH-16130/AL-562 je uložen v herbáriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Asi 25 kg cibulí bylo rozdrobněno na částice o velikosti přibližně 5 mm pomocí ponorného mixéru. Následovala extrakce na vodní lázni pod zpětným chladičem varem ve dvojnásobném množství ethanolu 95% po dobu 30 min. Extrakt byl následně přefiltrován a zahuštěn na vakuové odparce za vzniku asi 420 g surového ethanolového extraktu. Ethanolový extrakt byl následně rozpuštěn v 2% kyselině chlorovodíkové a naředěn vodou na objem 5 l. Suspenze o pH 1-2 byla po krátké sonikaci přefiltrována a filtrát byl následně extrahován etherem (3x 1,5 l). Vodná vrstva byla alkalizována 10% uhličitanem sodným na pH 9-10. Následovala extrakce do chloroformu (6 × 300 ml). Chloroformová vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena na vakuové odparce. Bylo získáno 29,46 g koncentrovaného alkaloidního extraktu. Alkaloidní extrakt byl následně rozdělen pomocí sloupcové chromatografie na celkem 15 frakcí. Ty vznikly spojením jednotlivých najímaných frakcí (360; 500 ml) na základě kontrolních TLC. Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii bylo použito 1200 g oxidu hlinitého a jako mobilní fáze směsi EtOH a CHCl₃ v různých poměrech (99:1–0:100). Jednotlivé frakce byly následně zpracovány preparativní TLC, kde z frakce číslo 3 byly získány asi 2 g čistého vittatinu. Struktura byla identifikována na základě GC/MS, NMR a HRMS analýzy. [13]

4.1.3 Stacionární fáze pro analytickou a preparativní TLC

Jako stacionární fáze byly použity komerčně vyráběné hliníkové desky TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Německo), rozměr 20 × 10 cm, vrstva silikagelu 0,2 mm s fluorescenčním indikátorem F₂₅₄.

4.1.4 Mobilní fáze pro analytickou a preparativní TLC

- S₁ = To: Et₂NH (9:1)
- S₂ = Et₂NH:To:cHx (1:6:3)

4.2 Použité metody

4.2.1 Metody použité při přípravě derivátů

4.2.1.1 Příprava polosyntetických derivátů

Navážené množství vittatinu bylo rozpuštěno asi ve 2 ml suchého pyridinu a následně bylo přidáno vypočítané ekvivalentní množství příslušného chloridu nebo anhydridu v mírném nadbytku na základě uvedené rovnice:

$$m_{(RCl,anhydrid)} = \frac{m_{(VIT)} \times M_{(RCl,anhydrid)}}{M_{(VIT)}}$$

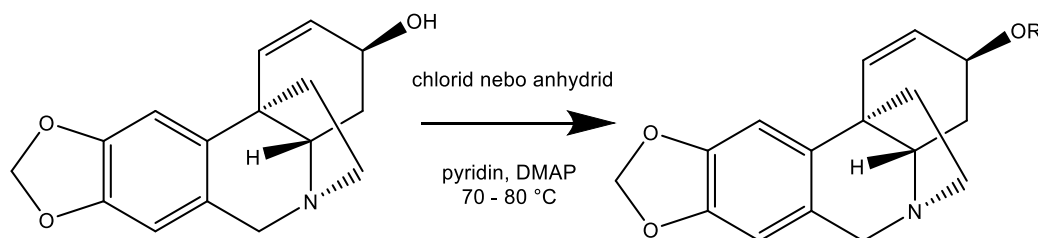
$m_{(RCl,anhydrid)}$ = hmotnost acylchloridu, anhydridu (g)

$m_{(VIT)}$ = hmotnost vittatinu (g)

$M_{(RCl,anhydrid)}$ = molární hmotnost acylchloridu (g/mol)

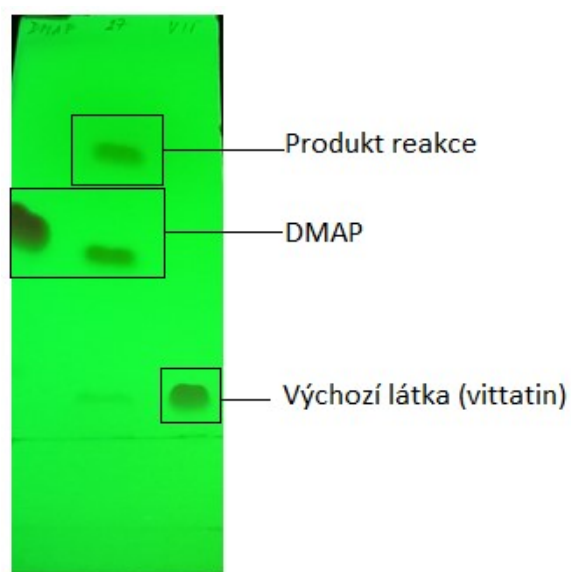
$M_{(VIT)}$ = molární hmotnost vittatinu (g/mol)

Nakonec bylo přimícháno katalytické množství DMAP. Reakční schéma je na obrázku 27.

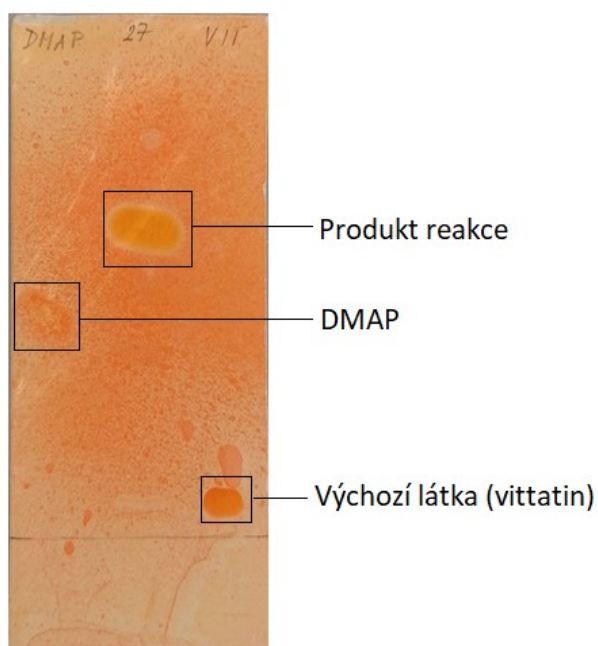


Obrázek 27 Reakční schéma přípravy esterových derivátů vittatinu

Směs byla v uzavřené zkumavce umístěna do parafinové lázně na elektromagnetické míchačce s ohřevem. Reakce probíhala za stálého míchání magnetickým míchadlem při teplotě 70–80 °C asi 16 h. Průběh reakce, byl monitorován pomocí analytické TLC, kdy byly na start naneseny vittatin, DMAP a vzorek odebraný z reakční směsi. Deska byla následně vyvinuta v mobilní fázi To: Et₂NH (9:1) a po vysušení proběhla detekce nejprve pomocí UV lampy při 254 nm a poté postřikem Dragendorffovým činidlem, které barví alkaloidní zóny do tmavě oranžova (obrázky 28 a 29). Podle výsledků detekce byly případně do směsi přidány reakční složky (DMAP, chlorid) anebo se reakce ukončila. Po ukončení reakce byl ze směsi odpařen pyridin a následovala preparativní TLC.



Obrázek 28 Analytická tenkovrstvá chromatografie pod UV lampou při 254 nm



Obrázek 29 Detekce na TLC desce postříkem Dragendorffovým činidlem

Před přípravou etherových derivátů se všechno používané sklo nechalo řádně vysušit v sušárně při 80 °C po dobu jedné hodiny. Navážené množství vittatinu se rozpustilo ve 2 ml tetrahydrofuranu (THF). Směs byla umístěna do ledové lázně v uzavřené varné baňce, do které přes septum jehlou probublával argon, který z baňky vyháněl vzduch, a tak i vzdušnou vlhkost. Celá tato aparatura byla umístěna na elektromagnetické míchačce a reakce probíhala za stálého míchání magnetickým míchadlem. Po 10 minutách následovalo přidání

vypočítaného ekvivalentního množství hydridu sodného, který sloužil k odštěpení vodíku z hydroxylové skupiny vittatinu a umožnil tak tvorbu etheru. Vzorec pro výpočet ekvivalentního množství hydridu sodného:

$$m_{(NaH)} = \frac{m_{(VIT)} \times M_{(NaH)}}{M_{(VIT)}}$$

$m_{(NaH)}$ = hmotnost hydridu sodného (g)

$m_{(VIT)}$ = hmotnost vittatinu (g)

$M_{(NaH)}$ = molární hmotnost hydridu sodného (g/mol)

$M_{(VIT)}$ = molární hmotnost vittatinu (g/mol)

Po 10 minutách se připipetovalo vypočítané ekvivalentní množství příslušného bromidu, které bylo zjištěno dle následující rovnice:

$$V_{(bromid)} = \frac{m_{(VIT)} \times M_{(bromid)}}{M_{(VIT)} \times \rho_{(bromid)}}$$

$V_{(bromid)}$ = objem bromidu (ml)

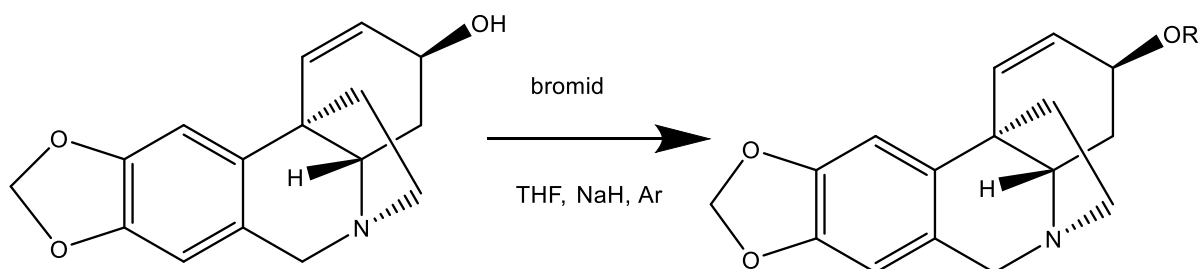
$m_{(VIT)}$ = hmotnost vittatinu (g)

$M_{(bromid)}$ = molární hmotnost bromidu (g/mol)

$M_{(VIT)}$ = molární hmotnost vittatinu (g/mol)

$\rho_{(bromid)}$ = hustota bromidu (g/cm³)

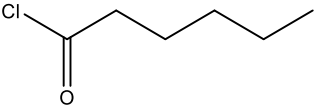
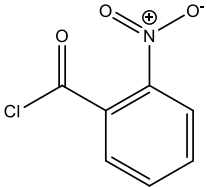
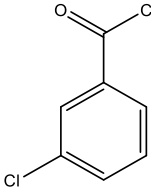
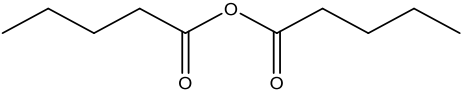
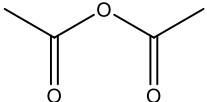
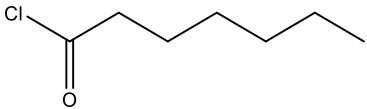
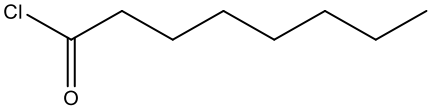
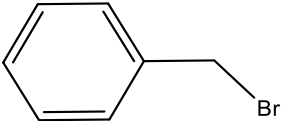
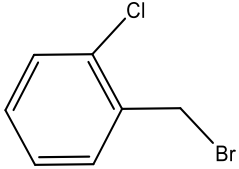
Za dalších 10 minut, se odpojil argon a baňka se vyndala z ledové lázně. Reakce, obrázek 30, se nechala pokračovat za stálého míchání při pokojové teplotě v dobře uzavřené baňce. Průběh reakce se hodnotil pomocí analytické TLC obdobně jako u esterových analog. Podle výsledků detekce se reakce nechala probíhat dál, anebo byla ukončena. Po ukončení reakce následovala preparativní TLC.



Obrázek 30 Reakční schéma přípravy etherových derivátů vittatinu

Reakční činidla pro přípravu polosyntetických derivátů jsou shrnuta v tabulce 14.

Tabulka 14: Reakční činidla pro přípravu polosyntetických derivátů

Derivát	Název derivátu	Reakční činidlo
VIT 24	3- <i>O</i> -hexanoylvittatin	
VIT 25	3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoylvittatin)	
VIT 26	3- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)vittatin	
VIT 27	3- <i>O</i> -pentanoylvittatin	
VIT 28	3- <i>O</i> -acetylvittatin	
VIT 29	3- <i>O</i> -heptanoylvittatin	
VIT 30	3- <i>O</i> -oktanoylvittatin	
VIT-O-1	3- <i>O</i> -benzylvittatin	
VIT-O-2	3- <i>O</i> -(2-chlorbenzyl)vittatin	

4.2.1.2 Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Reakční směs byla rozpuštěna ve směsi EtOH:EtOAc (1:1) a postupně pomocí chromatografického pera nanášena na 5 komerčních desek. Nanášení bylo provedeno v několika vrstvách. Po zaschnutí byly desky vyvíjeny v nasycené chromatografické komoře. Jako mobilní fáze byla použita směs S_1 pro VIT 24 až VIT 28, dále pro VIT-O-1 a VIT-O-2 a S_2 pro VIT 29 a 30. Po vyvinutí byly desky vysušeny a na základě detekce pod UV světlem byly jednotlivé zóny s produktem mechanicky separovány. Produkt byl ze silikagelu vymyt směsí EtOH:CHCl₃ (1:1) přes vrstvu vaty a jímán do baňky. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno. Po odpaření na vakuové odparce byly deriváty dosušeny v exsikátoru za sníženého tlaku. Vysušené deriváty byly následně uloženy v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.2.2 Strukturní analýza derivátů vittatinu

4.2.2.1 ESI-HRMS analýza

ESI-HRMS spektra byla měřena na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Analýzu provedla prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením je metoda používaná k identifikaci a strukturní analýze nových sloučenin, které dosud nebyly popsány v literatuře, a to na základě identifikace iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Určení ESI-HRMS spekter jednotlivých derivátů bylo provedeno pomocí přístroje Synapt G2-Si Q-TOF (Waters), což je hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem v kladném módu a hybridním analyzátozem typu kvadrupól-analyzátor doby letu, v kombinaci s UHPLC systémem Acquity I-Class (Waters). Vzorky byly měřené v prostředí MeCN (acetonitril). Nakonec byly porovnány m/z teoretické s experimentálně zjištěnými. Tyto dvě hodnoty by se od sebe neměly výrazně lišit, ideálně by měly být totožné alespoň do druhého desetinného místa.

4.2.2.2 NMR analýza

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Měření i následnou interpretaci jednotlivých spekter provedli doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. a Mgr. Jana Maříková Ph.D.

NMR analýza byla provedena na spektrometru VNMR S500 pracujícím při frekvenci 500 MHz pro ¹H jádra a při frekvenci 125 MHz pro ¹³C jádra. Měření probíhalo při teplotě 25 °C v roztocích deuterovaného chloroformu (CDCl₃). K ozařování i detekci signálu byla použita

sonda OneNMR, což je širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda se schopností regulace teploty. Chemické posuny δ byly změřeny jako hodnoty pars per milion (ppm) a nepřímo vztaženy k TMS (tetramethylsilanu) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro CDCl_3 jsou hodnoty chemického posunu u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm, u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Data získaná měřením jsou uvedena v tomto pořadí: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletu dubletu, td = triplet dubletu, m = multiplet, bs = široký singlet), integrační konstanta J (Hz).

4.2.2.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost derivátů byla měřena, po převedení derivátu do chloformového roztoku, pomocí automatického polarimetru ADP 220 BS. Měření probíhalo při teplotě 24°C , koncentrace měřeného vzorku byla $0,1\text{ g}/100\text{ ml}$ a délka kyvety $0,5\text{ dm}$. Pro každý vzorek bylo měření provedeno 5x, kdy se jednotlivá měření lišila polohou kyvety, a z jejich průměru byla vypočítána specifická otáčivost pomocí následujícího vzorce:

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

α = naměřená optická otáčivost ($^\circ$)

t = teplota měření ($^\circ\text{C}$)

D = vlnová délka D-linie sodíkového světla (nm) (= $589,3\text{ nm}$)

c = koncentrace měřeného alkaloidu v roztoku (g/100 ml)

l = délka kyvety (dm)

4.2.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterasám

Měření inhibiční aktivity připravených derivátů vůči AChE a BuChE provedla PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Pro stanovení byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda a rekombinantní lidské enzymy, které jsou připravovány na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové.

4.2.3.1 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)

Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Penta, Praha) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (DMSO)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)

Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Penta, Praha) (NaH_2PO_4)

4.2.3.2 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Roztok 5mM DTNB: roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5mM roztok. Roztok je slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týden.

Roztok 10mM ATChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Roztok 10mM BuTChI: roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

4.2.3.3 Pufry

100mM fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200mM roztokem NaH_2PO_4 (1 litru roztoku obsahuje 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B je 200mM roztokem Na_2HPO_4 (1 litru roztoku obsahuje 28,4 g Na_2HPO_4).

4.2.3.4 Enzymy

Používá se médium obsahující rekombinantní enzymy, které se v čas potřeby naředí 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak, aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08 – 0,15 a pro BuChE 0,15 – 0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby (dle vypočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření) do mikrozkušavek, zamrazeno a uchováváno v mrazáku při teplotě při -22 °C do doby použití.

4.2.3.5 Vlastní stanovení inhibiční aktivity

Pro stanovení byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny ($\lambda = 412 \text{ nm}$), obrázek 31. Během stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 min. Hodnoty IC_{50} jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány

s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteras galanthaminem, huperzinem A a berberinem. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

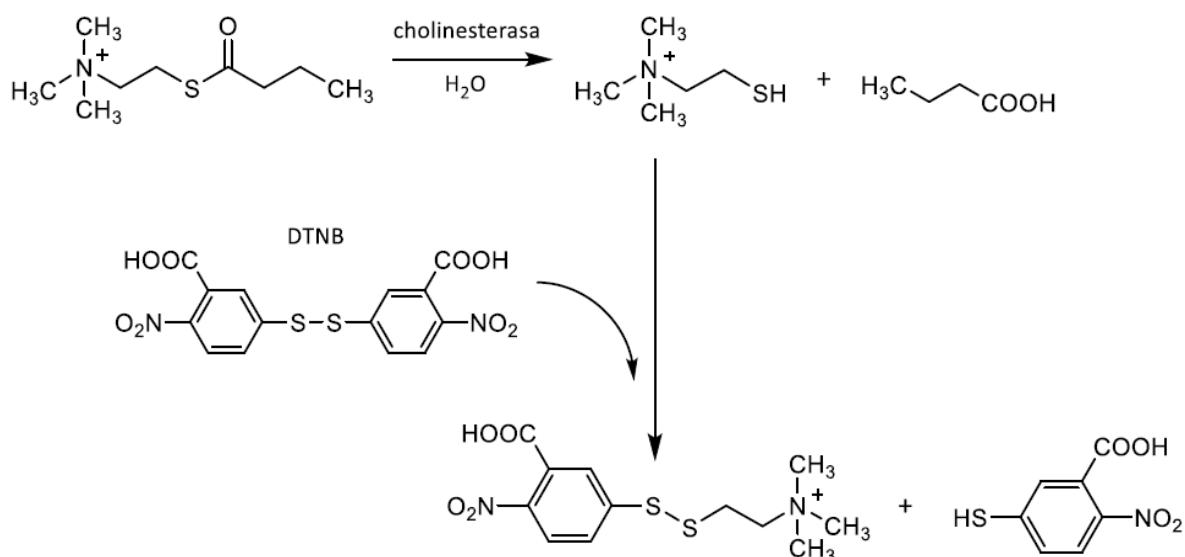
$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \right)$$

% I = procento inhibice;

ΔABL = pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;

ΔASA = absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Nejprve bylo provedeno screeningové měření, kdy se všechny látky měří při koncentraci 100 μ M. U látek, které vykazují při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 50 %, je stanovena IC_{50} .



Obrázek 31 Schéma hydrolytické reakce za použití substrátu a Ellmanova činidla (DTNB) [112]

4.2.4 Stanovení protinádorové aktivity

Deriváty vittatinu byly podrobeny hodnocení na protinádorovou aktivitu. Stanovení provedl RNDr. Radim Havelek, Ph. D. v rámci spolupráce s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

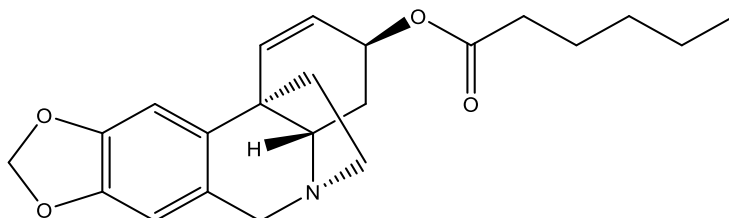
Protinádorové působení bylo testováno *in vitro* u devíti nádorových buněčných liniích. Jednalo se o buňky Jurkat (akutní leukémie T-buněk), MOLT-4 (akutní lymfoblastické leukémie), A549 (epiteliální karcinom plic), HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky břišní), A2780 (karcinom vaječnicků), HeLa (karcinom děložního hrdla), MCF-7 (karcinom prsu) a SAOS-2 (osteosarkom). Pro stanovení cytotoxického účinku

derivátů na zdravé buňky se testování provedlo i u jedné nenádorové buněčné linie MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Inkubace buněčných linií proběhla při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin v prostředí 5% oxidu uhličitého. Následně byly buněčné linie ošetřeny deriváty vittatinu v koncentraci 10 μM. Jako pozitivní kontrola sloužil doxorubicin v koncentraci 1 μM. Po uplynutí 48 hodin byla stanovena životaschopnost buněk v procentech a porovnána s referenční látkou. Více podrobností o stanovení cytotoxické aktivity je dostupných v článku Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity, 2020.

5 VÝSLEDKY

5.1 Polosyntetické deriváty vittatinu, strukturní analýza

5.1.1 3-O-hexanoylvittatin (VIT 24)



Sumární vzorec: C₂₂H₂₉NO₃

Molekulová hmotnost: 355,48

Obrázek 32 Struktura 3-O-hexanoylvittatinu (VIT 24)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -66,7^\circ$ (c = 1 mg/ml, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.85 (1H, s), 6.68 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.52 (1H, s), 5.94 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 5.91 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, overlapped), 5.39–5.33 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.83 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.45–3.36 (2H, m), 2.94 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.25 (2H, td, $J = 7.6$ Hz, $J = 2.0$ Hz, overlapped), 2.23–2.16 (1H, m, overlapped), 2.05–1.90 (2H, m), 1.81 (1H, dd, $J = 13.8$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 1.65–1.54 (2H, m), 1.34–1.19 (4H, m), 0.87 (3H, t, $J = 6.9$ Hz)

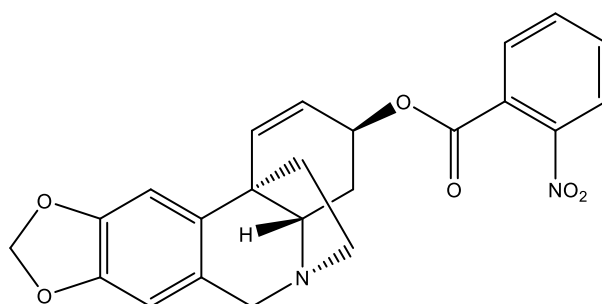
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 173.2, 146.3, 145.9, 137.9, 134.0, 125.9, 123.9, 107.0, 102.8, 100.8, 66.1, 63.3, 62.2, 53.4, 44.2, 44.0, 34.4, 31.2, 29.7, 24.6, 22.2, 13.8

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 370,2022

m/z teoretický (pro C₂₂H₂₉NO₃ [M+H]⁺) = 370,2013

5.1.2 3-O-(2-nitrobenzoyl)vittatin (VIT 25)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{20}N_2O_6$

Molekulová hmotnost: 420,42

Obrázek 33 Struktura 3-O-(2-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT 25)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -25,1^\circ$ ($c = 1 \text{ mg/ml}$, $CHCl_3$)

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.90–7.81 (1H, m), 7.72–7.66 (1H, m), 7.66–7.55 (2H, m), 6.85 (1H, s), 6.77 (1H, d, $J = 10.0 \text{ Hz}$), 6.52–6.48 (1H, m), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 5.2 \text{ Hz}$), 5.94–5.81 (2H, m), 5.66–5.60 (1H, m), 4.44 (1H, d, $J = 16.8 \text{ Hz}$), 3.82 (1H, d, $J = 16.8 \text{ Hz}$), 3.45 (1H, ddd, $J = 14.1 \text{ Hz}$, $J = 10.6 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$), 3.36 (1H, dd, $J = 13.5 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$), 3.00–2.91 (1H, m), 2.28–2.19 (2H, m), 1.99 (1H, ddd, $J = 12.2 \text{ Hz}$, $J = 10.6 \text{ Hz}$, $J = 5.9 \text{ Hz}$), 1.90 (1H, td, $J = 13.5 \text{ Hz}$, $J = 4.3 \text{ Hz}$)

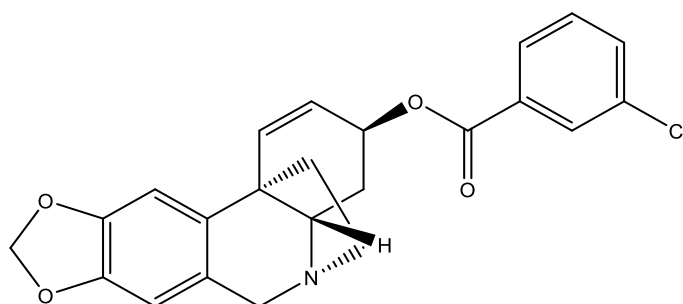
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.8, 148.1, 146.3, 145.9, 137.6, 135.2, 132.8, 131.5, 129.8, 127.8, 125.7, 123.8, 122.8, 107.0, 102.8, 100.8, 68.8, 63.3, 62.1, 53.4, 44.2, 44.0, 29.3

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 421,1396

m/z teoretický (pro $C_{23}H_{20}N_2O_6$ $[M+H]^+$) = 421,1394

5.1.3 3-O-(3-chlorobenzoyl)vittatin (VIT 26)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{20}ClNO_4$

Molekulová hmotnost: 409,87

Obrázek 34 Struktura 3-O-(3-chlorobenzoyl)vittatinu (VIT 26)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -38,6^\circ$ ($c = 1 \text{ mg/ml}$, $CHCl_3$)

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.95 (1H, dd, $J = 2.1 \text{ Hz}$, $J = 1.5 \text{ Hz}$), 7.88 (1H, ddd, $J = 7.8 \text{ Hz}$, $J = 1.5 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 7.50 (1H, ddd, $J = 7.8 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 7.34 (1H, t, $J = 7.8 \text{ Hz}$), 6.88 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 10.0 \text{ Hz}$), 6.54 (1H, s), 6.05 (1H, ddd, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 5.3 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$), 5.91 (1H, d, $J = 12.3 \text{ Hz}$, overlapped), 5.91 (1H, d, $J = 12.3 \text{ Hz}$, overlapped), 5.63–5.57 (1H, m), 4.49 (1H, d, $J = 16.8 \text{ Hz}$), 3.86 (1H, d, $J = 16.8 \text{ Hz}$), 3.52–3.42 (2H, m), 3.02–2.93 (1H, m), 2.30–2.16 (2H, m), 2.05–1.88 (2H, m)

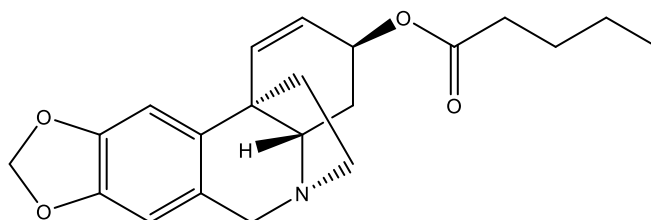
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.7, 146.4, 146.0, 137.6, 134.7, 134.4, 132.9, 132.0, 129.62, 129.57, 127.8, 125.8, 123.5, 107.1, 102.9, 100.9, 67.5, 63.4, 62.1, 53.5, 44.2, 44.0, 29.7

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 410,1168

m/z teoretický (pro $C_{23}H_{20}ClNO_4$ $[M+H]^+$) = 410,1154

5.1.4 3-*O*-pentanoylvittatin (VIT 27)



Sumární vzorec: C₂₁H₂₅NO₄

Molekulová hmotnost: 355,43

Obrázek 35 Struktura 3-*O*-pentanoylvittatinu (VIT 27)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -59,5^\circ$ ($c = 1 \text{ mg/ml}$, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 10.0 \text{ Hz}$, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.92 (dd, $J = 10.0 \text{ Hz}$, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1H), 5.89 (d, $J = 10.9 \text{ Hz}$, overlap, 1H), 5.89 (d, $J = 10.9 \text{ Hz}$, overlap, 1H), 5.37–5.32 (m, 1H), 4.44 (d, $J = 16.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.83 (d, $J = 16.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.45–3.35 (m, 2H), 2.93 (ddd, $J = 13.8 \text{ Hz}$, $J = 9.0 \text{ Hz}$, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H), 2.29–2.16 (m, 3H), 2.03–1.98 (m, 1H), 1.94 (ddd, $J = 12.3 \text{ Hz}$, $J = 10.4 \text{ Hz}$, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H), 1.79 (td, $J = 13.8 \text{ Hz}$, $J = 4.4 \text{ Hz}$, 1H), 1.60–1.50 (m, 2H), 1.35–1.21 (m, 2H), 0.86 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H)

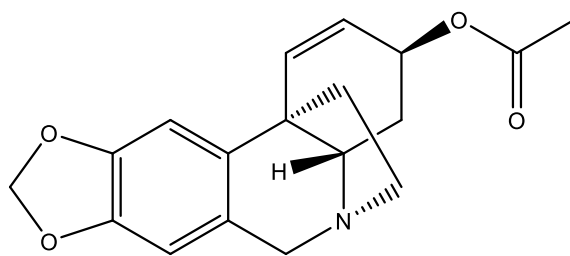
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 146.4, 146.0, 137.9, 134.0, 125.8, 124.0, 107.0, 102.9, 100.9, 66.0, 63.4, 62.1, 53.4, 44.2, 44.0, 34.1, 29.7, 27.0, 22.2, 13.7.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 356,1865

m/z teoretický (pro C₂₁H₂₅NO₄ [M+H]⁺) = 356,18568

5.1.5 3-*O*-acetylvittatin (VIT 28)



Sumární vzorec: C₁₈H₁₉NO₄

Molekulová hmotnost: 313,35

Obrázek 36 Struktura 3-*O*-acetylvittatinu (VIT 28)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -83,5^\circ$ (c = 1 mg/ml, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (s, 1H), 6.66 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.92 (dd, *J* = 9.8 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 12.3 Hz, overlap, 1H), 5.89 (d, *J* = 12.3 Hz, overlap, 1H), 5.35–5.31 (m, 1H), 4.43 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 3.41–3.35 (m, 2H), 2.95–2.87 (m, 1H), 2.23–2.16 (m, 1H), 2.03–1.89 (m, overlap, 2H), 1.99 (s, overlap, 3H), 1.78 (td, *J* = 13.8 Hz, *J* = 4.3 Hz, 1H)

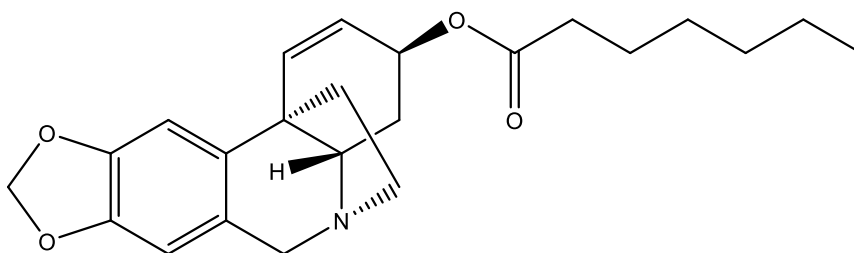
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 146.3, 146.0, 137.9, 134.2, 125.9, 123.8, 107.1, 102.9, 100.9, 66.3, 63.2, 62.0, 53.2, 44.2, 44.0, 29.5, 21.2.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 314,1395

m/z teoretický (pro C₁₈H₁₉NO₄ [M+H]⁺) = 314,16868

5.1.6 3-O-heptanoylvittatin (VIT 29)



Sumární vzorec: C₂₃H₂₉NO₄

Molekulová hmotnost: 383,49

Obrázek 37 Struktura 3-O-heptanoylvittatinu (VIT 29)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -52,3^\circ$ (c = 1 mg/ml, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (s, 1H), 6.67 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.91 (dd, J = 10.0 Hz, J = 5.3 Hz, overlap, 1H), 5.88 (d, J = 11.4 Hz, overlap, 1H), 5.88 (d, J = 11.4 Hz, overlap, 1H), 5.37–5.32 (m, 1H), 4.41 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.79 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.39–3.31 (m, 2H), 2.90 (ddd, J = 12.9 Hz, J = 9.1 Hz, J = 5.9 Hz, 1H), 2.23 (td, J = 7.2 Hz, J = 1.5 Hz, 2H), 2.18 (ddd, J = 12.9 Hz, J = 9.1 Hz, J = 4.3 Hz, 1H), 1.97–1.88 (m, 2H), 1.81–1.75 (m, 1H), 1.60–1.51 (m, 2H), 1.30–1.18 (m, 6H), 0.84 (t, J = 7.2 Hz, 3H)

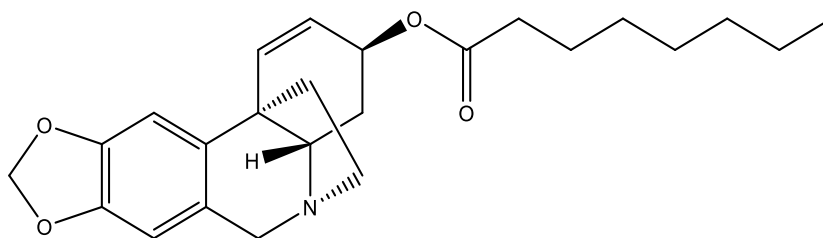
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 146.2, 145.8, 138.2, 134.3, 126.4, 123.9, 107.0, 102.8, 100.8, 66.2, 63.3, 62.4, 53.5, 44.3, 44.1, 34.4, 31.4, 29.9, 28.7, 24.9, 22.5, 14.0.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 384,2173

m/z teoretický (pro C₂₃H₂₉NO₄ [M+H]⁺) = 384,21694

5.1.7 3-O-oktanoylvittatin (VIT 30)



Sumární vzorec: C₂₄H₃₁NO₄

Molekulová hmotnost: 397,52

Obrázek 38 Struktura 3-O-oktanoylvittatinu (VIT 30)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -63,4^\circ$ (c = 1 mg/ml, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.84 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.91 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.2 Hz, overlap, 1H), 5.89 (d, *J* = 11.7 Hz, overlap, 1H), 5.89 (d, *J* = 11.7 Hz, overlap, 1H), 5.37–5.32 (m, 1H), 4.41 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 3.39–3.31 (m, 2H), 2.90 (ddd, *J* = 13.9 Hz, *J* = 8.9 Hz, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.23 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H), 2.18 (ddd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 8.9 Hz, *J* = 4.3 Hz, 1H), 1.98–1.88 (m, 2H), 1.82–1.74 (m, 1H), 1.60–1.51 (m, 2H), 1.29–1.19 (m, 8H), 0.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H);

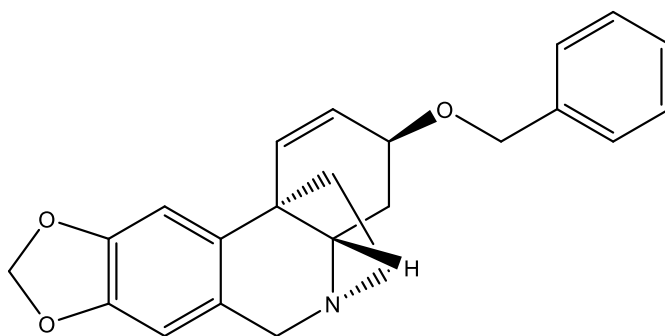
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 146.3, 145.9, 138.0, 134.1, 126.0, 124.0, 107.0, 102.9, 100.9, 66.1, 63.3, 62.2, 53.5, 44.2, 44.1, 34.4, 31.6, 29.7, 29.0, 28.9, 25.0, 22.6, 14.0.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 398,2338

m/z teoretický (pro C₂₄H₃₁NO₄ [M+H]⁺) = 398,23259

5.1.8 3-*O*-benzylvittatin (VIT-O-1)



Sumární vzorec: C₂₃H₂₃NO₃

Molekulová hmotnost: 361,44

Obrázek 39 Struktura 3-*O*-benzylvittatinu (VIT-O-1)

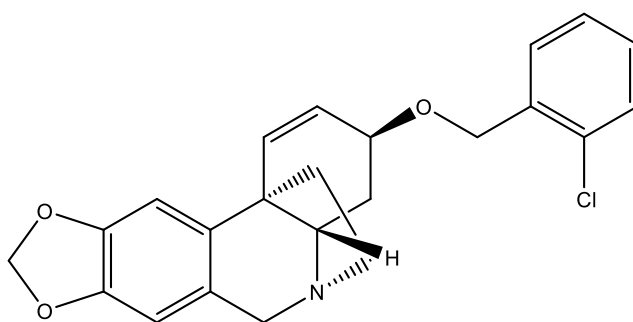
Optická otáčivost nebyla měřena, jelikož se nepodařil připravit derivát v dostatečném množství a čistotě.

NMR bylo změřeno pouze vodíkové, jelikož se nepodařilo připravit derivát v dostatečném množství a čistotě.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.36–7.32 (m, 3H), 7.31–7.24 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.62 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.97 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.91 (d, *J* = 7.3 Hz, overlap, 1H), 5.91 (d, *J* = 7.3 Hz, overlap, 1H), 4.63 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 4.06–4.02 (m, 1H), 3.83 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 3.53–3.40 (m, 2H), 2.99–2.86 (m, 1H), 2.24–2.16 (m, 2H), 2.00–1.90 (m, 1H), 1.66 (td, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.1 Hz, 1H)

ESI-HRMS nebylo měřeno, jelikož se nepodařil připravit derivát v dostatečném množství a čistotě.

5.1.9 3-O-(2-chlorobenzyl)vittatin (VIT-O-2)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{22}ClNO_3$

Molekulová hmotnost: 395,88

Obrázek 40 Struktura 3-O-(2-chlorobenzyl)vittatinu (VIT-O-2)

Optická otáčivost: $[\alpha]_D^{24} = -12^\circ$ ($c=1$ mg/ml, $CHCl_3$):

NMR:

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.26–7.18 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.66 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.01 (dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.90 (d, $J = 8.5$ Hz, overlap, 1H) 5.90 (d, $J = 8.5$ Hz, overlap, 1H), 4.71 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.11–4.07 (m, 1H), 3.80 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 13.2$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 1H), 3.43–3.35 (m, 1H), 2.92 (ddd, $J = 13.2$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H), 2.23–2.15 (m, 2H), 1.94 (ddd, $J = 12.1$ Hz, $J = 10.4$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H), 1.68 (td, $J = 13.2$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 1H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 146.0, 145.6, 138.5, 136.3, 133.2, 132.9, 129.2, 129.2, 128.6, 126.7, 126.5, 125.4, 106.9, 102.9, 100.7, 71.3, 67.8, 63.2, 62.5, 53.6, 44.3, 44.3, 29.4.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 396,1361

m/z teoretický (pro $C_{23}H_{22}ClNO_3$ $[M+H]^+$) = 396,1361

5.2 Výtěžnost reakcí

Pro všechny připravené deriváty byla vypočtena skutečná výtěžnost reakce v procentech, tabulka 15. K výpočtu byly zapotřebí hodnoty jako je navážka vittatinu, vypočítaného teoretického výtěžku a skutečného výtěžku reakce.

Výpočet teoretického výtěžku (mg):

Teoretický výtěžek = navážka vittatinu \times M_r derivátu / M_r vittatinu

Příklad (VIT 27) = $21,2 \times 355,43 / 271,32$
 $\doteq 27,77$ mg

Po zjištění teoretického výtěžku následovalo stanovení skutečné výtěžnosti reakce (%):

Výtěžnost = výtěžek/teoretický výtěžek \times 100

Příklad (VIT 27) = $27/27,77 \times 100$
 $\doteq 97,22$ %

Tabulka 15: Navážky vittatinu (mg) a výtěžnost reakcí (mg; %)

derivát	název	Navážka vittatinu (mg)	Výtěžek (mg)	Výtěžnost (%)
VIT 24	3-O-hexanoylvittatin	30,4	40,8	98,56
VIT 25	3-O-(2-nitrobenzoyl)vittatin	20	21,8	70,34
VIT 26	3-O-(3-chlorbenzoyl)vittatin	20,3	30,6	99,78
VIT 27	3-O-pentanoylvittatin	21,2	27	97,22
VIT 28	3-O-acetylvittatin	20,7	18,7	78,22
VIT 29	3-O-heptanoylvittatin	15,4	12,6	57,89
VIT 30	3-O-oktanoylvittatin	16,2	14,7	61,93
VIT-O-1	3-O-benzylvittatin	51,6	2,3	3,49
VIT-O-2	3-O-(2-chlorbenzyl)vittatin	50,7	12,9	18,08

5.3 Inhibiční aktivita proti AChE a BuChE

Všechny polosyntetické deriváty vittatinu, připravené v dostatečném množství a čistotě, byly hodnoceny na inhibiční aktivitu proti rekombinantní lidské AChE a BuChE. U derivátů, které prokázaly inhibiční potenciál větší než 50 % byla stanovena hodnota IC_{50} .

Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 16. Naměřené hodnoty byly porovnány se známými inhibitory cholinesteras, galanthaminem, huperizinem A a berberinem.

Tabulka 16: Inhibiční schopnost vůči AChE a BuChE připravených derivátů vittatinu

Derivát	Název	AChE (% inhibice)	IC ₅₀ AChE (μM)	BuChE (% inhibice)	IC ₅₀ BuChE (μM)
VIT 24	3- <i>O</i> -hexanoylvittatin	26,65 ± 3,50	>100	84,57 ± 0,81	14,61 ± 2,46
VIT 25	3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)vittatin	66,06 ± 1,30	59,96 ± 1,99	99,19 ± 1,10	1,39 ± 0,08
VIT 26	3- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)vittatin	42,73 ± 3,99	>100	61,64 ± 1,03	36,43 ± 1,62
VIT 27	3- <i>O</i> -pentanoylvittatin	0	>100	54,40 ± 0,91	94,56 ± 5,60
VIT 28	3- <i>O</i> -acetylvittatin	0	>100	22,63 ± 1,84	>100
VIT 29	3- <i>O</i> -heptanoylvittatin	0	>100	89,82 ± 0,39	9,94 ± 0,95
VIT 30	3- <i>O</i> -oktanoylvittatin	0	>100	86,20 ± 2,78	9,19 ± 0,91
VIT-O-1	3- <i>O</i> -benzylvittatin	nestanoveno			
VIT-O-2	3- <i>O</i> -(2-chlorbenzyl)vittatin	16,71 ± 3,67	>100	95,09 ± 0,53	2,66 ± 0,14
	galanthamin		1,70 ± 0,10		42,00 ± 1,00
	huperizin A		0,03 ± 0,00		>500
	berberin		0,70 ± 0,10		30,70 ± 3,50

5.4 Protinádorová aktivita

Jak bylo již řečeno, stanovení protinádorové aktivity připravených derivátů se provádělo u devíti nádorových buněčných linií a jedné nenádorové. Cytotoxické působení bylo prokázáno u VIT 25, 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatinu. Ostatní připravené deriváty se při stejných podmínkách testování prokázaly jako netoxické. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 17 a jsou vyjádřeny jako procento životaschopných buněk po 48 hodinách působení hodnoceného derivátu v koncentraci 10 μM . Jako pozitivní kontrola sloužil doxorubicin v koncentraci 1 μM .

Tabulka 17: Cytotoxický účinek VIT 25 (vyjádřený jako % životaschopných buněk)

Buněčná linie	VIT 25	Doxorubicin
Jurkat	92 \pm 5	3 \pm 1
MOLT-4	86 \pm 10	2 \pm 1
A549	101 \pm 7	11 \pm 2
HT-29	94 \pm 2	60 \pm 8
PANC-1	97 \pm 7	88 \pm 4
A2780	93 \pm 3	21 \pm 6
HeLa	103 \pm 7	14 \pm 3
MCF-7	82 \pm 7	29 \pm 5
SAOS-2	81 \pm 15	18 \pm 5
MRC-5	95 \pm 3	29 \pm 9

6 DISKUZE A ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo připraveno 9 polosyntetických analogů Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu. Tyto deriváty byly připraveny na základě již dříve syntetizovaných látek jejichž základem byly AA vittatin, haemanthamin a ambellin. Jedním z důvodů přípravy byla snaha objasnit vztah mezi strukturou a účinkem na lidské cholinesterasy vzniklých analogů. Inhibiční aktivita byla testována za použití Ellmanovy metody. Jak již bylo popsáno v teoretické části této práce, u všech těchto alkaloidů byly deriváty připraveny substitucí hydroxylových skupin, které se ale nacházejí v různých polohách, obrázek 25. Právě tato skutečnost byla nápomocná při studiu vztahu struktura-účinek.

Přípravou aromatických esterových derivátů haemanthaminu bylo dosaženo významného zesílení inhibiční aktivity proti cholinesterasám. Derivát 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin prokázal duální inhibiční efekt proti AChE (IC_{50} $8,20 \pm 1,30 \mu\text{M}$) i BuChE (IC_{50} $6,60 \pm 1,20 \mu\text{M}$), zatímco 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin inhiboval pouze AChE (IC_{50} $14,70 \pm 1,80 \mu\text{M}$). [65] V případě ambellinu jeho deriváty inhibují AChE pouze slabě. Avšak u jeho aromatických substituovaných esterů v poloze 2 se zvýšil inhibiční účinek vůči BuChE. Konkrétně se jednalo o 11-*O*-(2-methylbenzoyl)ambellin a 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)ambellin s IC_{50} $0,28 \pm 0,02 \mu\text{M}$ a $0,43 \pm 0,04 \mu\text{M}$. [110] Při srovnání derivátů vittatinu s těmito analogy bylo zjištěno, že inhibice AChE není příliš výrazná, ale vůči BuChE se také podařilo připravit významné inhibitory. Mezi nejúčinnější patřily opět deriváty se substitucí v poloze 2 aromatického jádra, a tudíž lze říci, že tato poloha pravděpodobně hraje klíčovou roli v inhibici BuChE, ale již není tak důležitá poloha původní OH skupiny na jednotlivých alkaloidech. Konkrétně se jednalo o 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatin s hodnotami IC_{50} $1,39 \pm 0,08 \mu\text{M}$, který byl připraven v rámci této diplomové práce a byl dokonce již publikován v článku s impakt faktorem. K dalším patří 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatin s IC_{50} $5,40 \pm 0,10$ a 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin s IC_{50} $6,60 \pm 1,20 \mu\text{M}$, které byly připraveny již dříve. [40] [113] Zajímavou BuChE inhibiční aktivitu prokázaly také esterové deriváty VIT 29 (IC_{50} = $9,94 \pm 0,95 \mu\text{M}$), VIT 30 (IC_{50} = $9,19 \pm 0,91 \mu\text{M}$) a VIT 24 (IC_{50} = $14,61 \pm 2,46 \mu\text{M}$). Ze struktury těchto tří derivátů vyplývá, že s prodlužujícím se postranním uhlíkatým řetězcem se zvyšuje inhibiční aktivita, avšak nedosahuje tak dobrých výsledků jako již zmíněné aromatické deriváty.

Když se dále podrobněji podíváme na hodnoty, které vykazovaly jednotlivé deriváty vittatinu, viz. tabulka 16 a článek Al Shammari et al. 2020, lze říci, že výraznou aktivitu mají 3 substituenty (CH_3 -, NO_2 - a Cl -), jejichž společným rysem byla substituce v poloze 2 arylu. Síla inhibice klesala v pořadí NO_2 - > Cl - > CH_3 -. [40] Dále bylo zjištěno, že se vzdalující se substitucí na jádře tato aktivita vůči BuChE klesá. Ačkoliv proti AChE nebyly aktivity derivátů vittatinu tak vysoké, také lze nalézt určitý vzorec pro vztah účinku a struktury. Aktivitu vykazaly pouze aromatické deriváty se substitucí nitroskupinou. Stejně tak i neaktivnější derivát haemanthaminu, o kterém bylo pojednáno výše, obsahuje nitroskupinu. Lze z toho usoudit, že nitroskupina na aromatickém jádře zvyšuje účinnost vůči AChE.

Příprava esterových polosyntetických derivátů AA je docela dobře zdokumentována a úspěšně prováděna v praxi. Výtěžky získaných produktů se ve většině případů pohybují v uspokojivém rozmezí. Avšak úskalím připravených esterů je jejich snadná degradace vlivem esterás, které jsou v organismu hojně zastoupeny a lokalizovány takřka ve všech tkáních a tekutinách. Z tohoto důvodu by bylo dobré připravit polosyntetické ethery, jejichž výtěžky by představovaly dostatečná množství pro identifikační metody a hodnocení biologické aktivity. V rámci této práce byl tedy pokus o přípravu několika etherů. Podařilo se v dostatečném množství připravit pouze jeden, čímž se nám mimo jiné potvrdilo, že převedením esteru na ether aktivita neklesá, naopak mírně stoupla, jak tomu bylo v případě 3-O-(2-chlorbenzyl)vittatinu. Volba přípravy právě tohoto derivátu vyplynula z již připraveného derivátu 3-O-(2-chlorbenzoyl)vittatinu, který jak bylo řečeno vykazoval aktivitu vůči BuChE. Příprava etheru je, ale jak se ukázalo, celkem náročná a výtěžky jsou malé, a proto by bylo vhodné najít lepší způsob jejich přípravy, než který byl použit v této práci.

Připravené deriváty vittatinu byly také podrobeny stanovení protinádorové aktivity i toxicity vůči nenádorové buněčné linii. Žádný z připravených derivátů bohužel nevykázal zajímavou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým liniím. Avšak nevykázaly ani toxické působení proti nenádorové linii. To je dobré zjištění pro další studium látek jako potenciálních kandidátů pro terapii AD. Pro porovnání, v diplomové práci Ivy Valachové byl připraven derivát 3-O-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin, který vykazoval silnou cytotoxickou aktivitu proti nádorovým (A549, HT-29, HeLa, MCF-7), ale i nenádorovým buňkám (MRC-5), díky čemuž se stává prakticky nepoužitelný v terapii. Protinádorová aktivita byla zjištěna i u 3-O-(2-naphthoyl)vittatinu, který byl účinný proti nádorové buněčné linii HT-29. [113]

I když byla připravena již celá řada derivátů vittatinu, bylo by dobré připravit další pro potvrzení našich úsudků. Na závěr lze tedy říci, že byly připraveny netoxické látky s potenciálním uplatněním v léčbě AD. Proto by bylo také vhodné, nejaktivnější látky podrobit studiu na schopnost prostupu přes HEB, jelikož při AD je důležité, aby látky vstupovaly do mozku.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Spilková J. a kolektiv: *Farmakognozie*, Karolinum, Praha 2016.
- [2] Knepper J., Lüddecke T., Preißler K., et al.: Isolation and identification of alkaloids from poisons of fire salamanders (*Salamandra salamandra*). *Journal of Natural Products*, 82, 1319-1324, 2019.
- [3] Oktábec Z., Jampílek J.: Stručná historie chemoterapie. *Chemické listy*, 107, 151-159, 2013.
- [4] https://www.novabotanika.eu/Jedovate_rostliny_medicina.html, staženo 10. 6. 2021
- [5] <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>, staženo 14. 2. 2021
- [6] Jahodář, L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2012.
- [7] <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>, staženo 14. 2. 2021
- [8] Dalecka, M., Havelek, R., Kralovec, et al.: Amaryllidaceae family alkaloids as potential drugs for cancer treatment. *Chemické Listy*, 107, 701-708, 2013.
- [9] Cullen J., Knees S. G., Cubey H. S.: *The European garden flora, flowering plants: A manual for the identification of plants cultivated in Europe, both out-of-doors and under glass. Angiospermae – Monocotyledons*. Cambridge University Press, Cambridge 2011.
- [10] Votrubová O.: *Anatomie rostlin*. Karolinum, Praha 2010.
- [11] <http://www2.biologie.fu-berlin.de/sysbot/poster/poster1.pdf>, staženo 28. 2. 2021
- [12] Novák, J.: *Jedovaté rostliny kolem nás*. Grada Publishing, Praha 2007.
- [13] Al Shammari L., Al Mamun A., Koutová D., et al.: Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 14, 154-159, 2020
- [14] Carter K.: *Amaryllis: Amaryllis belladonna (Brunsvigia rosea) and Hippeastrum hybrids*. Center for landscape and urban horticulture, cooperative extension/Botany plant sciences Department. University of California Riverside, 2007.
- [15] Kunte L., Zelený V.: *Okrasné rostliny tropů a subtropů*. Grada Publishing, Praha 2009.
- [16] <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Hippeastrum>, staženo 28. 2. 2021
- [17] <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Amaryllidaceae/Hippeastrum/>, staženo 28. 2. 2021

- [18] Ortiz J. E., Pingil N. B., Andujar S. A., et al.: Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and their cholinesterase-inhibitory activities: an *in vitro* and *in silico* study. *Journal of Natural Products*, 79, 1-8, 2016.
- [19] Ponert, J.: Život rostlin ve vzduchu. *ŽIVA*, 2, 1–4, 2020.
- [20] De Andrade J. P., Pigni N. B., Torras-Claveria L., et al.: Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Revista latinoamericana de química*, 40, 83-98, 2012.
- [21] <http://www.strangewonderfulthings.com/251.htm>, staženo 28. 2. 2021
- [22] Giordani R. B., De Andrade J. P., Verli H., et al.: Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem.(Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49, 668-672, 2011.
- [23]http://www.plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Amaryllidaceae_Hippeastrum_morelianum_36422.html, staženo 9. 3. 2021
- [24] Silva A. F. S., De Andrade J. P., Machado K. R. B., et al.: Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, 15, 882-885, 2008.
- [25] Schürmann De Silva A. F., De Andrade J. P., Bevilaqua L. R. M., et al.: Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85, 148-154, 2006.
- [26] <https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id392207/?taxonid=62391>, staženo 9. 3. 2021
- [27] De Andrade J. P., Berkov S., Viladomat F., et al.: Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*, 16, 7097-7104, 2011.
- [28] <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id207907/?taxonid=983141> , staženo 10. 3. 2021
- [29] Tallini L. R., Osorio E. H., Dos Santos V. D., et al.: *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid profiling, biological activities and molecular docking. *Molecules*, 22, 1-14, 2017.
- [30] Hoang T. H. X., Ho D.V., Phan K. V., et al.: Effects of *Hippeastrum reticulatum* on memory, spatial learning and object recognition in a scopolamine-induced animal model of Alzheimer's disease. *Pharmaceutical Biology*, 58, 1098-1104, 2020.
- [31] <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/HippeastrumSpeciesTwo>, staženo 11. 3. 2021
- [32] Deepa C. P., Kuriakose B. B.: Pharmacognostic and phytochemical evaluation of the bulbs of *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Voss. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6, 399-404, 2014.

- [33] Santana O., Reina M., Anaya A. L., et al.: 3-O-Acetyl-narcissidine, a bioactive alkaloid from *Hippeastrum puniceum* Lam. (Amaryllidaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 63, 639-643, 2008.
- [34] <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Hippeastrum+puniceum>, staženo 14. 3. 2021
- [35] Gasca C. A., Moreira N. C. S., De Almeida F. C., et al.: Acetylcholinesterase inhibitory activity, anti-inflammatory, and neuroprotective potential of *Hippeastrum psittacinum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 145, 1-13, 2020.
- [36] Amaral A. C.: *Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.: Levantamento das espécies do distrito federal, Brasil, e estudos de multiplicação in vitro*. Disertační práce, 2007.
- [37] Da Silva C. V., Borges F. M., Velozo E. S.: Phytochemistry of some Brazilian plants with aphrodisiac activity. *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 307-326, 2012.
- [38] https://thebulbmaven.typepad.com/the_bulb_maven/2017/02/hippeastrum-glaucescens.html, staženo 14.3.2021
- [39] Azimi M. H., Alavijeh M. K.: Morphological traits and genetic parameters of *Hippeastrum hybridum*. *Ornamental Horticulture*, 26, 579-590, 2020.
- [40] Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany*, 136, 137-146, 2021.
- [41] <https://www.trianglenursery.co.uk/77647-amaryllis-ferrari>, staženo 14. 3. 2021
- [42] Bastida A. J., Berkov S., Torras C. L., et al.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 3, 65-100, 2011.
- [43] Singh A., Desgagné-Penix I.: Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*, 1, 114-120, 2014.
- [44] Giordani B. R., De Brum V. P., Weizenmann M., et al.: Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of natural products*, 73, 2019-2023, 2010.
- [45] Zayed R., El-Shamy H., Berkov S., et al.: *In vitro* micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 695-701, 2011.
- [46] Guerrieri C. G., Pigni N. B., De Andrade J. P., et al.: Alkaloids from *Crinum erubescens* Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, 688-693, 2016.

- [47] Rivero N., Gómez M., Medina J. D.: Search for bioactive alkaloids in *Hymenocallis* species. *Pharmaceutical biology*, 42, 280-285, 2004.
- [48] Cao Z., Yang P., Zhou Q.: Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, 56, 1382-1391, 2013.
- [49] Zhang Y.N., Zhang Q. Y., Li X. D. Xiong J., et al.: Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture. *Emerging Microbes & Infect*, 9, 1170-1173, 2020.
- [50] Singh R. P., Pant N. C.: Lycorine - a resistance factor in the plants of subfamily Amaryllidoideae (Amaryllidaceae) against desert locust, *Schistocerca gregaria* F. *Experientia*, 36, 552-553, 1980.
- [51] Guo Y., Li J. Liu Y., Ma Y., et al.: Inclusion complexes of anhydrolycorine with cyclodextrins: preparation, characterization, and anticancer activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 94, 575-582, 2016.
- [52] Casu L., Cottiglia F., Leonti M., et al.: Ungeremine effectively targets mammalian as well as bacterial type I and type II topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 7041-7044, 2011.
- [53] Szlavik L., Gyuris A., Minárovits J., et al.: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, 70, 871-873, 2004.
- [54] Cahlíková L., Ločárek M., Benešová N., et al.: Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid. *Natural Product Communication*, 8, 781-785, 2013.
- [55] Schmeda-Hirschmann G., Rodríguez J. A., Loyola J. I., et al.: Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 309-312, 2000.
- [56] Miyasaka K., Hiramatsu Y.: Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: II. Effects of blood pressure in rats and dogs and the mechanism of tachyphylaxis to the vasodepressor action of lycorenine in rats. *The Japanese Journal Pharmacology*, 30, 655-664, 1980.
- [57] Zhou T., Tan L., Cederquist G. Y., et al.: High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit Zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain. *Cell Stem Cell*, 21, 274-283, 2017.

- [58] He J., Qi W. B., Wang L., et al.: Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza Other Respir Viruses*, 7, 922-931, 2013.
- [59] Martinez-Peinado N., Nuria Cortes-Serra N., Torras-Claveria L., et al.: Amaryllidaceae alkaloids with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Parasites&Vectors*, 13, 1-10, 2020.
- [60] Chen G. L., Tian Y. Q., Wu J. L., et al.: Antiproliferative activities of Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I. *Scientific Reports*, 6, 1-10, 2016.
- [61] Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., et al.: (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*, 65, 2113-2118, 2004.
- [62] Giordani R. B., Weizenmann M., Rosemberg D. B., et al.: *Trichomonas vaginalis* nukleoside triphosphate diphosphohydrolase and esto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International*, 59, 226-231, 2010.
- [63] Öhlschlegelová J.: *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod Hippeastrum*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- [64] Pellegrino S., Meyer M., Zorbas C., et al.: The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth. *Structure*, 26, 416-425, 2018.
- [65] Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., et al.: Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. *Molecules*, 24, 1307, 2019.
- [66] Berkov S., Romani S., Herrera M., et al.: Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*, 25, 1686-1692, 2011.
- [67] Campbell W. E., Nair J. J., Gammon D. W., et al.: Cytotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta Medica*, 64, 91-93, 1998.
- [68] Elgorashi E. E., Stafford G. I., Jäger A. K., et al.: Inhibition of [3H] citalopram binding to the rat brain serotonin transporter by Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med*, 72, 470-473, 2006.
- [69] Boit H. G., Döpke W.: Alkaloide aus *Hippeastrum brachyandrum* und *Hippeastrum rutilum*. *Chemische Berichte*, 92, 2582-2584, 1959.
- [70] Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., et al.: Alkaloids from *Chlidanthus rangrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyloligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, 8, 1541-1544, 2013.

- [71] Cahlíková L., Pérez D.I., Štěpánková Š., et al.: *In Vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Journal of natural products*, 78, 1189-1192, 2015.
- [72] Koutová D., Maafi N., Havelek R., et al.: Chemical and biological aspects of montanine-type alkaloids isolated from plants of the Amaryllidaceae family. *Molecules*, 25, 2337, 2020.
- [73] Farinon M., Clarimundo V. S., Pedrazza G. P., et al.: Disease modifying anti-rheumatic activity of the alkaloid montanine on experimental arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *European Journal of Pharmacology*, 799, 180-187, 2017.
- [74] Castilhos T. S., Giordanil R. B., Henriquesl A. T., et al.: *In vitro* evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the montanine alkaloid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 209-214, 2007.
- [75] Albalawi A. S., Cimmino A., van Otterlo W. A. L., et al: Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany*, 126, 277-281, 2019.
- [76] Pagliosa L. B., Monteiro S. C. , Silva K. B., et al.: Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*, 17, 698-701, 2010.
- [77] Breiterová K., Koutová D., Maříková J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids of different structural type from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and their cytotoxicity activity. *Plants*, 9, 137, 2020.
- [78] Cedrón J. C., Ravelo A. G., León L. G., et al.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molekuly*, 20, 13854–13863, 2015.
- [79] Labraña J., Machocho A. K., Kricsfalusy V., et al.: Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus*. *Fytochemie*, 60, 847–852, 2002.
- [80] Furusawa E., Furusawa S., Lee J. Y. B., et al.: Therapeutic activity of pretazettine, a *Narcissus* alkaloid on Rauscher leukemia: comparison with tazettine and streptonigrin. *Experimental Biology and Medicine*, 152, 186-191, 1976.
- [81] Furusawa E., Furusawa S.: Therapeutic potentials of pretazettine, standard anticancer drugs, and combinations on subcutaneously implanted Lewis lung carcinoma. *Chemotherapy*, 32, 521–529, 1986.

- [82] Furusawa E., Lum M. K., Furusawa S.: Therapeutic activity of pretazettine on Erlich ascites carcinoma: adjuvant effect on standard drugs in ABC regimen. *Chemotherapy*, 27, 277-286, 1981.
- [83] Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., et al.: Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo*, 23, 41-48, 2009.
- [84] De Paiva J. R., De Queiroz Souza A. S., Pereira R. D. C. A., et al.: Chemical composition and anticholinesterase activity of cultivated bulbs from *Hippeastrum elegans*, a potential tropical source of bioactive alkaloids. *Phytochemistry Letters*, 43, 27-34, 2021.
- [85] Döpke W., Pham L. H., Gründemann E. et al: Alkaloids from *Hippeastrum equestre*; Part I: phamine, a new phenanthridone alkaloid. *Planta medica*, 61, 564-566, 1995.
- [86] https://www.wikiskripta.eu/w/Alzheimerova_choroba, staženo 14. 5. 2021
- [87] <https://www.wikiskripta.eu/w/Acetylcholin>, staženo 14. 5. 2021
- [88] Tsvetkova D., Obreshkova D., Zheleva-Dimitrova D., et al.: Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 4595-4608, 2013.
- [89] López S., Bastida J., Viladomat F., et al.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, 71, 2521-2529, 2002.
- [90] Reyes-Chilpa R., Berkov S., Hernández-Ortega S., et al.: Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, 16, 9520-9533, 2011.
- [91] Cahlíková, L., Vaněčková, N., Šafratová, M., et al.: The genus *Nerine* Herb.(Amaryllidaceae): Ethnobotany, phytochemistry, and biological activity. *Molecules*, 24, 4238, 2019.
- [92] Al Mamun A., Maříková J., Hulcová D., et al.: Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, 10, 800, 2020.
- [93] Shawky E.: *In-silico* profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69, 1592-1605, 2017.
- [94] Boit H. G.: Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*, 89, 1129-1134, 1956.

- [95] Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., et al.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1120-1127, 2013.
- [96] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vittatine>, staženo 2. 4. 2021
- [97] Uyeo S., Kotera K., Okada T., et al.: Occurrence of the alkaloids vittatine and haemanthamine in *Lycoris radiata* HERB. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 14, 793-794, 1966.
- [98] Kilgore M. B., Kutchan T. M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry reviews*, 15, 317-337, 2016.
- [99] Bastida J., Contreras J., Codina C., et al.: Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry*, 40, 1549-1551, 1995.
- [100] Kihara M., Koike T., Imakura Y., et al.: Alkaloidal constituents of *Hymenocallis rotata* HERB. (Amaryllidaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 1070-1075, 1987.
- [101] Aboul-Ela M. A., El-Lakany A. M., Hammoda H. M.: Alkaloids from the bulbs of *Crinum bulbispermum*. *Pharmazie*, 59, 894-896, 2004.
- [102] Hoshino O.: The Amaryllidaceae alkaloids. *The Alkaloids*, 51, 323-376, Academic Press 1998.
- [103] Bohno M., Sugie K., Imase H., et al.: Total synthesis of Amaryllidaceae alkaloids, (+)-vittatine and (+)-haemanthamine, starting from D-glucose. *Tetrahedron*, 63, 6977-6989, 2007.
- [104] Wei M. X., Wang C. T., Du J. Y., et al.: Enantioselective synthesis of Amaryllidaceae alkaloids (+)-vittatine, (+)-*epi*-vittatine, and (+)-buphanisine. *Chemistry—An Asian Journal*, 8, 1966-1971, 2013.
- [105] Das M. K., Kumar N., Bisai A.: Catalytic asymmetric total syntheses of naturally occurring Amaryllidaceae alkaloids, (-)-crinine, (-)-*epi*-crinine, (-)-oxocrinine, (+)-*epi*-elwesine, (+)-vittatine, and (+)-*epi*-vittatine. *Organic Letters*, 20, 4421-4424, 2018.
- [106] Giordani R. B., Junior C. O. R., De Andrade J. P., et al.: Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chemical Biology & Drug Design*, 80, 129-133, 2012.
- [107] Wang Q. H., Wan Q. L., Gu C. D., et al.: Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal*, 6, 1-6, 2012.

- [108] Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., et al.: Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 5464-5472, 2012.
- [109] Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., et al.: Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules*, 23, 719, 2018.
- [110] Maříková J., Ritomská A., Koráběčný J., et al.: Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of natural products*, 83, 1359-1367, 2020.
- [111] Atanasova M., Stavrakov G., Philipova I., et al.: Galantamine derivatives with indole moiety: docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 5382-5389, 2015.
- [112] Zeman J., Vetchý D., Franc A., et al.: Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. *Chemické listy*, 112, 434-439, 2018.
- [113] Valachová I.: *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů jako látky potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2020.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 zleva – <i>Galanthus nivalis</i> L., <i>Leucojum vernum</i> L.	12
Obrázek 2 <i>Hippeastrum argentinum</i> , struktura 7-hydroxyklivoninu	15
Obrázek 3 <i>Hippeastrum aulicum</i> var. <i>robustum</i>	16
Obrázek 4 <i>Hippeastrum morelianum</i> , struktura kandiminu	17
Obrázek 5 <i>Hippeastrum vittatum</i>	18
Obrázek 6 <i>Hippeastrum papillio</i>	19
Obrázek 7 <i>Hippeastrum reticulatum</i>	20
Obrázek 8 <i>Hippeastrum puniceum</i>	20
Obrázek 9 <i>Hippeastrum psittacinum</i>	21
Obrázek 10 <i>Hippeastrum</i> cv. Ferrari	23
Obrázek 11 Syntéza norbelladinu	24
Obrázek 12 Fenolová oxidační cyklizace	25
Obrázek 13 Struktura 4,5-dehydroanhydrolykorinu	28
Obrázek 14 Struktura lykorinu	28
Obrázek 15 Struktura homolykorinu	29
Obrázek 16 Struktura haemanthaminu	30
Obrázek 17 Struktura krininu	31
Obrázek 18 Struktura montaninu	33
Obrázek 19 Struktura tazettinu	35
Obrázek 20 Struktura pankratistatinu	36
Obrázek 21 Struktura galanthaminu	37
Obrázek 22 Struktura belladinu	39
Obrázek 23 Struktura vittatinu	40
Obrázek 24 Struktura derivátu 11-hydroxyvittatinu s nejvyšší antimalarickou aktivitou	46
Obrázek 25 Struktura alkaloidů, u kterých proběhla příprava polosyntetických derivátů s vyznačením substituovaných hydroxylových skupin	48
Obrázek 26 Indolové deriváty galanthaminu	49
Obrázek 27 Reakční schéma přípravy esterových derivátů vittatinu	52
Obrázek 28 Analytická tenkovrstvá chromatografie pod UV lampou při 254 nm	53
Obrázek 29 Detekce na TLC desce postříkem Dragendorffovým činidlem	53
Obrázek 30 Reakční schéma přípravy etherových derivátů vittatinu	54
Obrázek 31 Schéma hydrolytické reakce za použití substrátu a Ellmanova činidla	59
Obrázek 32 Struktura 3- <i>O</i> -hexanoylvittatinu (VIT 24)	61
Obrázek 33 Struktura 3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT 25)	62
Obrázek 34 Struktura 3- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)vittatinu (VIT 26)	63
Obrázek 35 Struktura 3- <i>O</i> -pentanoylvittatinu (VIT 27)	64
Obrázek 36 Struktura 3- <i>O</i> -acetylvittatinu (VIT 28)	65
Obrázek 37 Struktura 3- <i>O</i> -heptanoylvittatinu (VIT 29)	66
Obrázek 38 Struktura 3- <i>O</i> -oktanoylvittatinu (VIT 30)	67
Obrázek 39 Struktura 3- <i>O</i> -benzylvittatinu (VIT-O-1)	68
Obrázek 40 Struktura 3- <i>O</i> -(2-chlorobenzyl)vittatinu (VIT-O-2)	69

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam buněčných linií uvedených v textu diplomové práce	8
Tabulka 2: Taxonomické zařazení rodu <i>Hippeastrum</i>	13
Tabulka 3: IC ₅₀ (μM) alkaloidů izolovaných z <i>H. argentinum</i>	15
Tabulka 4: Cytotoxická aktivita extraktů a alkaloidů izolovaných z <i>H. vittatum</i>	17
Tabulka 5: Hodnoty IC ₅₀ montaninu na rakovinné a nerakovinné buňky	22
Tabulka 6: Přehled strukturních typů AA, jejich zástupců a druhů rodu <i>Hippeastrum</i> , ze kterého byly izolovány	26
Tabulka 7: In vitro IC ₅₀ montaninu v μM	34
Tabulka 8: Hodnoty IC ₅₀ vittatinu a jeho derivátů proti lidským choliesterasam	42
Tabulka 9: Antiprotozoální aktivita lykorinu a jeho derivátů	43
Tabulka 10: Inhibiční efekt lykorinových derivátů proti lidské AChE a BuChE	44
Tabulka 11: Působení derivátů haemanthaminu vůči lidským cholinestarasam (μM)	47
Tabulka 12: Inhibiční aktivita derivátů ambellinu vyjádřená jako IC ₅₀ v μM	48
Tabulka 13: Hodnoty IC ₅₀ derivátů galanthaminu (μM).....	49
Tabulka 14: Reakční činidla pro přípravu polosyntetických derivátů	55
Tabulka 15: Navážky vittatinu (mg) a výtěžnost reakcí (mg; %)	70
Tabulka 16: Inhibiční schopnost vůči AChE a BuChE připravených derivátů vittatinu	71
Tabulka 17: Cytotoxický účinek VIT 25 (vyjádřený jako % životaschopných buněk).....	72

10 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Soňa Knápková

Školitel: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Název diplomové práce: Amaryllidaceae alkaloidy jako předlohy pro vývoj nových potenciálních léčiv

Čeď Amaryllidaceae zahrnuje velké množství rodů kvetoucích rostlin jako *Hippeastrum*, *Narcissus* nebo *Zephyranthes*. Všechny obsahují specifické alkaloidy Amaryllidaceae, které jsou pro tuto čeď charakteristické svými chemickými strukturami. Objev a studium těchto alkaloidů upoutalo pozornost mnoha vědců kvůli rozmanité biologické aktivitě těchto sloučenin, jako je například cytotoxický, anticholinesterasový, antibakteriální a antivirový efekt.

Rostliny rodu *Hippeastrum* se v tradiční medicíně používají k léčbě nádorů a zánětlivých poruch. Toto použití lze vysvětlit alkaloidy, které obsahuje. Je to hlavně lykorin, haemanthamin a pankristatin. Tyto sloučeniny mají protinádorový účinek. Druh *Hippeastrum* cv. Ferrari je dále bohatý na alkaloid vittatin. V některých výzkumech jednoduché polosyntetické deriváty haemanthaminu vykazovaly slibné inhibiční aktivity proti cholinesterasám. Z tohoto důvodu byl jako další hlavní struktura pro přípravu semisyntetických derivátů zvolen vittatin.

Sedm nových derivátů bylo připraveno esterifikací alkaloidu vittatinu a dva byly vytvořeny ve formě etherů. Všechny byly identifikovány pomocí NMR a HRMS analýzy. Následně byla studována schopnost derivátů inhibovat lidskou acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE). Většina připravených derivátů vykazovala dobrý inhibiční potenciál proti BuChE. Nejlepší z nich vykazovaly aktivitu s hodnotami IC_{50} $1,39 \pm 0,08 \mu M$.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, rod *Hippeastrum*, polosyntetické deriváty, vittatin

11 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Soňa Knápková

Supervisor: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Amaryllidaceae alkaloids as model structures for the development of new potential drugs

The family Amaryllidaceae includes a large number of genus of flowering plants as *Hippeastrum*, *Narcissus* or *Zephyrantes*. All of them contain specific Amaryllidaceae alkaloids, which are characteristic of this family due to their chemical structures. The discovery and study of these alkaloids has attracted the attention of many scientists due to the diverse biological activity of these compounds, such as cytotoxic, anticholinesterases, antibacterial and antiviral effects.

Plants of the genus *Hippeastrum* have been used in traditional medicine to treat tumors and inflammatory disorders. This use can be explained by the alkaloids, which it contains. It is mainly lycorine, haemanthamine and pancristatine. These compounds have an antitumor effect. The species *Hippeastrum* cv. Ferrari is further rich in the alkaloid vittatine. In some research, the simple semisynthetic derivatives of haemanthamine displayed promising inhibitory activities against cholinesterases. For this reason, vittatine was chosen as next lead-structure, for preparation of semisynthetic derivatives.

Seven new derivatives were prepared by esterification of alkaloid vittatine and two was created in the form of ethers. All of them were identified by NMR and HRMS analysis. Subsequently, the ability of the derivatives to inhibit human acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) was studied. Most of the prepared derivatives showed good inhibitory potential against BuChE. The best of them shown activity with IC₅₀ values 1.39 ± 0,08 μM.

Key words: Amaryllidaceae, genus *Hippeastrum*, semisynthetic derivatives, vittatine