

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Deriváty Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu ako potenciálne liečivá

Derivatives of Amaryllidaceae alkaloid vittatine as potential drugs

Vedúci katedry:
Vedúci diplomovej práce:

doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.
PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Hradec Králové, august 2021

Michaela Teplanská

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne pod vedením PharmDr. Daniely Hulcovej, Ph.D. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, august 2021

Michaela Teplanská

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala PharmDr. Daniele Hulcovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu, veľmi ústretový prístup a poskytnuté materiály pri vypracovaní mojej diplomovej práce, taktiež za cenné rady, usmernenie a pomoc počas práce v laboratóriu a za stanovenie anticholínesterázovej inhibičnej aktivity pripravených derivátov. Ďakujem aj prof. Ing. Lucii Cahlíkovej, Ph.D. za odborné poznatky a praktické skúsenosti pri príprave derivátov. Ďalej moje poďakovanie patrí prof. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za zmeranie ESI-HRMS spektier, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Jane Maříkovej, Ph.D. za zmeranie a interpretáciu NMR spektier, Mgr. Eliške Kohelovej a Ing. Rozálii Peřinovej za pomoc pri príprave hydrochloridov, RNDr. Radimovi Havelkovi, Ph.D. za stanovenie cytotoxicity derivátov, Katedre farmaceutickej botaniky a Katedre farmakognózie za potrebné vybavenie a priestor na realizáciu práce a ostatným pracovníkom týchto katedier za ochotu a vytvorenie vynikajúceho pracovného prostredia a príjemnej atmosféry. Na záver by som tiež rada poďakovala svojej rodine a partnerovi za podporu.

Obsah

1. ÚVOD	12
2. CIELE PRÁCE	14
3. TEORETICKÁ ČASŤ	15
3.1 Čeľad' Amaryllidaceae.....	15
3.1.1 Rastliny podčeľade Amaryllidoideae.....	15
3.2 Amaryllidaceae alkaloidy.....	17
3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov	17
3.2.2 Štruktúrne typy Amaryllidaceae alkaloidov a ich výskyt.....	20
3.2.3 Biologická aktivita haemantamínových alkaloidov	23
3.2.3.1 Protinádorová aktivita	24
3.2.3.2 Biologická aktivita súvisiaca s Alzheimerovou chorobou	28
3.2.3.3 Antimikrobiálna aktivita	33
3.2.3.4 Ďalšia biologická aktivita	36
3.3 Deriváty haemantamínových alkaloidov a ich biologická aktivita	37
3.3.1 Deriváty s protinádorovou aktivitou	37
3.3.2 Deriváty s antimalarickou aktivitou	45
3.3.3 Deriváty s aktivitou využiteľnou v terapii Alzheimerovej choroby	49
3.4 Alkaloid vittatín	54
3.4.1 Charakteristika štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností vittatínu	54
3.4.2 Biosyntéza vittatínu.....	55
3.4.3 Výskyt a zdroje vittatínu.....	56
3.4.4 Biologická aktivita vittatínu.....	57
3.4.5 Deriváty vittatínu.....	60
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	64
4.1 Chemikálie a materiál.....	64

4.1.1	Rastlinný materiál.....	64
4.1.2	Rozpúšťadlá a chemikálie.....	64
4.1.3	Detekčné činidlo.....	65
4.1.4	Mobilná fáza pre analytickú a preparatívnu TLC.....	65
4.1.5	Stacionárna fáza pre analytickú a preparatívnu TLC.....	65
4.2	Metódy.....	66
4.2.1	Izolácia alkaloidu vittatínu.....	66
4.2.2	Príprava polosyntetických derivátov vittatínu.....	67
4.2.2.1	Analytická tenkovrstvová chromatografia.....	68
4.2.2.2	Preparatívna tenkovrstvová chromatografia.....	69
4.2.2.3	Elúcia, odparovanie a sušenie.....	70
4.2.3	Štruktúrna analýza derivátov vittatínu.....	70
4.2.3.1	ESI-HRMS analýza.....	70
4.2.3.2	NMR analýza.....	70
4.2.3.3	Meranie optickej otáčavosti.....	71
4.2.4	Meranie biologickej aktivity pripravených derivátov vittatínu.....	71
4.2.4.1	Príprava hydrochloridov derivátov.....	71
4.2.4.2	Stanovenie inhibičnej aktivity voči AChE a BuChE.....	72
4.2.4.3	Stanovenie cytotoxickéj aktivity.....	74
5.	VÝSLEDKY.....	76
5.1	Pripravené deriváty vittatínu a ich štruktúrna analýza.....	76
5.1.1	3- <i>O</i> -benzoylvittatín (VIT13).....	76
5.1.2	3- <i>O</i> -(2-furoyl)vittatín (VIT14).....	77
5.1.3	3- <i>O</i> -(3-furoyl)vittatín (VIT15).....	78
5.1.4	3- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)vittatín (VIT16).....	79
5.1.5	3- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)vittatín (VIT17).....	80

5.1.6	3- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)vittatín (VIT18).....	81
5.1.7	3- <i>O</i> -(4-metoxybenzoyl)vittatín (VIT19).....	82
5.1.8	3- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatín (VIT20).....	83
5.1.9	3- <i>O</i> -(3,5-dimetylbenzoyl)vittatín (VIT21).....	84
5.1.10	3- <i>O</i> -(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín (VIT22).....	85
5.1.11	3- <i>O</i> -(2,3-difluoro-4-metylbenzoyl)vittatín (VIT23).....	86
5.2	Výťažnosť reakcií	87
5.3	Biologická aktivita derivátov vittatínu.....	88
5.3.1	Inhibičná aktivita voči cholinesterázam a schopnosť transportu cez HEB.....	88
5.3.2	Cytotoxická aktivita	89
6.	DISKUSIA A ZÁVER	90
7.	ABSTRAKT	93
8.	ABSTRACT	94
9.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	95

Zoznam obrázkov

Obr. 1: Rastliny podčeláde Amaryllidoideae	15
Obr. 2: Výskyt rastlín z podčeláde Amaryllidoideae.....	16
Obr. 3: Rastliny podčeláde Amaryllidoideae vyskytujúce sa v Českej republike	16
Obr. 4: Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov	19
Obr. 5: Amaryllidaceae alkaloidy minoritných štruktúrnych typov	23
Obr. 6: Haemantamínové alkaloidy s protinádorovou aktivitou.....	25
Obr. 7: Štruktúra mozgu a neurónov vo fyziologickom stave (a) a pri AD (b).....	28
Obr. 8: Inhibícia tvorby A β v bunkách HeLa stabilne exprimujúcich APPsw.....	33
Obr. 9: Deriváty krinamínu (1a, 1b, 2a), hamaynu (2b), haemantamínu (3a), haemantidínu (3b) a bulbispermínu (3c)	38
Obr. 10: Príprava derivátov bulbispermínu (4a - 4f)	39
Obr. 11: Príprava derivátov bulbispermínu (4g – 4i).....	40
Obr. 12: Príprava derivátov 11-hydroxyvittatínu (5a – 5c)	42
Obr. 13: Príprava derivátov haemantidínu (7a – 7e).....	42
Obr. 14: Príprava derivátov haemantamínu (6a – 6k).....	43
Obr. 15: Príprava derivátov haemantamínu (6l – 6s)	47
Obr. 16: Príprava derivátov haemantidínu (7f – 7g)	47
Obr. 17: Príprava derivátov 11-hydroxyvittatínu (5d, 5e).....	47
Obr. 18: Príprava derivátov haemantamínu (1 – 34)	50
Obr. 19: Štruktúra vittatínu	54
Obr. 20: Biosyntéza vittatínu a ďalších odvodených štruktúr	55
Obr. 21: <i>Hippeastrum X hybridum</i> cv. Ferrari.....	56
Obr. 22: Príprava derivátov vittatínu (8a – 8r)	61
Obr. 23: Reakčná schéma prípravy derivátov vittatínu.....	68
Obr. 24: Analytická TLC.....	68
Obr. 25: Detekcia na TLC chromatograme pod UV žiarením	69
Obr. 26: Detekcia na TLC chromatograme postrekom Dragendorffovym činidlom	69
Obr. 27: Enzymatická hydrolýza substrátu v prítomnosti Ellmanovho činidla (DTNB)	73
Obr. 28: Redukcia tetrazóliovej soli WST-1 na formazán	75
Obr. 29: Štruktúra 3-O-benzoylvittatínu (VIT13).....	76

Obr. 30: Štruktúra 3- <i>O</i> -(2-furoyl)vittatínu (VIT14)	77
Obr. 31: Štruktúra 3- <i>O</i> -(3-furoyl)vittatínu (VIT15)	78
Obr. 32: Štruktúra 3- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)vittatínu (VIT16)	79
Obr. 33: Štruktúra 3- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)vittatínu (VIT17)	80
Obr. 34: Štruktúra 3- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)vittatínu (VIT18).....	81
Obr. 35: Štruktúra 3- <i>O</i> -(4-metoxybenzoyl)vittatínu (VIT19).....	82
Obr. 36: Štruktúra 3- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatínu (VIT20).....	83
Obr. 37: Štruktúra 3- <i>O</i> -(3,5-dimetylbenzoyl)vittatínu (VIT21).....	84
Obr. 38: Štruktúra 3- <i>O</i> -(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatínu (VIT22).....	85
Obr. 39: Štruktúra 3- <i>O</i> -(2,3-difluoro-4-metylbenzoyl)vittatínu (VIT23).....	86

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Základné štruktúrne typy Amaryllidaceae alkaloidov	20
Tabuľka 2: Haemantamínové alkaloidy izolované z druhu <i>Z. robusta</i> a ich inhibičná aktivita proti ľudským cholinesterázam	31
Tabuľka 3: AChE a BuChE inhibičná aktivita haemantamínových alkaloidov izolovaných z druhov rastliny <i>Hieronymiella</i>	31
Tabuľka 4: HuAChE, HuBuChE, and POP inhibičná aktivita vybraných alkaloidov izolovaných z <i>Nerine bowdenii</i>	32
Tabuľka 5: GSK-3 β inhibičný potenciál haemantamínových alkaloidov a masonínu	32
Tabuľka 6: Antiprotozoárna a cytotoxická aktivita haemantamínových alkaloidov z <i>Galanthus trojanus</i>	34
Tabuľka 7: Antiplazmodiálna aktivita haemantamínových alkaloidov z <i>G. trojanus</i>	35
Tabuľka 8: Antiprotozoárna a cytotoxická aktivita 3- <i>O</i> -acetylhamaynu	35
Tabuľka 9: Antiplazmodiálna a cytotoxická aktivita krinamínu a hamaynu	36
Tabuľka 10: Cytotoxická aktivita derivátov bulbispermínu	41
Tabuľka 11: Cytotoxická aktivita haemantamínových alkaloidov a ich derivátov	44
Tabuľka 12: Antimalarická aktivita haemantamínových alkaloidov a ich derivátov	48
Tabuľka 13: Inhibičná aktivita derivátov haemantamínu proti cholinesterázam	52
Tabuľka 14: Inhibičná aktivita derivátov haemantamínu proti GSK-3 β	53
Tabuľka 15: Inhibičná aktivita haemantamínu a jeho derivátu proti POP	53
Tabuľka 16: Cytotoxická aktivita vittatínu, montanínu a hippeastrínu	59
Tabuľka 17: Cytotoxická aktivita alkaloidov izolovaných z <i>Hippeastrum vittatum</i>	59
Tabuľka 18: <i>h</i> AChE, <i>h</i> BuChE a POP inhibičná aktivita vybraných alkaloidov izolovaných z <i>Hippeastrum</i> cv. Ferrari	60
Tabuľka 19: Anticholinesterázová aktivita derivátov vittatínu	62
Tabuľka 20: Percentuálna výťažnosť pripravených derivátov vittatínu	87
Tabuľka 21: Anticholinesterázová aktivita derivátov vittatínu VIT13 – VIT23 a ich logBB .	88
Tabuľka 22: Cytotoxická aktivita derivátov vittatínu VIT14 – VIT18	89
Tabuľka 23: Cytotoxická aktivita derivátov vittatínu VIT19 – VIT22	89
Tabuľka 24: Deriváty AA inhibujúce BuChE s hodnotou IC ₅₀ < 5 μ M	91

Zoznam skratiek

AD	Alzheimerova choroba
3,4-DHBA	3,4-dihydroxybenzaldehyd
AA	Amaryllidaceae alkaloidy
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
APP	amyloidový prekursorový proteín
A β	amyloid β
BCL2	anti-apoptózový proteín
BuChE	butyrylcholínesteráza
C4H	cinamát-4-hydroxyláza
CDK9	cyklín-dependentná kináza 9
CNS	centrálna nervová sústava
DOX	doxorubicín
ESI-HRMS	hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom s vysokým rozlíšením
GAL	galantamín
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom
GI ₅₀	koncentrácia potrebná pre 50% inhibíciu bunkovej proliferácie
GLI	onkogén asociovaný s gliómom
GSK-3 β	glykogénsyntáza kináza 3 β
HEB	hematoencefalická bariéra
Hh/GLI	Hedgehog signálna dráha
ChAT	cholínacetyltransferáza
Chk1	checkpoint kináza 1

IC ₅₀	stredná inhibičná koncentrácia
MAO-B	monoaminoxidáza B
N4OMT	norbelladín-4'- <i>O</i> -metyltransferáza
NBS	norbelladín-syntáza
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NR	noroxomaritidín-reduktáza
PAL	fenylalanín-amoniak-lyáza
PAMPA	paralelný test priepustnosti umelej membrány
pKa	záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty kyseliny
POP	prolyl-oligopeptidáza
PTCH	proteín Patched
SAR	vzťah medzi štruktúrou a aktivitou
SMO	transmembránový proteín Smoothened
TLC	tenkovrstvová chromatografia
TMS	tetrametylsilán
TNB ⁻	5-merkpto-2-nitrobenzoátový anión
TYDC	tyrozín-dekarboxyláza
UHPLC	ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia
VEGF-A	vaskulárny endoteliálny rastový faktor A
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
WST-1	(4-[2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)tetrazól-3-ium-5-yl]benzén-1,3-disulfonát sodný

1. ÚVOD

Snaha o udržanie alebo znovuzískanie zdravia nútila ľudstvo už od nepamäti hľadať prostriedky s liečivým účinkom. Ich zdroje a charakter sa postupne menili. Vývoj smeroval od empirického využívania prírodných surovín k liečivám, ktoré sú získané cieľavedomým racionálnym výberom molekúl s presne definovanou štruktúrou a účinkom¹. Biologicky aktívne molekuly môžu byť pripravené chemickou syntézou alebo izolované z prírodných zdrojov – rastlín, húb, mikroorganizmov, živočíchov a morských organizmov.

Hoci viaceré prírodné látky majú požadovaný farmakologický účinok, nedajú sa využiť v terapii. Často tomu bráni zlá rozpustnosť, nestabilita, nízka absorpcia alebo toxicita pre ľudský organizmus. Preto sa chemickou obmenou prírodných látok pripravujú ich deriváty. Takto vzniknuté liečivá sa označujú ako polosyntetické. Látky prírodného pôvodu sú modifikované za účelom optimalizácie fyzikálno-chemických a farmakokinetických vlastností ale tiež kvôli získaniu účinnejšej látky alebo dosiahnutiu špecifickejšieho účinku. Ďalším dôvodom prípravy polosyntetických liečiv je minimalizácia vedľajších účinkov a zvýšenie bezpečnosti^{1,2}. Medzi deriváty odvodené od rastlinných látok, ktoré našli uplatnenie v klinickej praxi patrí napríklad kyselina acetylsalicylová (analgetikum-antipyretikum), oxykodón (analgetikum-anodynum), empagliflozín (antidiabetikum), amiodarón (antiarytmikum), arteméter (antimalarikum) a ďalšie^{3,4,5}. Významné sú tiež deriváty vinca-alkaloidov vindesín, vinorelbín, vinflunín a taxanové deriváty docetaxel a kabazitaxel, ktoré sa používajú na liečbu rakoviny⁶.

Prírodné látky a najmä ich deriváty sú významným zdrojom nových liečiv. Podľa nedávno uverejnenej štúdie z 1394 nových liečiv, z kategórie tzv. malých molekúl, registrovaných od roku 1981 do roku 2019 bolo 6,1 % prírodných, 27,5 % polosyntetických a 35,2 % liečiv (pripravených synteticky) bolo inšpirovaných prírodnými látkami alebo obsahovali prírodný farmakofór⁷. Pre štruktúru prírodných molekúl je typická stereochemická rozmanitosť. Obsahujú početné chirálne centrá, menej atómov dusíka, síry a halogénov, viac atómov kyslíka a veľa funkčných skupín schopných vytvárať vodíkové väzby. Prírodné zlúčeniny sa tiež vyznačujú väčším výskytom kondenzovaných, premostených alebo spiránových cyklických systémov a rôznym stupňom nenasýtenosti molekúl. Tieto štrukturálne rysy ich odlišujú od produktov syntetickej a kombinatoriálnej chémie a robia z nich zaujímavé východiskové zlúčeniny^{3,6}.

Už od roku 1805, kedy Sertürner izoloval morfín, sú alkaloidy intenzívne skúmanou skupinou prírodných látok⁸. Sú to sekundárne metabolity vyskytujúce sa predovšetkým vo vyšších rastlinách. Obsahujú dusík, väčšinou viazaný v heterocyklickom kruhu. Vzhľadom k značnej rozmanitosti štruktúr majú veľmi rôznorodé a špecifické účinky na ľudský organizmus⁹. Vzťah medzi štruktúrou a aktivitou (SAR) je podrobne študovaný pri hľadaní nových liečiv.

Rastliny čeľade Amaryllidaceae (napr. *Narcissus*, *Galanthus*, *Leucojum*) produkujú unikátne a farmakologicky zaujímavé alkaloidy, ktoré sa v iných čeľadiach nevyskytujú. Doposiaľ bolo izolovaných už viac než 650 Amaryllidaceae alkaloidov (AA)¹⁰. Najhojnejšie zastúpené a najviac skúmané sú alkaloidy typu lykorínového, galantamínového, krinínového a haemantamínového. AA majú široké spektrum biologických aktivít. Bol u nich zistený antivírusový, antibakteriálny, antimykotický, antimalarický protizápalový aj antidepresívny účinok¹¹. Veľmi významná je ich protinádorová aktivita, keďže incidencia rakoviny na celom svete rýchlo rastie. V roku 2020 pribudlo 19,3 milióna nových prípadov rakoviny a očakáva sa, že v roku 2040 ich pribudne 28,4 milióna, čo je nárast o 47 %¹². Cytotoxickú aktivitu vykazujú napr. alkaloidy lykorín, narciklasín, pankratistatín a haemantamín a ich deriváty. Najznámejším zástupcom AA je galantamín. Ako reverzibilný inhibítor acetylcholinesterázy sa využíva v terapii miernej až stredne ťažkej Alzheimerovej choroby (AD)¹³, pri ktorej je zhoršenie kognitívnych funkcií spojené s poklesom hladiny acetylcholínu v mozgu. Inhibítory cholinesteráz spomaľujú odbúravanie acetylcholínu a tým oddávajú progresiu príznakov. Alzheimerova choroba je najčastejšou formou demencie a podľa WHO sa v súčasnosti radí do prvej desiatky príčin úmrtí na svete.

Skúmaním AA sa dlhodobo zaoberá výskumná skupina ADINACO na Katedre farmaceutickej botaniky a na Katedre farmakognózie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej. Jednou zo študovaných látok je aj alkaloid vittatín a jeho polosyntetické deriváty. Ukázalo sa, že niektoré deriváty vykazujú selektívnu inhibičnú aktivitu voči butyrylcholinesteráze (BuChE) pri mikromolárnej koncentrácii ($IC_{50} < 10 \mu M$), čo je potenciálne využiteľné v terapii AD¹⁴. Táto diplomová práca nadväzuje na doterajšie výsledky výskumu a na diplomovú prácu Mgr. Ivy Valachovej¹⁵ a jej náplňou je príprava ďalších derivátov alkaloidu vittatínu a následné stanovenie a zhodnotenie ich biologickej aktivity.

2. CIELE PRÁCE

Hlavné ciele tejto diplomovej práce boli:

- 1) Vypracovanie literárnej rešerše na tému prípravy derivátov alkaloidov čeľade Amaryllidaceae a ich biologickej aktivity.
- 2) Príprava aspoň desiatich derivátov Amaryllidaceae alkaloidu vittatínu.
- 3) Štruktúrna analýza pripravených zlúčenín.
- 4) Príprava derivátov pre skríning ich biologických aktivít.
- 5) Vyhodnotenie výsledkov a spísanie diplomovej práce.

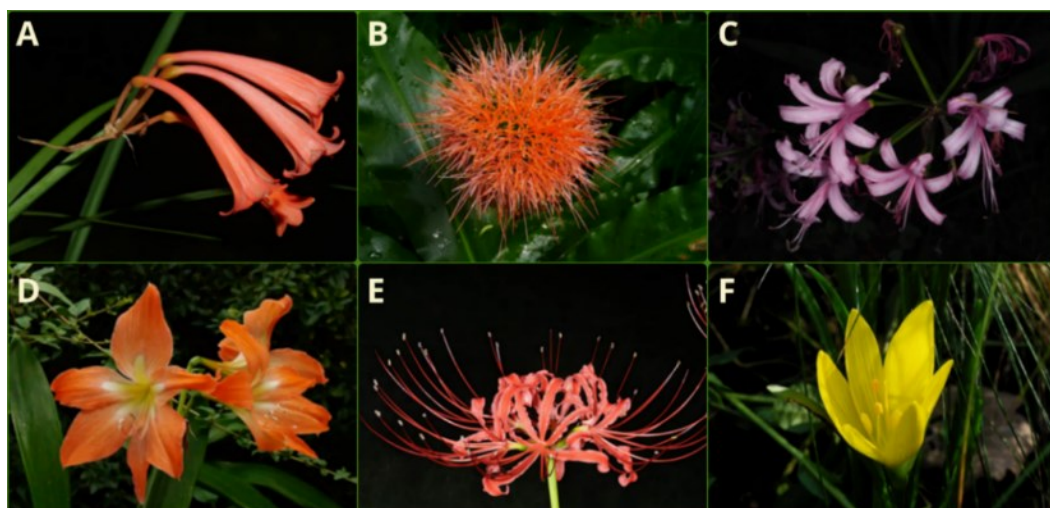
3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Čeľad' Amaryllidaceae

Rastliny čeľade Amaryllidaceae (amarylkovitě) sú krytosemenné jednoklíčnolistové rastliny patriace do radu Asparagales (asparágotvaré)^{16,17}. Čeľad' Amaryllidaceae zahŕňa približne 90 rodov a 1 700 – 1 800 druhov. Sú zaradené do troch podčeľadí - Agapanthoideae, Allioideae a Amaryllidoideae. Podčeľad' Amaryllidoideae pozostáva asi zo 75 rodov a z viac ako 900 druhov¹⁸.

3.1.1 Rastliny podčeľade Amaryllidoideae

Zástupcovia podčeľade Amaryllidoideae sú trváce byliny s podzemkami, hlúzami alebo cibulami. Listy majú celistvookrajové, čiarkovité, väčšinou pomerne mäsité, dvojradové a buď prízemné alebo byľové. Kvety sú trojpočetné obojpohlavné so spodným semenníkom. Majú nerozlíšené kvetné obaly (okvetie), ktoré sú usporiadané v 2 kruhoch a bývajú voľné alebo aj zrastené^{19,20}. Niekedy je prítomná pakorunka, často sfarbená odlišne ako okvetie, čo môžeme pozorovať u druhov rodu *Narcissus*²¹. Kvety sú usporiadané jednotlivo alebo v objemných okolíkovitých či skrutcovitých súkvetiach. Pre ich pestrofarebnosť a nápadný vzhľad (Obrázok 1) sa mnohé rastliny podčeľade Amaryllidoideae pestujú ako okrasné. Plodom je tobolka alebo bobuľa^{19,20}.



Obr. 1: Rastliny podčeľade Amaryllidoideae

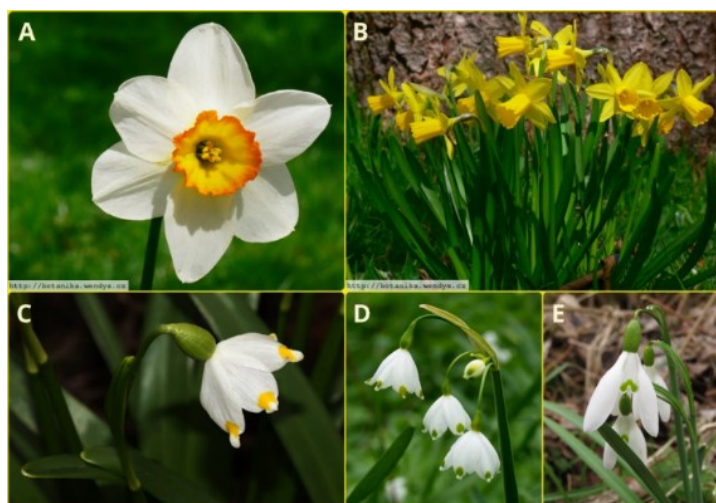
(A - *Cyrtanthus mackenii*²², B - *Scadoxus multiflorus* subsp. *Katherinae*²³, C - *Nerine bowdenii*²⁴, D - *Hippeastrum blossfeldiae*²⁵, E - *Lycoris radiata*²⁶, F - *Sternbergia lutea*²⁷)

Zástupcovia podčeláde Amaryllidoideae sa vyskytujú hlavne v tropických a subtropických oblastiach sveta, ale rastú aj na území s miernym podnebím (Obrázok 2). Najviac rozšírené sú v Južnej Amerike, v oblasti Stredozemného mora a v južnej Afrike. Typické africké rody sú *Amaryllis*, *Boophone*, *Brunsvigia*, *Clivia*, *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Haemanthus*, *Nerine* a *Scadoxus*. V Južnej Amerike môžeme nájsť najmä rody *Zephyranthes*, *Hippeastrum*, *Habranthus*, *Rhodophiala*, *Phaedranassa*, *Hymenocallis*, *Clinanthus* a ďalšie. Rastliny rodu *Leucojum*, *Galanthus*, *Narcissus*, *Lycoris*, *Pancratium* a *Sternbergia* rastú v strednej a južnej Európe a tiež v ázijských oblastiach^{28,29}.



Obr. 2: Výskyt rastlín z podčeláde Amaryllidoideae²⁰

V Českej republike sa voľne v prírode nachádzajú druhy *Narcissus poeticus* (narcis biely), *Narcissus pseudonarcissus* (narcis žltý), *Galanthus nivalis* (snežienka jarná), *Leucojum aestivum* (bleduľa letná) a *Leucojum vernum* (bleduľa jarná) (Obrázok 3). Posledné tri menované druhy sú zákonom chránené^{30,31,32}.



Obr. 3: Rastliny podčeláde Amaryllidoideae vyskytujúce sa v Českej republike (A - *Narcissus poeticus*³³, B - *Narcissus pseudonarcissus*³⁴, C - *Leucojum vernum*³⁵, D - *Leucojum aestivum*³⁶, E - *Galanthus nivalis*³⁷)

Okrem okrasnej funkcie majú rastliny podčeláde Amaryllidoideae veľký význam aj v tradičnom ľudovom liečiteľstve. Po stáročia sa používajú celé rastliny alebo ich časti spracované do rozličnej podoby (odvary, maceráty, zápary, obklady,...). Rozsiahle využitie je zdokumentované napríklad u druhov rodu *Crinum*. Používali sa na liečbu nádorov, bolesti, opuchov, poranení, hemoroidov, kašľa a tiež ako emetikum alebo jed³⁸. *Crinum macowanii* a *Gethyllis* spp. sa používali v južnej Afrike pri liečbe hypertenzie³⁹. *Boophone* spp., *Crinum* spp. a *Pancratium tenuifolium* údajne slúžili na vyvolanie halucinácií. *Crinum glaucum* a *Crinum jagus* boli v Nigérii používané pri strate pamäti a pri ďalších ochoreniach CNS spojených so starnutím⁴⁰. Rastlina *Boophone disticha* sa najviac využívala na liečenie ochorení CNS, poranení, infekcií a zápalov⁴¹. Viaceré druhy majú liečivé účinky proti rôznym infekčným ochoreniam⁴². Zistilo sa, že nositeľmi týchto rozmanitých liečivých účinkov sú najmä AA.

3.2 Amaryllidaceae alkaloidy

Rastliny zaradené do podčeláde Amaryllidoideae produkujú špecifické izochinolínové alkaloidy označované ako Amaryllidaceae alkaloidy. V roku 1877 sa z rastliny *Narcissus pseudonarcissus* podarilo izolovať prvého zástupcu tejto skupiny - lykorín⁴³. V súčasnosti je popísaných už viac ako 600 štruktúrne rozmanitých AA izolovaných z 350 rastlinných druhov. Do pozornosti sa dostali vďaka rôznorodým biologickým účinkom na ľudský organizmus a preto môžu byť cenným zdrojom nových liečiv. AA sú charakteristickým chemotaxonomickým znakom podčeláde Amaryllidoideae. Výnimočne boli tieto alkaloidy nájdené aj v iných čeladiach, ale väčšina z nich je jedinečná práve pre podčeláď Amaryllidoideae⁴⁴.

3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov

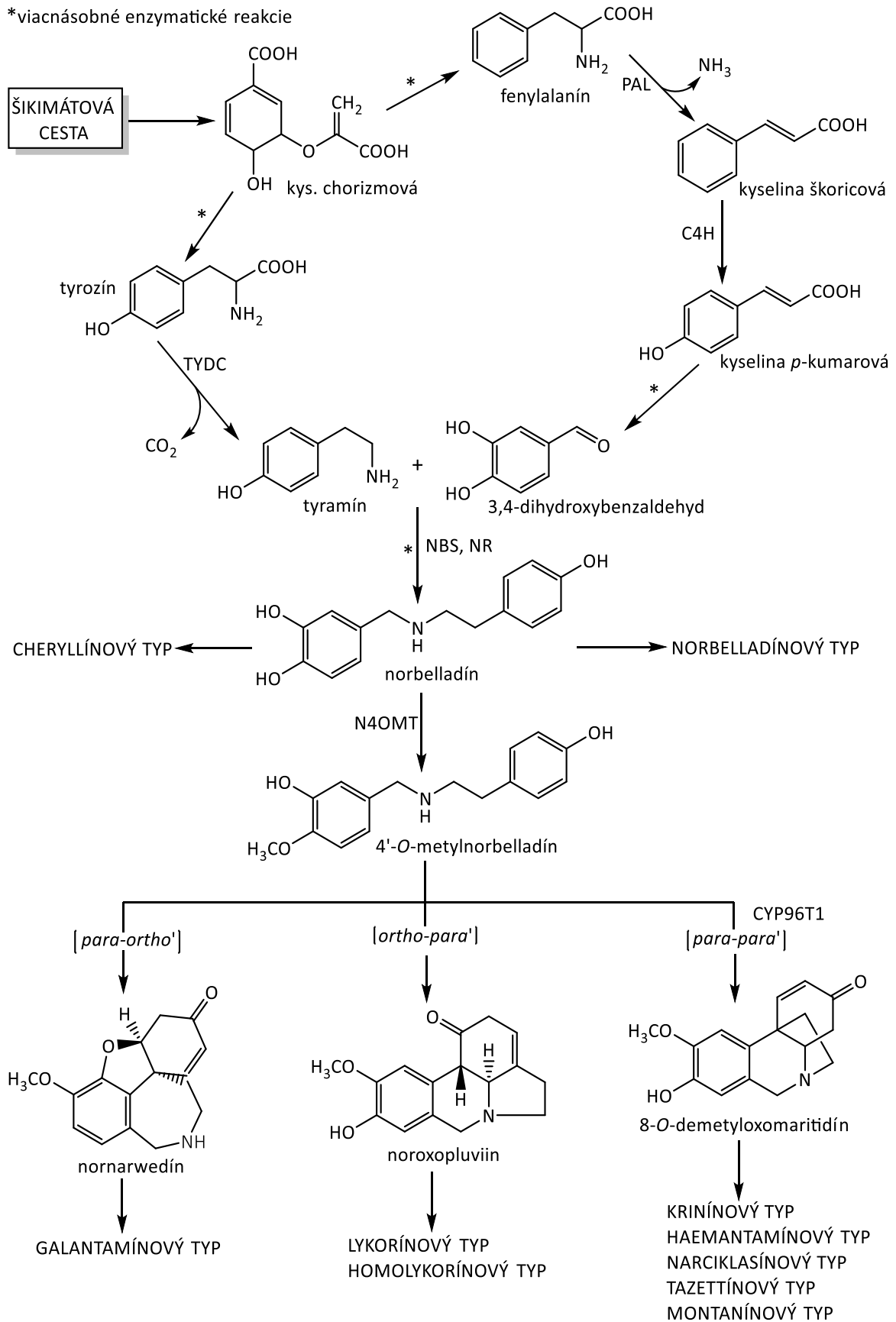
Základnými substrátmi pre syntézu AA sú aminokyseliny L-fenylalanín a L-tyrozín vytvorené primárnym metabolizmom rastlín (Obrázok 4). Tieto aromatické aminokyseliny sú syntetizované v plastidoch šikimátovou cestou. Produktom šikimátovej metabolickej dráhy je chorizmát, z ktorého niekoľkými enzymatickými reakciami vznikajú L-fenylalanín a L-tyrozín. Aminokyseliny sú z plastidov transportované do cytosólu, kde sú zapojené do sekundárneho metabolizmu⁴⁵ a vstupujú do biosyntézy AA označovanej ako norbelladínová cesta.

Najskôr dochádza k modifikácii aminokyselín. V tyramínovej dráhe je L-tyrozín dekarboxylovaný pomocou enzýmu tyrozín-dekarboxyláza (TYDC) a vzniká z neho tyramín. L-fenylalanín sa zapája do fenylpropanoidovej dráhy. Prvou reakciou je deaminácia fenylalanínu katalyzovaná fenylalanín-amoniak-lyázou (PAL), pri ktorej vzniká kyselina škoricová. Nasleduje hydroxylácia benzoového kruhu kyseliny škoricovej v polohe 4 za prítomnosti cinamát-4-hydroxylázy (C4H), čo vedie k tvorbe kyseliny *p*-kumarovej. Niekoľkými enzymatickými reakciami je kyselina *p*-kumarová premenená na kyselinu kávovú a skrátením uhlíkového reťazca ďalej na 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA)^{10,45}.

Kondenzáciou tyramínu a 3,4-DHBA vzniká norbelladín. Táto reakcia je katalyzovaná norbelladín-syntázou (NBS) a noroxomaritidín-reduktázou (NR)¹⁰. Vytvára sa imínový medziprodukt (Schiffova báza) a jeho redukcia vedie k tvorbe norbelladínu⁴⁶.

Norbelladín je prekursorom pre všetky Amaryllidaceae alkaloidy. Jednotlivé štruktúrne typy sú pomenované podľa hlavného reprezentanta skupiny. Priamo od norbelladínu sú odvodené alkaloidy cheryllínového a norbelladínového typu. Ďalším krokom v biosyntéze ostatných štruktúr je metylácia norbelladínu na 4'-O-metylnorbelladín za pomoci norbelladín-4'-O-metyltransferázy (N4OMT). Nasleduje intramolekulárne oxidatívne spojenie fenolových kruhov. Väzby C-C sa môžu vytvárať v polohách *orto* alebo *para* a cyklizácia 4'-O-metylnorbelladínu môže prebehnúť tromi spôsobmi. Spojením v polohe *para-orto'* vzniká nornarwedín a z neho galantamínový štruktúrny typ. Väzbou v polohe *orto-para'* vzniká noroxopluiin, prekursor pre lykorínový a homolykorínový typ. Vytvorenie väzby v *para-para'* polohe za účasti enzýmu cytochrómu P450 (CYP96T1) vedie k vzniku 8-O-demetyloxomaritidínu. Z 8-O-demetyloxomaritidínu sa postupne ďalej formujú alkaloidy krinínového, haemantamínového, narciklasínového, tazettínového a montanínového typu^{10,45}. Okrem spomenutých základných štruktúrnych typov existuje aj mnoho ďalších s menším zastúpením alkaloidov. Ich biosyntetické cesty popísali Jin a Yao v publikovanom článku⁴⁷.

*viacnásobné enzymatické reakcie

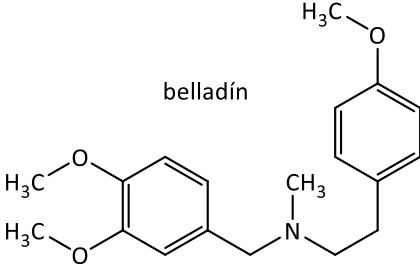
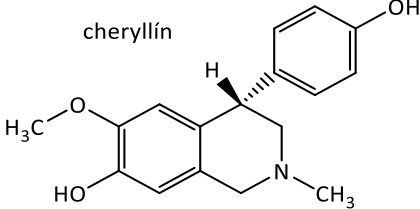
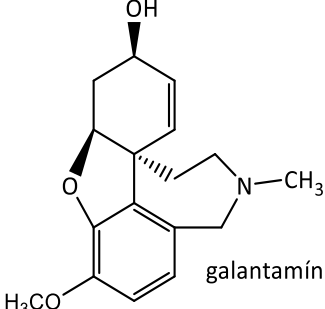


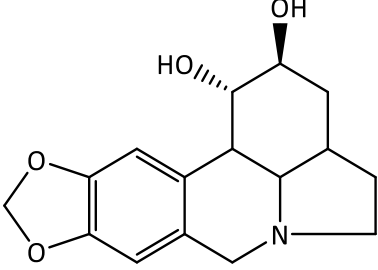
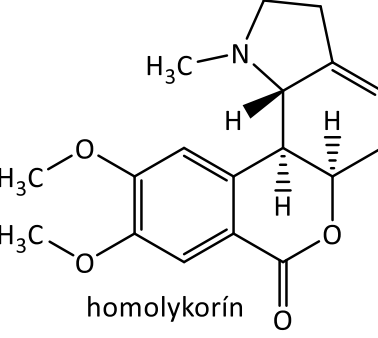
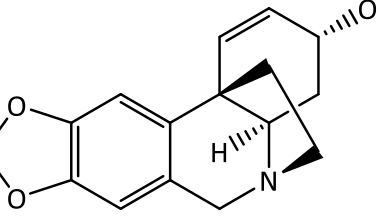
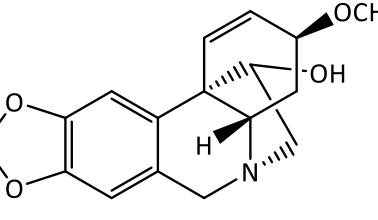
Obr. 4: Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov^{10,45}

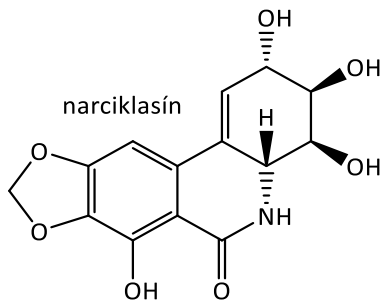
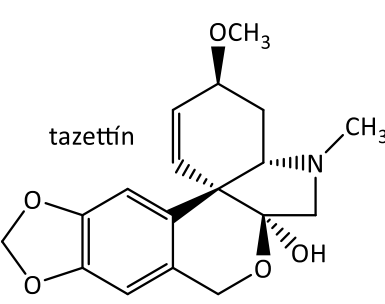
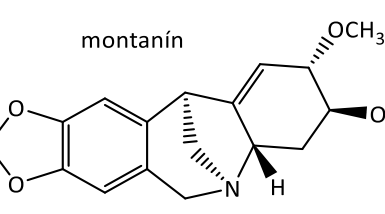
3.2.2 Štruktúrne typy Amaryllidaceae alkaloidov a ich výskyt

Prehľad základných štruktúrnych typov Amaryllidaceae alkaloidov je spracovaný v Tabuľke 1. Pri každom type je uvedený názov základného štruktúrneho skeletu, ktorý obsahujú alkaloidy, štruktúrny vzorec hlavného zástupcu a príklady ďalších alkaloidov zo skupiny. V poslednom stĺpci sú rastliny, z ktorých boli alkaloidy daného štruktúrneho typu izolované.

Tabuľka 1: Základné štruktúrne typy Amaryllidaceae alkaloidov^{10,11,48}

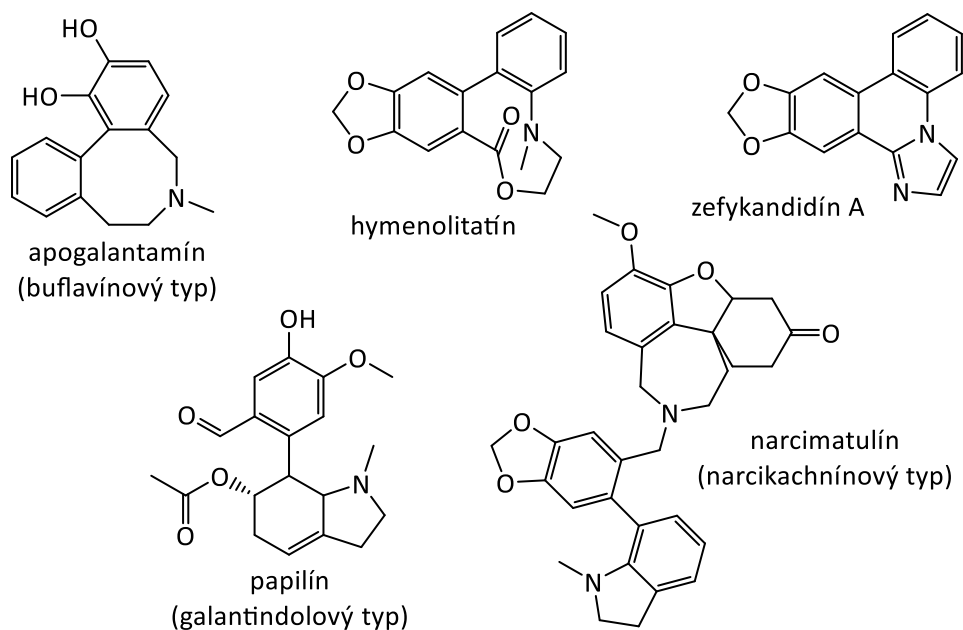
ŠTRUKTÚRNY TYP a základná chemická štruktúra	hlavný zástupca	príklady alkaloidov	rastlinný rod
NORBELLADÍNOVÝ N-(3,4- dihydroxybenzyl)-2-(4- hydroxyfenyl)etánamín	 <p>belladín</p>	belladín rystillín norbelladín kraugsodín karltonín A – C ⁴⁹	<i>Lycoris</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Nerine</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
CHERYLLÍNOVÝ tetrahydroizochinolín	 <p>cheryllín</p>	cheryllín gigantellín gigantellinín	<i>Crinum</i>
GALANTAMÍNOVÝ 6H-benzofuro[3a,3,2- e,f]-2-benzazepín	 <p>galantamín</p>	galantamín sanguinín chlidantín lykoramín narwedín	<i>Narcissus</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Pancreatum</i> <i>Crinum</i> <i>Lycoris</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Phaedranassa</i> <i>Galanthus</i>

<p>LYKORÍNOVÝ pyrolo[<i>d,e</i>]fenantridín</p>	 <p>lykorín</p>	<p>hippamín pseudolykorín pluviín 1-<i>O</i>-acetyllykorín galantín assoanín</p>	<p><i>Narcissus</i> <i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i>, <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Sternbergia</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Pancreatium</i> <i>Habranthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Eucharis</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Amaryllis</i> <i>Phaedranassa</i></p>
<p>HOMOLYKORÍNOVÝ 2-benzopyrano-[3,4-<i>g</i>]indol</p>	 <p>homolykorín</p>	<p>hippeastrín masonín odulín lykorenín hostasín</p>	<p><i>Galanthus</i> <i>Clivia</i> <i>Narcissus</i> <i>Lycoris</i> <i>Haemanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Crinum</i> <i>Pancreatium</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Hosta</i></p>
<p>KRINÍNOVÝ β-5,10<i>b</i>- etanofenantridín</p>	 <p>krinín</p>	<p>krinín bufanisín bufanidrín ambellín distichamín undulatín powellín</p>	<p><i>Crinum</i> <i>Boophone</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Nerine</i> <i>Lycoris</i> <i>Ammocharis</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Hippeastrum</i></p>
<p>HAEMANTAMÍNNOVÝ α-5,10<i>b</i>- etanofenantridín</p>	 <p>haemantamín</p>	<p>haemantamín haemantidín vittatín 11-hydroxyvittatín <i>epi</i>-vittatín krinamín hamayn maritidín phaedranamín bulbispermín</p>	<p><i>Crinum</i> <i>Boophone</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Lycoris</i> <i>Ammocharis</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Narcissus</i> <i>Clivia</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Pancreatium</i> <i>Galanthus</i> <i>Phaedranassa</i> <i>Eucharis</i></p>

<p>NARCIKLASÍNOVÝ fenantridín</p>	 <p>narciklasín</p>	<p>pankratistatín narciklasín narciprimín</p>	<p><i>Brachystola</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Lycoris</i> <i>Zephyranthes</i> <i>Habranthus</i> <i>Polytela</i> <i>Lycoris</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i></p>
<p>TAZETTÍNOVÝ 2-benzopyrano [3,4- c]indol</p>	 <p>tazettín</p>	<p>jonquailín tazettín kriwellín pretazettín 3-epimakronín</p>	<p><i>Galanthus</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Crinum</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Pancreatum</i> <i>Narcissus</i> <i>Eucharis</i> <i>Lycoris</i> <i>Habranthus</i></p>
<p>MONTANÍNOVÝ 5,11- metanomorfantridín</p>	 <p>montanín</p>	<p>montanín mantín pankracín kokcinín nangustín</p>	<p><i>Lycoris</i> <i>Haemanthus</i> <i>Pancreatum</i> <i>Narcissus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i></p>

Ostatné štruktúrne typy AA sa v rastlinách vyskytujú zriedkavejšie. Patrí medzi ne gracilínový, augustamínový, kripowellínový, galasínový typ a ďalšie. Prehľadný zoznam všetkých doposiaľ popísaných typov AA a ich rastlinných zdrojov je uvedený v doktorskej dizertačnej práci PharmDr. Marcely Šafratovej, Ph.D.⁵⁰. Mnohé z minoritných skupín majú zaujímavú štruktúru (Obrázok 5). Alkaloidy buflavínového typu (buflavín, apogalantamín) nesú jedinečný štruktúrny skelet – 5,6,7,8-tetrahydrodibenz[*c,e*]azocín, v ktorom je zapojený 8-členný heterocyklický kruh obsahujúci dusík⁵¹. Alkaloid hymenolitatin z rastliny *Hymenocallis littoralis* má 9-členný heterocyklický kruh a z hľadiska biosyntetickej dráhy je to alkaloid 10*b*,12-seko-tazettínového typu. Galantindolový typ (galantindol, lykosinín B) obsahuje nekondenzovaný indolový kruh. Nové galantindolové alkaloidy papilín a 9-*O*-demetylykosinín B boli izolované s druhov rodu *Hippeastrum*. V Amaryllidaceae rastlinách sa vyskytujú aj alkaloidy, ktoré majú vo svojej štruktúre viazané 2 dusíky. Zaraďujú sa do gracilamínového, plikamínového a 11,12-seko-plikamínového typu. Zefykandidín A je zástupcom ďalšej skupiny

2-dusíkatých AA. Jeho základnou štruktúrou je imidazo[1,2-f]fenantridín⁴⁷. Zaujímavé sú tiež alkaloidy tvorené kombináciou rôznych štruktúrnych typov. Heterodimérne alkaloidy zložené zo skeletu galantamínového a galantindolového typu sú zástupcami nedávno popísaného narcikachnínového štruktúrneho typu. Patrí sem narcimatulín, izolovaný z rastliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Duch Master⁵², narcipavlín a narcikachnín získané z rastliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol⁵³, narcieliin zo *Zephyranthes citrina*⁵⁴ a tiež narciabduiliin z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton⁵⁵.



Obr. 5: Amaryllidaceae alkaloidy minoritných štruktúrnych typov

3.2.3 Biologická aktivita haemantamínových alkaloidov

Alkaloidy haemantamínového štruktúrneho typu sú spolu s krinínovými a lykorínovými najrozšírenejšou skupinou alkaloidov v rastlinách podčelade Amaryllidoidae. Od krinínového typu sa odlišujú α -orientáciou etylénového mostíka v štruktúre 5,10b-etanofenantridínu kvôli čomu sú pomenované aj ako α -krinanové alkaloidy. Farmakologicky zaujímavé sú pre rôzne biologické účinky. Najvýznamnejšia a najviac preskúmaná je ich protinádorová aktivita. Miernu inhibičnú aktivitu vykazujú voči cholinesterázam a glykogénsyntáze kináze 3β (GSK- 3β). Niektoré alkaloidy majú antibakteriálne, antimykotické, antivírusové či antiprotozoálne účinky. Táto kapitola je venovaná biologickej aktivite najznámejších zástupcov haemantamínových alkaloidov. Aktivita vittatínu je rozobraná v samostatnej kapitole.

3.2.3.1 Protinádorová aktivita

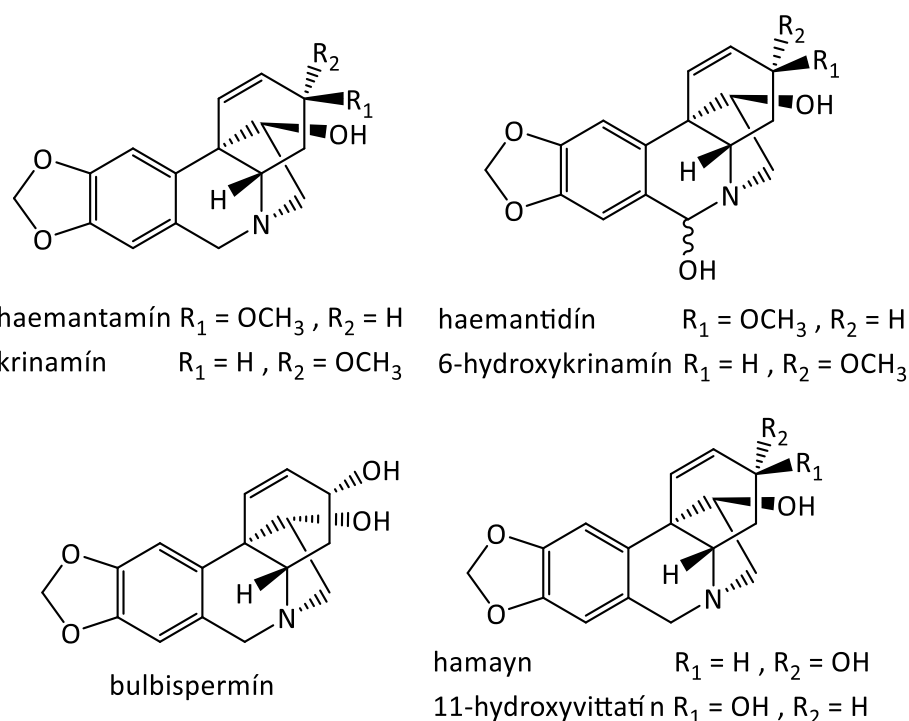
Rakovina patrí medzi závažné civilizačné ochorenia dnešnej doby. Existuje viac ako sto rôznych typov nádorov, ktorých podtypy sa môžu nachádzať v rôznych orgánoch. Rakovina prsníka sa dostala na prvé miesto ako najčastejšie diagnostikovaný typ nádoru. V poradí nasleduje rakovina pľúc, kolorektálny karcinóm, rakovina prostaty a žalúdka. Hlavnou príčinou úmrtí na nádorové ochorenia je rakovina pľúc¹².

Nádory sú charakteristické abnormálnym nekontrolovateľným bunkovým delením v dôsledku narušenia bunkového cyklu a zlyhania kontrolných mechanizmov delenia. Príčinou sú rôzne nepriaznivé zmeny na bunkovej, genetickej a epigenetickej úrovni. Poškodené alebo zmutované bunky, ktoré by za normálnych podmienok boli eliminované, pokračujú v bunkovom cykle, delia sa, čím sa akumulujú anomálie v nasledujúcich generáciách a zdravé bunky sa menia na nádorové. Výsledkom je ich zvýšený replikačný potenciál, necitlivosť voči signálom inhibujúcim rast, rezistencia k apoptóze a schopnosť metastázovať⁵⁶.

Súčasná protinádorová liečivá rôznymi mechanizmami ovplyvňujú bunkový cyklus. Väčšina z nich je však málo selektívna a preto pomerne toxická pre organizmus. Cytostatiká poškodzujú aj rýchlo sa deliace zdravé bunky tela, ako sú napríklad bunky epitelu a kostnej drene a spôsobujú veľa nežiadúcich účinkov⁵⁷. Keďže výskyt nádorových ochorení v populácii má stúpajúcu tendenciu, rastie aj dopyt po nových účinnejších bezpečnejších a menej toxických liečivách na rakovinu. Významným zdrojom potenciálnych liečiv sú alkaloidy rastlín čeľade Amaryllidaceae s protinádorovou aktivitou. Ich veľkou výhodou je vysoká selektivita voči nádorovým bunkám a relatívne nízka toxicita pre zdravé bunky⁵⁸. Výraznými protinádorovými účinkami sa vyznačujú okrem lykorínových, narciklasínových a krinínových aj haemantamínové alkaloidy.

Medzi najúčinnejšie cytotoxické haemantamínové alkaloidy patria haemantamín a haemantidín (Obrázok 6). Hlavný zástupca, haemantamín, vykazuje silnú antiproliferatívnu a cytotoxickú aktivitu proti širokému spektru nádorových bunkových línií rôznych histotypov. Alkaloid haemantidín sa líši od haemantamínu iba prítomnosťou ďalšej hydroxylovej skupiny na uhlíku C-6 orientovanej do polohy α alebo β . Väčšinou je z rastlín izolovaný ako zmes oboch epimérov. Pôsobí tiež na viacero rôznych nádorových bunkových línií. Prehľad doposiaľ testovanej *in vitro* antiproliferatívnej aktivity

haemantamínu a haemantidínu voči rôznym bunkovým líniam je spracovaný v článku Cahlíková L. et al. (2020)⁵⁹. Pri testovaní cytotoxicity na dvoch bunkových líniah rakoviny gastrointestinálneho traktu s mutáciou proteínu p53 a jednej zdravej bunkovej línii bola preukázaná významná selektivita haemantamínu. Cytotoxicita proti línii buniek zdravého tenkého čreva (FHs 74 Int, $IC_{50} = 19,5 \pm 8,9 \mu\text{M}$) bola až 20-krát nižšia ako proti bunkám kolorektálneho adenokarcinómu podobným epitelu (Caco-2, $IC_{50} = 0,99 \pm 0,14 \mu\text{M}$) a epitelovým bunkám kolorektálneho adenokarcinómu (HT-29, $IC_{50} = 0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Ako štandard bol pri testovaní použitý vinorelbín (FHs 74 Int: $IC_{50} = 4,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$; Caco-2: $IC_{50} = 0,03 \pm 0,00 \mu\text{M}$; HT-29: $IC_{50} = \text{netestované}$)⁶⁰.



Obr. 6: Haemantamínové alkaloidy s protinádorovou aktivitou

Mechanizmus účinku haemantamínu ešte nie je úplne objasnený. Zatiaľ bolo zistené, že sa môže viazať na peptidyltransferázu 60S podjednotky eukaryotického ribozómu a tým inhibovať syntézu bielkovín. Pravdepodobne špecificky inhibuje biogénu ribozómov a spúšťa stresovú reakciu, čo vedie k stabilizácii tumor supresorového proteínu p53 v rakovinových bunkách, vďaka ktorému sa spúšťa apoptóza⁶¹. V ďalšej štúdií haemantamín aj haemantidín v závislosti na dávke (5 – 20 μM) indukovali apoptózu u línii p53-negatívnych ľudských leukemických buniek Jurkat.

Alkaloidy zvýšili aktivitu kaspáz 3, 7, 8 a 9, znížili životaschopnosť buniek a potenciál mitochondriálnej membrány. Zastavili bunkový cyklus pravdepodobne v dôsledku aktivácie regulačných proteínov bunkového cyklu, ako je inhibítor cyklín-dependentných kináz p16^{INK4a} v kontrolnom bode G1/S a Ser345-fosforylovaná Chk1 v kontrolnom bode G2/M. Haemantidín vykázal lepšiu pro-apoptotickú účinok ako haemantamín voči Jurkat bunkám. Táto štúdia naznačuje aktiváciu apoptózy cestou, ktorá nie je závislá na proteíne p53⁶². Haemantamín zvyšuje aktivitu kaspáz 3 a 7 aj v bunkách rakoviny vaječníkov (A2780) a znižuje ich proliferáciu, hoci inhibítor bunkového cyklu p21^{Cip1/Waf1} nebol pôsobením haemantamínu aktivovaný⁶³.

Protinádorovou aktivitou sa vyznačuje aj alkaloid krinamín (Obrázok 6). Vykazuje silnú cytotoxicitu proti viacerým nádorovým bunkovým líniam s hodnotami IC₅₀ v rozmedzí 2 – 22,9 μM, napríklad proti bunkám rakoviny pľúc (LUC-1), orálneho epidermoidného karcinómu (KB a KB-V1), karcinómu kože (A-431), kolorektálneho karcinómu (COL-1), rakoviny prsníka (BCA-1 a ZR-75-1), glioblastómu (U-373) a melanómu (MEL-2)⁶⁴. Voči bunkám cervikálneho adenokarcinómu (HeLa) bol krinamín (IC₅₀ = 5,8 ± 0,4 μM) aktívnejší ako haemantamín (IC₅₀ = 8,3 ± 0,4 μM) a haemantidín (IC₅₀ = 13,9 ± 2,0 μM). Ako štandard bol v teste cytotoxicity použitý staurosporín (IC₅₀ = 0,175 ± 0,007 μM)⁶⁵. Štúdia z roku 2007 ukázala, že krinamín, rovnako ako haemantamín, má schopnosť selektívne vyvolať apoptózu u nádorových buniek potkanieho hepatocelulárneho karcinómu (5123tc) a zároveň nepôsobí cytotoxicky na líniu ľudských embryonálnych buniek obličiek (HEK-293t) v rovnakých koncentráciách. Na základe tejto štúdie bola stanovená účinná dávka k indukcii apoptózy u 50 % nádorových buniek na 12,5 μM pre krinamín a 15 μM pre haemantamín⁶⁶.

Mechanizmus protinádorového účinku krinamínu je podrobnejšie skúmaný v štúdiu Khumkhong P. et al. (2019)⁶⁷. Krinamín bol významne cytotoxickjší pre bunkovú líniu HPV-pozitívneho karcinómu krčka maternice SiHa (IC₅₀ = 23,52 μM) a HPV-negatívneho karcinómu krčka maternice C33a (IC₅₀ = 60,89 μM) ako pre líniu primárnych fibroblastov HDFa (IC₅₀ > 100 μM), ektocervikálnu epiteliálnu bunkovú líniu Ect1/E6E7 (IC₅₀ > 100 μM) a keratinocyty HaCaT (IC₅₀ = 85,45 μM). Hodnota indexu selektivity (SI > 2) vyjadreného ako pomer hodnôt IC₅₀ normálnych a nádorových buniek dokazuje, že krinamín je selektívne toxický proti bunkám rakoviny krčka maternice. Krinamín inhiboval rast sféroidných modelov rakoviny krčka maternice efektívnejšie v porovnaní

s chemoterapeutikami karboplatinou, 5-fluóruracilom alebo inhibítorom CDK9 FIT-039, a to v bunkách SiHa aj C33a. Okrem toho, na rozdiel od cisplatiny, indukoval apoptózu bez navodenia dvojlákových zlomov DNA. Potlačil tiež migráciu buniek rakoviny krčka maternice a vykázal antiangiogénne účinky inhibíciou sekrécie proteínu VEGF-A v bunkách rakoviny krčka maternice a pri vývoji krvných ciev v embryách zebričiek. Analýza génovej expresie odhalila, že mechanizmus účinku krinamínu možno čiastočne pripísať downregulácii génov súvisiacich s rakovinou⁶⁷.

Prírodný derivát krinamínu, alkaloid 6-hydroxykrinamín (Obrázok 6), má taktiež protinádorové účinky. Zmes epimérov 6 α -hydroxykrinamínu a 6 β -hydroxykrinamínu v pomere 3:1 znížila životaschopnosť buniek ľudského neuroblastómu (SH-SY5Y) v závislosti na dávke⁶⁸. Antiproliferatívna aktivita 6-hydroxykrinamínu bola preukázaná aj proti bunkovej línii epiteliálneho karcinómu vaječníkov (A2780) a akútnej myeloidnej leukémie (MV4-11). Spôsobil zastavenie bunkového cyklu v bunkách A2780 bez indukcie apoptózy⁶⁹. V štúdií Arai M. A. et al. (2015)⁷⁰ vykazovali 6-hydroxykrinamín a krinamín cytotoxicitu proti bunkovým líniam rakoviny pankreasu (PANC1) a prostaty (DU145), v ktorých je abnormálne aktivovaná Hedgehog (Hh/GLI) signálna dráha. Táto dráha je dôležitá pri embryonálnom vývoji a udržiavaní dospelých tkanív avšak súvisí aj s vývojom niektorých nádorov. Signalizácia Hh/GLI dráhy cez transmembránový proteín Smoothened (SMO) vedie k aktivácii transkripčných faktorov onkogénu spojeného s gliómom (GLI) a k indukcii cieľových génov Hedgehog. Mnohé z týchto génov sú zapojené do proliferácie, prežitia a diferenciácie. Na SMO sa viaže proteín Patched (PTCH), inhibuje ho a bráni tak aktivácii následnej signálnej kaskády. U niektorých typov ľudských nádorov je Hh/GLI signalizácia neustále aktivovaná z dôvodu mutácií v PTCH alebo SMO, čo vedie k tvorbe a progresii nádorov. Medzi inhibítory Hh/GLI dráhy patrí napríklad registrované liečivo vismodegib⁷¹. Alkaloidy 6-hydroxykrinamín a krinamín potlačili GLI sprostredkovanú expresiu tumor supresora PTCH a anti-apoptózového proteínu BCL2 v rakovinových bunkách DU145. Mechanizmus protinádorovej aktivity týchto alkaloidov voči DU145 a PANC1 bunkám môže byť spojený s inhibíciou Hh/GLI signálnej dráhy⁷⁰.

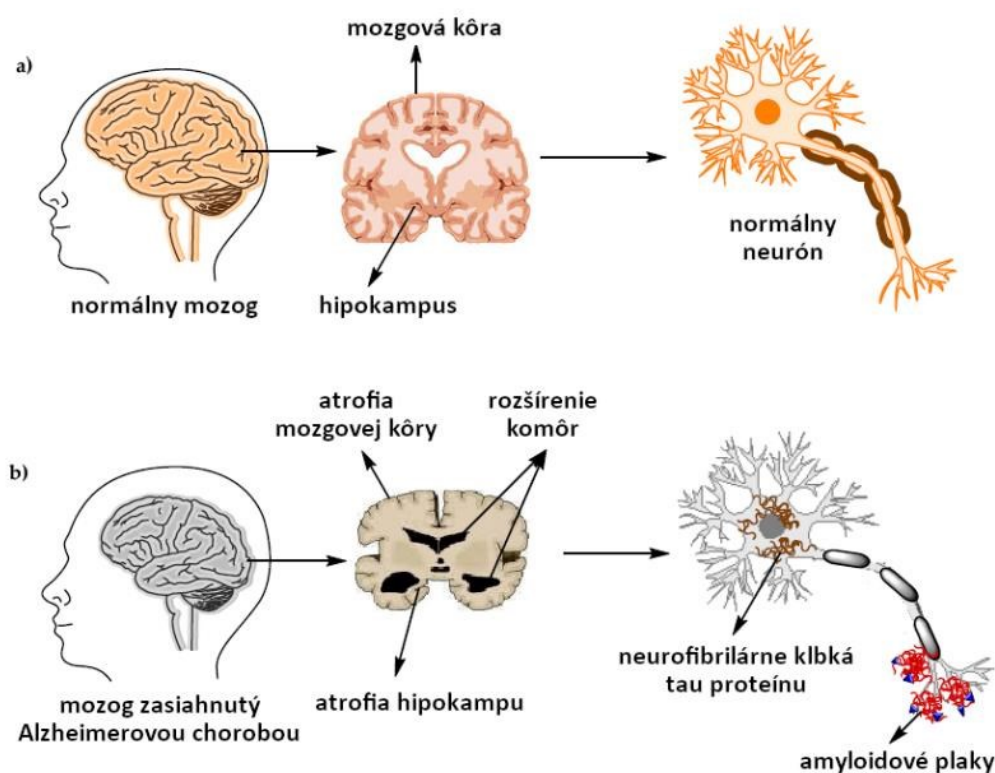
Cytotoxické účinky proti určitým nádorovým líniam preukázali aj ďalšie haemantamínové alkaloidy ako napríklad bulbispermín¹³ a jeho prírodné deriváty⁷³, hamayn^{74,75} a 11-hydroxyvittatín⁷⁶. Protinádorová aktivita α -krinanových alkaloidov je zhrnutá v tabuľke v článku Nair J. J. et al. (2012)⁷⁷.

3.2.3.2 Biologická aktivita súvisiaca s Alzheimerovou chorobou

Podľa WHO na celom svete trpí demenciou asi 50 miliónov ľudí a predpokladá sa, že v roku 2050 bude celkový počet ľudí s demenciou 152 miliónov. Alzheimerova choroba je diagnostikovaná u 60 – 70 % prípadov demencie.

Je to pomaly progredujúce neurodegeneratívne ochorenie. Prvým príznakom je zhoršenie kognitívnych funkcií, najmä krátkodobej pamäti. Pridružujú sa rečové problémy, zmeny správania, výkyvy nálady a časopriestorová dezorientácia. Pacient prestáva byť samostatný, nezvláda vykonávať bežné činnosti. V štádiu ťažkej demencie je dezorientovaný, nespoznáva svoj byt, blízke osoby ani sám seba a jeho schopnosť komunikovať je obmedzená. Ostáva na lôžku odkázaný na ošetrovateľskú starostlivosť. Priemerné trvanie ochorenia od diagnostiky je 6 – 12 rokov⁷⁸.

Úplná etiopatogenéza AD zatiaľ nie je známa, považuje sa za multifaktoriálne ochorenie, ktoré ovplyvňuje niekoľko rizikových faktorov ako je vyšší vek, genetické predispozície, poranenia hlavy, infekcie a životné prostredie. Pri AD nastávajú v mozgu neuropatologické zmeny. Je možné pozorovať lézie, ktoré vznikajú akumuláciou neurofibrilárnych klobiek a amyloidových plakov a lézie charakteristické atrofiou, úbytkom neurónov a rozšírením mozgových komôr⁷⁹ (Obrázok 7).



Obr. 7: Štruktúra mozgu a neurónov vo fyziologickom stave (a) a pri AD (b)⁷⁹

Podľa amyloidovej teórie je podstatou patogenézy extracelulárne ukladanie amyloidu β ($A\beta$) v mozgovom tkanive. $A\beta$ je malý fragment, ktorý vzniká pri štiepení transmembránového amyloidového prekurzorového proteínu (APP) prostredníctvom proteolytických enzýmov – sekretáz. β -sekretáza štiepi APP na N-konci a γ -sekretáza na C-konci. Vzniknutý $A\beta$ fragment je peptid zložený zo 40 až 42 aminokyselín⁸⁰. $A\beta_{42}$ je vysoko náchylný na agregáciu. Zvýšená produkcia $A\beta$, zvýšený pomer $A\beta_{42} : A\beta_{40}$, zhlukovanie $A\beta$ a jeho znížený klírens vedie k tvorbe amyloidových plakov, ktoré spôsobujú sterilný zápal, aktiváciu mikroglíí, uvoľňovanie cytokínov a astrocytózu. Tieto reakcie majú za následok poškodenie a odumieranie neurónov⁸¹.

Neurofibrilárne kľbká tvorené abnormálnym tau-proteínom sú tiež typické pri AD. Tau-proteín je za normálnych podmienok prítomný hlavne v axónoch a podieľa sa na stabilizácii mikrotubulov. Pri AD dochádza k patologickým posttranslačným úpravám tohto proteínu. Najdôležitejšou modifikáciou je hyperfosforylácia, do ktorej sú zapojené viaceré enzýmy. Medzi nimi je aj glykogénsyntáza kináza-3 β (GSK-3 β). Hyperfosforylácia spôsobuje stratu afinity k mikrotubulom a zvýšenie cytoplazmatickej hladiny tau-proteínu. Premiestnenie tau-proteínu do somatodendritickej časti neurónu, následná agregácia a vytvorenie neurofibrilárnych kľbiek narúšajú synaptický prenos⁸².

Vzhľadom na zásadnú úlohu neurotransmiteru acetylcholínu (ACh) v kognitívnych funkciách bola navrhnutá cholinergná teória. ACh je v mozgu zapojený do procesov ako sú pamäť, pozornosť, zmyslové vnímanie a učenie. Jeho deficit prispieva ku kognitívnym poruchám, poklesu pozornosti, ovplyvňuje schopnosť koncentrácie a rýchlosť spracovania informácií, podieľa sa tiež na zmenách správania. Syntéza ACh prebieha v nervových zakončeníach cholinergných neurónov z acetylkoenzýmu A a cholínu za pomoci enzýmu cholínacetyltransferázy (ChAT). Následne sa ACh uvoľňuje do synaptickej štrbiny kde pôsobí na receptory. Účinok ACh ukončujú enzymatickou hydrolýzou cholínesterázy acetylcholínesteráza (AChE) a butyrylcholínesteráza (BuChE). V normálnom mozgu je AChE hlavným enzýmom zodpovedným za hydrolýzu ACh a BuChE má iba podpornú funkciu. Zistilo sa však, že BuChE je v mozgu rozšírenejšia než sa pôvodne predpokladalo.⁸³ Degenerácia cholinergných neurónov pri AD spôsobuje narušenie cholinergného prenosu, nastáva pokles množstva ACh a deficit ChAT. Ubúda aj AChE, ale naopak s rozvojom AD sa v mozgu zvyšuje hladina BuChE až o 30 – 60 %⁸³. Enzým BuChE

teda kompenzuje nedostatok AChE a preberá funkciu hydrolýzy ACh. Predpokladá sa, že BuChE prispieva aj k dozrievaniu amyloidových plakov⁸⁴.

Ďalšia teória patofyziológie AD sa zaoberá hyperexcitáciou v dôsledku nadmernej aktivácie NMDA receptorov excitačným neuromediátorom glutamátom, čo vedie k excitotoxicite neurónových buniek a spôsobuje neurodegeneráciu a bunkovú smrť. Oxidačný stres pravdepodobne tiež významne ovplyvňuje neurodegeneráciu, keďže neuróny sú oveľa náchylnejšie na poškodenie voľnými radikálmi ako ostatné bunky⁸¹.

V súvislosti s AD sa spomína aj enzým prolyl-oligopeptidáza (POP). Nachádza sa vo všetkých orgánoch tela vrátane mozgu a zapája sa do fyziologických procesov ako sú učenie a pamäť, bunkové delenie a diferenciácia, signálna transdukcia, ale aj do patofyziológie niektorých psychiatrických porúch. Experimentálne boli zistené neuroprotektívne a nootropické účinky inhibítorov POP⁸⁵.

Zatiaľ neexistuje liečba, ktorá by vyliečila, zastavila alebo zvrátila priebeh AD. Látky využívané v terapii môžu iba spomaliť jej priebeh a zmierniť symptómy. Registrovanými liečivami na miernu až stredne ťažkú formu Alzheimerovej demencie sú inhibítory acetylcholinesterázy (AChEI) donepezil, rivastigmín a Amaryllidaceae alkaloid galantamín. Používa sa tiež nekompetitívny antagonista NMDA receptorov memantín⁸⁶. Výskum nových liečiv na AD sa okrem iného zameriava na inhibíciu AChE a BuChE, inhibíciu syntézy A β , inhibíciu β - a γ -sekretázy, zníženie agregácie A β a zvýšenie jeho klirensu, inhibíciu GSK-3 β a monoaminoxidázy B (MAO-B)⁸¹.

Haemantamínové alkaloidy boli vo viacerých štúdiách testované na inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam. V štúdiu Kulhánková A. et al. (2013)⁸⁷ bola skúmaná inhibičná aktivita voči ľudskej acetylcholinesteráze (HuAChE) a ľudskej butyrylcholinesteráze (HuBuChE) u alkaloidov izolovaných z rastliny *Zephyranthes robusta* Baker (Tabuľka 2). U väčšiny alkaloidov haemantamínového typu boli stanovené hodnoty IC₅₀ proti HuAChE veľmi vysoké, čiže tieto látky neinhibovali enzým. Výnimkou bol alkaloid 8-O-demetylmaritidín, ktorý bol v porovnaní so štandardami proti HuAChE pomerne aktívny. Proti HuBuChE boli všetky alkaloidy neaktívne. V štúdiu bola skúmaná aj antioxidantná aktivita izolovaných alkaloidov, u všetkých však s negatívnym výsledkom⁸⁷.

Tabuľka 2: Haemantamínové alkaloidy izolované z druhu *Z. robusta* a ich inhibičná aktivita proti ľudským cholinesterázam⁸⁷

alkaloid	IC ₅₀ [μM] ^a	
	HuAChE	HuBuChE
haemantamín	>500	>500
vittatín	>500	>500
11-hydroxyvittatín	>500	>500
haemantidín	>500	>500
hamayn	>500	>500
8- <i>O</i> -demetylmartidín	28,000 ± 0,900	>500
huperzín A ^s	0,033 ± 0,001	>500
eserín ^s	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004
galantamín ^s	1,710 ± 0,065	42,300 ± 1,300

^a vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka; *n*=3; ^s štandard

Ortiz J. et al. (2018)⁸⁸ testovali AChE a BuChE inhibičný potenciál alkaloidov izolovaných z piatich druhov rodu *Hieronymiella* rastúcich v Argentíne. Medzi nimi boli aj 4 alkaloidy haemantamínového typu (haemantamín, krinamín, 11-hydroxyvittatín, hamayn). Pri testovaní bola použitá AChE získaná z elektrického úhora *Electrophorus electricus*, BuChE z konského séra a galantamín ako štandard. Alkaloidy s hodnotami IC₅₀ vyššími ako 200 μM boli považované za neaktívne, čiže žiadny z alkaloidov nepreukázal inhibičnú aktivitu voči cholinesterázam (Tabuľka 3). Tieto výsledky potvrdzujú zistenia z predchádzajúcej štúdie Kulhánková A. et al. (2013), hoci boli pri testoch použité cholinesterázy rozdielneho pôvodu⁸⁸. Je možné konštatovať, že väčšina skúmaných haemantamínových alkaloidov nie je schopná inhibovať cholinesterázy.

Tabuľka 3: AChE a BuChE inhibičná aktivita haemantamínových alkaloidov izolovaných z druhov rastliny *Hieronymiella*⁸⁸

alkaloid	IC ₅₀ [μM] ^a	
	eeAChE	eqBuChE
haemantamín	>200	>200
krinamín	>200	>200
11-hydroxyvittatín	>200	>200
hamayn	>200	>200
galantamín ^s	1 ± 0,05	14 ± 0,03

^a priemer ± štandardná odchýlka z troch meraní; ^s štandard

U alkaloidov haemantamínu a hamaynu, ktoré boli izolované z *Nerine bowdenii* sa skúmala okrem AChE a BuChE inhibičnej aktivity aj inhibičná aktivita voči POP. Ani jeden nevykázal inhibičný potenciál (Tabuľka 4). Zaujímavé výsledky boli pozorované u krinínových alkaloidov. Najvyššiu aktivitu voči POP spomedzi testovaných krinínových alkaloidov vykázal bufanidrín, ktorý bol aktívny aj voči HuAChE⁸⁹.

Tabuľka 4: HuAChE, HuBuChE, and POP inhibičná aktivita vybraných alkaloidov izolovaných z *Nerine bowdenii*⁸⁹

Alkaloid	HuAChE IC ₅₀ ^a [μM]	HuBuChE IC ₅₀ ^a [μM]	POP IC ₅₀ ^a [mM]
haemantamín	>1000	>1000	>100
hamayn	992,7 ± 220,7	472,0 ± 37,0	>100
bufanidrín	72,6 ± 8,2	>1000	0,37 ± 0,04
galantamín ^s	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	>100
berberín ^s	—	—	0,14 ± 0,02

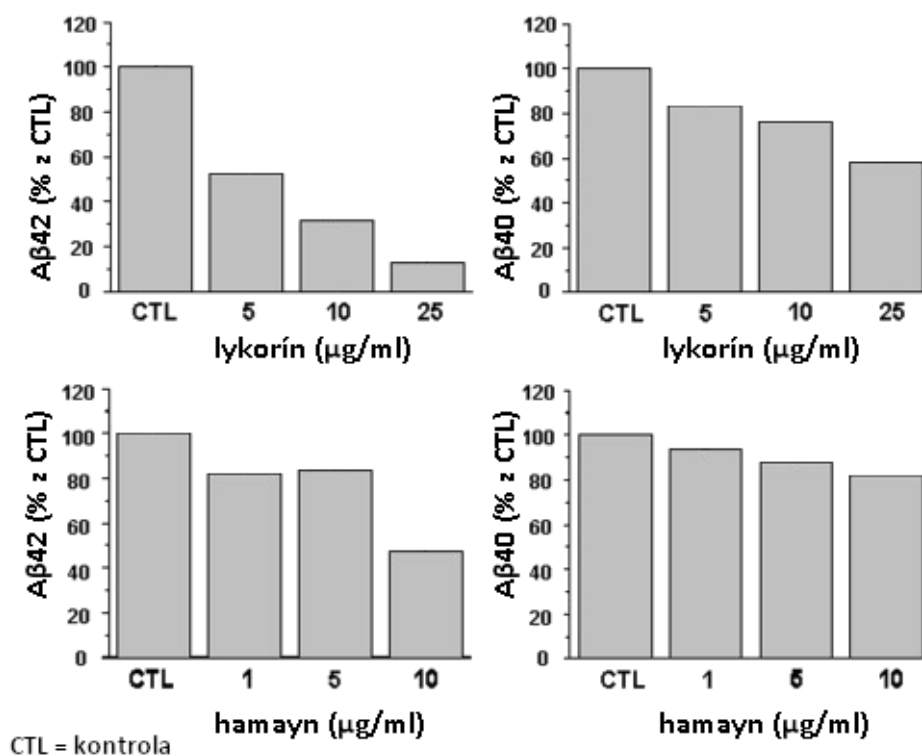
^a priemer hodôt ± štandardná odchýlka z 3 nezávislých meraní; ^s štandard

Potenciál Amaryllidaceae alkaloidov rôznych štruktúrnych typov inhibovať GSK-3β bol skúmaný v štúdií Hulcová D. et al. (2018)⁹⁰. Najvyššiu aktivitu preukázal homolykorínový alkaloid masonín, ktorý spôsobil 66% inhibíciu GSK-3β. Následne bola stanovená aj jeho hodnota IC₅₀ (27,81 ± 0,05 μM). Ako štandard poslúžila látka SB-415286 (IC₅₀ = 70,00 nM). Haemantamínové alkaloidy vykázali nižšiu inhibičnú aktivitu (Tabuľka 5) a ich hodnoty IC₅₀ neboli stanovené⁹⁰.

Tabuľka 5: GSK-3β inhibičný potenciál haemantamínových alkaloidov a masonínu⁹⁰

alkaloid	% inhibícia GSK-3β pri c = 50 μM
epimaritidín	45,2 ± 1,1
haemantamín	52,4 ± 0,1
haemantidín	33,0 ± 2,2
hamayn	33,9 ± 0,1
seko-izopowellaminon	38,5 ± 0,8
masonín	66,0 ± 4,0

Kwon H et al. (2011)⁹¹ vykonali skrining malých molekúl z prírodných zdrojov, pri ktorom *in vitro* skúmali vplyv látok na zníženie tvorby A β ₄₂ v bunkách HeLa stabilne exprimujúcich švédsku mutantnú formu APP (APP^{sw}). Medzi testovanými látkami bol haemantamínový alkaloid hamayn a lykorínový alkaloid lykorín oba izolované z *Crinum macowanii* (Obrázok 8). Lykorín vykázal značnú aktivitu najmä pri vyšších dávkach, pričom nebol toxický voči testovaným bunkám. Hamayn bol menej aktívny a jeho prípadné toxické účinky na testované bunky neboli v článku uvedené⁹¹.



Obr. 8: Inhibícia tvorby A β v bunkách HeLa stabilne exprimujúcich APP^{sw}⁹¹

3.2.3.3 Antimikrobiálna aktivita

Kvôli rýchlo narastajúcej antibiotickej rezistencii je nutné hľadať nové liečivá, ktoré budú účinné aj na baktérie odolné proti súčasným antibiotikám. Zdrojom nových liečiv by mohli byť rastliny čeľade Amaryllidaceae. Analýzy extraktov rastlín viacerých druhov tejto čeľade odhalili ich antibakteriálne, antimykotické, antivírusové či antimalarické účinky.

Antimykotická a antibakteriálna *in vitro* aktivita AA bola testovaná v štúdií Ločárek M. et al. (2015)⁹². Haemantamínové alkaloidy haemantamín, haemantidín a hamayn inhibovali rast kvasiniek *Candida dubliniensis* a *Lodderomyces elongiosporus*. Haemantamín bol aktívny aj proti druhu *Candida albicans*. Antibakteriálna aktivita bola

skúmaná na grampozitívnej baktérii *Escherichia coli* a gramnegatívnej baktérii *Staphylococcus aureus*. Haemantamínové alkaloidy neboli voči baktériám aktívne⁹².

Antivírusové účinky boli zistené u haemantamínu. Silnú aktivitu prejavil *in vitro* proti vírusu chrípky typu A (H5N1). Testovaný bol aj 11-hydroxyvittatín, vykázal ale oveľa nižšiu aktivitu proti tomuto vírusu⁹³.

Antiprotozoárna aktivita alkaloidov 11-hydroxyvittatín-N-oxidu, haemantamínu a 8-*O*-demetylmartidínu izolovaných z *Galanthus trojanus* bola testovaná v štúdií Kaya G. I. et al. (2011)⁹⁴ Hodnotila sa účinnosť *in vitro* proti parazitickým prvkom *Trypanosoma brucei rhodesiense*, pôvodcovi ľudskej africkej trypanozomózy (tzv. spavá choroba), *Trypanosoma cruzi* spôsobujúcej americkú trypanozomózu, *Leishmania donovani*, pôvodcovi ochorenia kala-azar (viscerálna leishmanióza) a pôvodcovi malárie *Plasmodium falciparum* (kmeň K₁ rezistentný k liečivám). Bola tiež hodnotená aktivita proti rekombinantným enzýmom z *P. falciparum* zapojených do biosyntézy mastných kyselín (*PfFabI*, *PfFabG*, *PfFabZ*), ktoré sú potenciálnymi molekulárnymi cieľmi v profylaxii malárie. Ďalej bola testovaná cytotoxicita proti primárnej cicavčej bunkovej línii (L6) a ľudskej bunkovej línii karcinómu (KB) (Tabuľky 6 a 7). Haemantamín bol výrazne aktívny proti všetkým testovaným prvkom, ale aj toxický voči bunkovým líniam, čo naznačuje, že jeho antiprotozoárna aktivita môže byť spôsobená všeobecnou toxicitou. 8-*O*-demetylmartidín bol slabo aktívny iba proti *T. b. rhodesiense* a 11-hydroxyvittatín-N-oxid iba proti enzýmu *PfFabZ*⁹⁴.

Tabuľka 6: Antiprotozoárna a cytotoxická aktivita haemantamínových alkaloidov z *Galanthus trojanus*⁹⁴

alkaloid	IC ₅₀ [µg/ml]				
	antiprotozoárna aktivita			cytotoxicita	
	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>	L6	KB
11-hydroxyvittatín-N-oxid	>90	>90	>90	>90	>50
haemantamín	3,4	1,8	22,0	7,41	0,97
8- <i>O</i> -demetylmartidín	61,5	>90	>90	>90	>50
štandardy	0,004 ^a	0,36 ^b	0,20 ^c	0,005 ^d	0,002 ^d

^a melarsoprol, ^b benznidazol, ^c miltefosin, ^d podofylotoxín

Tabuľka 7: Antiplazmodiálna aktivita haemantamínových alkaloidov z *G. trojanus*⁹⁴

alkaloid	IC ₅₀ [µg/ml]			
	<i>P. falciparum</i>	enzýmy		
		PfFabI	PfFabG	PfFabZ
11-hydroxyvittatín- <i>N</i> -oxid	>20	>100	>100	45,0
haemantamín	2,75	>100	>100	>100
8- <i>O</i> -demetylmartidín	>20	>100	>100	>100
štandardy	0,065 ^a	0,014 ^b	0,5 ^c	0,3 ^c

^a chlorochín, ^b triklosan, ^c (-)-epigalokatechin galát

V ďalšej štúdií bola testovaná antiprotozoárna a cytotoxická aktivita alkaloidu 3-*O*-acetylhamaynu izolovaného z *Amaryllis belladonna* (Tabuľka 8). Bol výrazne aktívny proti všetkým testovaným prvokom, no aj toxický proti bunkám L6 (kostné myoblasty potkanov). Podľa týchto výsledkov 3-*O*-acetylhamayn nie je selektívne antiprotozoikum⁹⁵.

Tabuľka 8: Antiprotozoárna a cytotoxická aktivita 3-*O*-acetylhamaynu⁹⁵

látka	IC ₅₀ [µg/ml]					
	parazit	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>P. falciparum</i>	cytotoxicita
	štádium	trypomastigot	amastigot	amastigot	erytrocytárne	
	kmeň	STIB 900	Tulahuen C4 LacZ	MHOM-ET-67/L82	NF54	L6
3- <i>O</i> -acetylhamayn		1,51	8,25	17,91	1,14	1,72
štandard		0,001 ^a	1,080 ^b	0,091 ^c	0,002 ^d	0,007 ^e

^a melarsoprol, ^b benznidazol, ^c miltefosin, ^d chlorochín, ^e podofylotoxín

Zmes epimérov 6α-hydroxymartidínu a 6β-hydroxymartidínu bola v štúdií Tallini L. et al. (2017)⁹⁶ testovaná proti rovnakým prvokom a bunkovej línii ako 3-*O*-acetylhamayn. Aktívna bola proti *T. b. rhodesiense* (IC₅₀ = 30,68 µg/ml), *T. cruzi* (IC₅₀ = 66,11 µg/ml) a *P. falciparum* (IC₅₀ = 32,86 µg/ml) bez cytotoxického účinku na bunky L6 (IC₅₀ > 100)⁹⁶.

Alkaloidy krinamín a hamayn izolované z *Brunsvigia radulosa* mali miernu aktivitu proti chlorochín-senzitívnemu kmeňu *P. falciparum* (D 10) a chlorochín-rezistentnému

kmeňu *P. falciparum* (FAC 8). Boli toxické aj proti bunkám myšieho melanómu⁹⁷ (Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Antiplazmodiálna a cytotoxická aktivita krinamínu a hamaynu⁹⁷

testovaná látka	IC ₅₀ (µg/ml)		
	<i>Plasmodium falciparum</i>		cytotoxicita
	D10	FAC8	BL6
krinamín	2,8	3,4	1,8
hamayn	15,6	18,2	9,4
chlorochín ^a	0,002	0,01	20,9
daunomycín ^a	-	-	0,43

^aštandard

In vitro antiplazmodiálna aktivita krinanových alkaloidov bola skúmaná vo viacerých štúdiách. Doposiaľ bolo otestovaných už 72 alkaloidov proti 9 kmeňom *P. falciparum*, pričom α-krinanové alkaloidy sa javia ako viac účinné oproti β-krinanovým⁹⁸.

3.2.3.4 Ďalšia biologická aktivita

Haemantamínové alkaloidy yemenín A, krinamín a 6-hydroxykrinamín znížili produkciu oxidu dusnatého (NO) v makrofágoch, ktoré boli aktivované lipopolysacharidom (LPS). Aktivita alkaloidov (yemenín A: IC₅₀ = 4,8 µM, krinamín: IC₅₀ = 1,8 µM, 6-hydroxykrinamín: IC₅₀ = 5,4 µM) bola silnejšia ako aktivita štandardu guanidinoetyl disulfidu (IC₅₀ = 7,4 µM), selektívneho inhibítora indukovateľnej syntázy oxidu dusnatého (iNOS). Enzým iNOS sa podieľa na nadmernej produkcii NO, ktorá môže nastať pri zápalovom procese. Preto sa ďalej skúmali aj účinky alkaloidov na aktivitu a indukciu enzýmu iNOS. Yemenín A, krinamín a 6-hydroxykrinamín inhibovali iNOS len veľmi slabo, ale potlačili jeho indukciu v LPS-aktivovaných makrofágoch. Výsledky naznačujú, že tieto alkaloidy inhibujú produkciu NO znížením indukcie iNOS⁹⁹.

Nedávno bola v štúdií Naidoo D. et al. (2020)¹⁰⁰ objavená selektívna inhibičná aktivita krinamínu, haemantidínu a haemantamínu proti MAO-B. Aktivita krinamínu (IC₅₀ = 14,90 ± 0,01 nM) a haemantidínu (IC₅₀ = 17,20 ± 0,01 nM) bola dokonca vyššia ako u štandardu deprenylu (synonymum selegilín, IC₅₀ = 20,00 ± 0,00 nM). Haemantamín mal najslabší inhibičný účinok (IC₅₀ = 112,00 ± 0,20 nM). *In silico* hodnotenie molekulárnych

interakcií krinamínu a haemantidínu s MAO-B potvrdilo vysoký inhibičný potenciál alkaloidov. Preskúmanie ich vlastností a hodnotenie toxicity *in silico* a *in vitro* odhalilo, že by mohli byť netoxickou a bezpečnejšou alternatívou látok inhibujúcich MAO-B ako je štandardný inhibítor selegilín, o ktorom je známe, že má kardiotoxické účinky¹⁰⁰.

3.3 Deriváty haemantamínových alkaloidov a ich biologická aktivita

Mnohé haemantamínové alkaloidy majú farmakologicky zaujímavú biologickú aktivitu, ktorá ale u niektorých nie je dostatočne silná alebo selektívna. Z cieľom vylepšiť ich aktivitu a preskúmať SAR boli obmenou štruktúry alkaloidov pripravené polosyntetické deriváty. Hľadanie a príprava čo najaktívnejšej zlúčeniny s vhodnými vlastnosťami smeruje k získaniu tzv. lead structure - molekuly, ktorá je vhodným kandidátom pre vývoj nového liečiva.

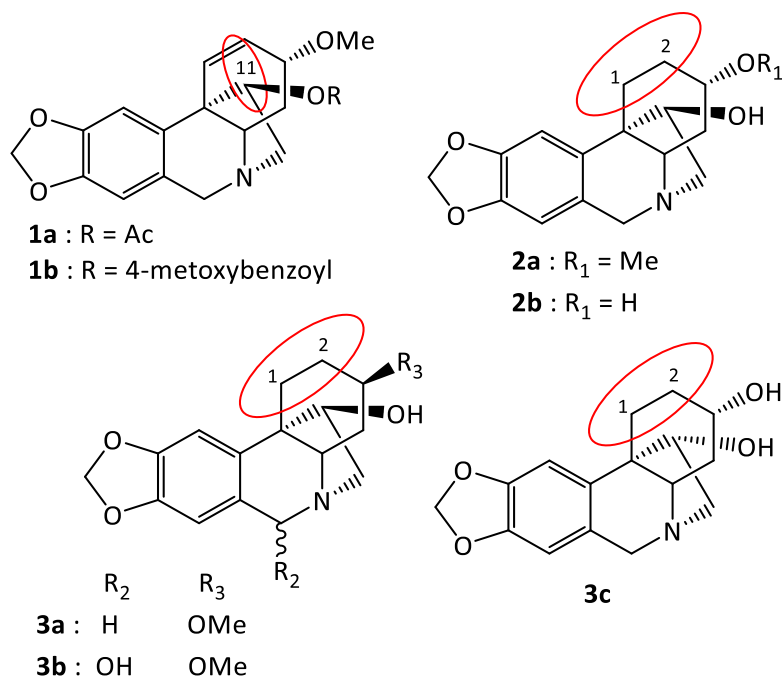
3.3.1 Deriváty s protinádorovou aktivitou

Najvýznamnejšou aktivitou haemantamínových alkaloidov je práve protinádorová. Pre lepšie pochopenie SAR boli doposiaľ pripravené polosyntetické deriváty niekoľkých najaktívnejších alkaloidov. V tejto kapitole sú zhrnuté informácie o príprave a protinádorovej aktivite derivátov krinamínu, hamaynu, haemantamínu, haemantidínu, bulbispermínu a 11-hydroxyvittatínu.

Deriváty krinamínu boli pripravené acyláciou hydroxylovej skupiny na uhlíku C-11 v 5,10b-etylénovom mostíku anhydridom kyseliny octovej a 4-metoxybenzoylchloridom za vzniku 11-*O*-acetoxykrinamínu (1a) a 11-*O*-(4-metoxybenzoyl)krinamínu (1b) (Obrázok 9). Výsledky ukázali, že tieto dva deriváty, na rozdiel od krinamínu, nie sú schopné vyvolať apoptózu testovaných buniek pečeneového hepatómu potkana (5123 tc) a odhalili význam voľnej hydroxylovej skupiny na uhlíku C-11 pre cytotoxické vlastnosti alkaloidu⁶⁶.

Za účelom preskúmania vplyvu dvojitej väzby v kruhu C medzi uhlíkmi C-1 a C-2 na protinádorovú aktivitu boli pripravené dihydroderiváty alkaloidov. Dihydrokrinamín (2a) a dihydrohamayn (2b) (Obrázok 9) vznikli hydrogenáciou s použitím katalyzátora paládia na aktívnom uhlí. Proapoptotická aktivita derivátov sa testovala na bunkách ľudskej leukémie (Jurkat). Redukcia dvojitej väzby mala za následok významné zníženie aktivity u dihydrokrinamínu oproti krinamínu, ktorý bol silným induktorom apoptózy.

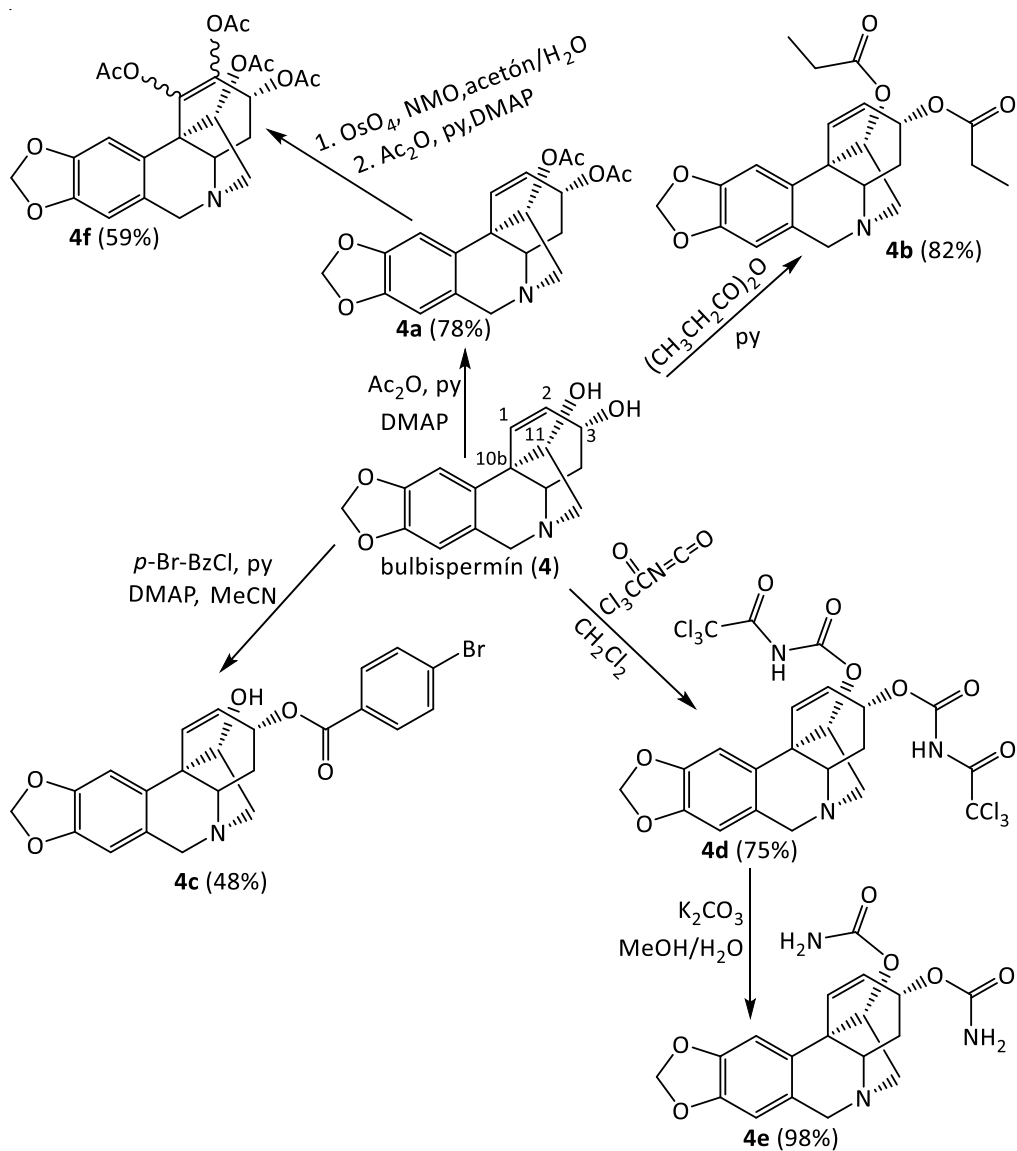
Naopak, mierna aktivita hamaynu sa po prevedení na dihydroderivát zvýšila. Výsledky dokazujú, že dvojitá väzba nie je nevyhnutná pre cytotoxickú aktivitu, keďže hydrogenáciou vznikli viac alebo menej aktívne deriváty. Ich aktivita závisela od substituentu na C-3. Ukázalo sa, že dvojitá väzba mierne moduluje aktivitu, čo možno pripísať jej konformačným účinkom¹⁰¹. Ďalšie dihydroderiváty boli pripravené z haemantamínu (3a), haemantidínu (3b) a bulbispermínu (3c) taktiež za katalytického pôsobenia paládia na aktívnom uhlí (Obrázok 9). Pri hodnotení cytotoxických účinkov na bunky promyelocytovej leukémie HL-60 vykázali dihydroderiváty nižšiu aktivitu ako pôvodné alkaloidy¹⁰².



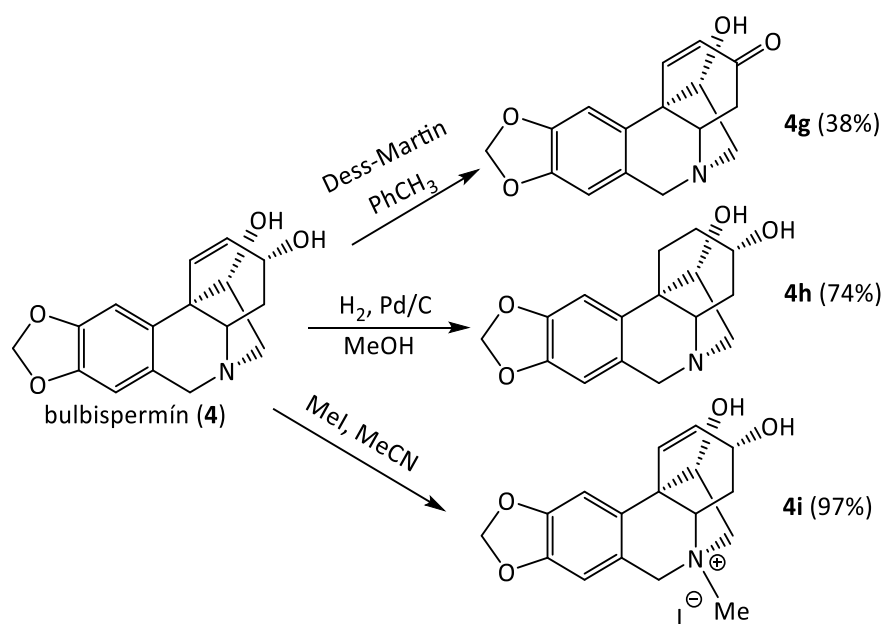
Obr. 9: Deriváty krinamínu (1a, 1b, 2a), hamaynu (2b), haemantamínu (3a), haemantidínu (3b) a bulbispermínu (3c) (červenou je zvýraznené miesto modifikácie pôvodnej štruktúry)

Príprava derivátov bulbispermínu (4a – 4i) je znázornená na Obrázku 10 a Obrázku 11. Väčšina derivátov (okrem 4e, 4f, 4h, 4i) bola získaná obmenou hydroxylových skupín v polohe C-3 a C-11. Vznikli acyláciou acetanhydridom (4a) a propiónanhydridom (4b) na oboch hydroxylových skupinách a selektívnou acyláciou za použitia *p*-brómbenzoylchloridu na stericky dostupnejšom C-3 hydroxyle (4c). Reakciou bulbispermínu s trichloracetylizokyanátom bol získaný medziprodukt (4d), ktorý bol zásaditou hydrolýzou premený na dikarbamát (4e). Pokus o selektívnu dihydroxyláciu

dvojitej väzby v diacetáte (4a) nebol úspešný a bol pripravený tetraacetát ako zmes diastereomérov (4f). Ďalšie deriváty bulbispermínu boli pripravené selektívnou oxidáciou za vzniku C3-ketónu (4g), hydrogenáciou dvojitej väzby (4h) a kvarternizáciou dusíka (4i)¹⁰³.



Obr. 10: Príprava derivátov bulbispermínu (4a - 4f)¹⁰³



Obr. 11: Príprava derivátov bulbispermínu (4g – 4i)¹⁰³

Protinádorová aktivita derivátov bulbispermínu bola testovaná na 5 nádorových bunkových líniiach, z nich 2 boli rezistentné k apoptóze (glioblastómy U373 a T98G), 2 citlivé k apoptóze (anaplastický oligodendroglióm Hs683 a cervikálny adenokarcinóm HeLa) a bunková línia glioblastómu U87 nemala určenú senzitivitu k apoptóze. Deriváty 4a a 4e ako jediné vykázali protinádorovú aktivitu (Tabuľka 10), pričom aktívnejší z nich bol polárnejší dikarbamát (4e). V porovnaní so samotným bulbispermínom boli jeho deriváty menej aktívne. Z výsledkov vyplýva, že nahradenie hydroxylov hydrofóbnymi skupinami vedie k strate protinádorovej aktivity. Rovnako ako aj v predchádzajúcej štúdií, dihydrobulbispermín bol neaktívny. Ďalšie experimenty odhalili schopnosť bulbispermínu a derivátu 4e zvyšovať hladinu polymerizovaného aktínu v gliómových bunkách Hs683 pri inhibičnej koncentrácii IC₅₀, čo môže byť podstatou ich cytostatického účinku. V štúdií boli zároveň testované aj vybrané alkaloidy krinínového (bufanamín, bufanidrín, ambellín) a haemantamínového typu (haemantamín, haemantidín). Zatiaľ čo haemantamínové alkaloidy boli veľmi aktívne, krinínové nemali na bunky žiaden inhibičný účinok. Pre protinádorovú aktivitu je teda dôležitý etylénový mostík v α polohe¹⁰³.

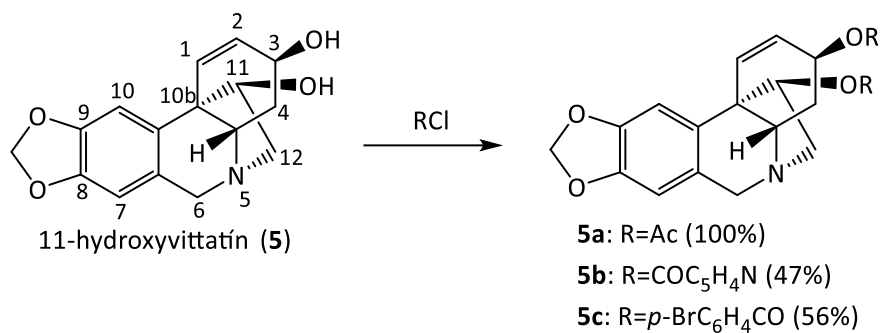
Tabuľka 10: Cytotoxická aktivita derivátov bulbispermínu¹⁰³

testovaná látka	GI ₅₀ (μM) ^a				
	rezistentné k apoptóze		senzitivne k apoptóze		neznáma senzitivita k apoptóze
	T98G	U373	Hs683	HeLa	U87
bulbispermín (4)	9	38	11	8	9
haemantamín	8	6	3	3	6
haemantidín	14	7	4	ND	6
bufanamín	>100	>100	>100	>100	>100
bufanisín	>100	>100	>100	>100	>100
ambellín	>100	>100	>100	>100	>100
4a	98	ND	63	90	74
4b	>100	ND	>100	>100	>100
4c	>100	ND	>100	>100	>100
4d	>100	ND	>100	>100	>100
4e	91	>100	50	46	15
4f	>100	ND	>100	>100	>100
4g	>100	ND	>100	>100	>100
4h	>100	ND	>100	>100	>100
4i	>100	ND	>100	>100	>100

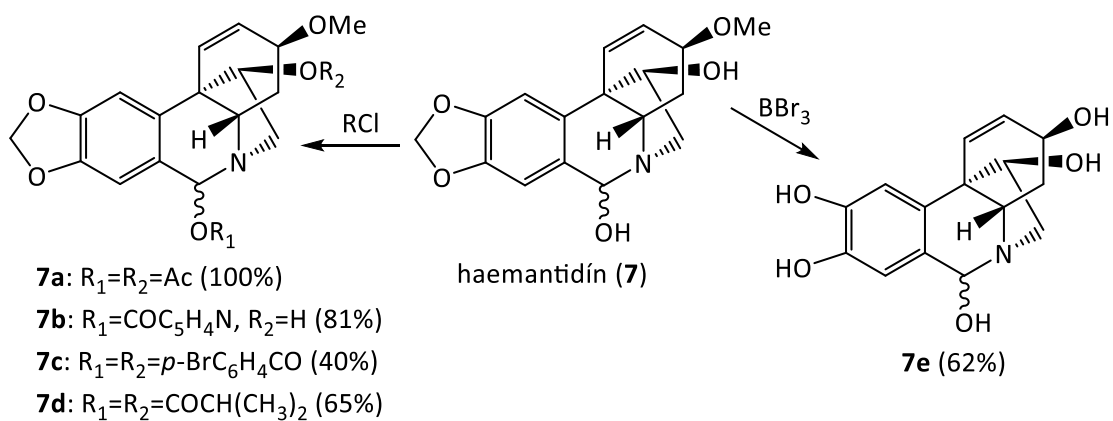
GI₅₀ - koncentrácia potrebná pre 50% inhibíciu bunkovej proliferácie

^a priemer hodnôt GI₅₀ z dvoch nezávislých experimentov; ND – nestanovené

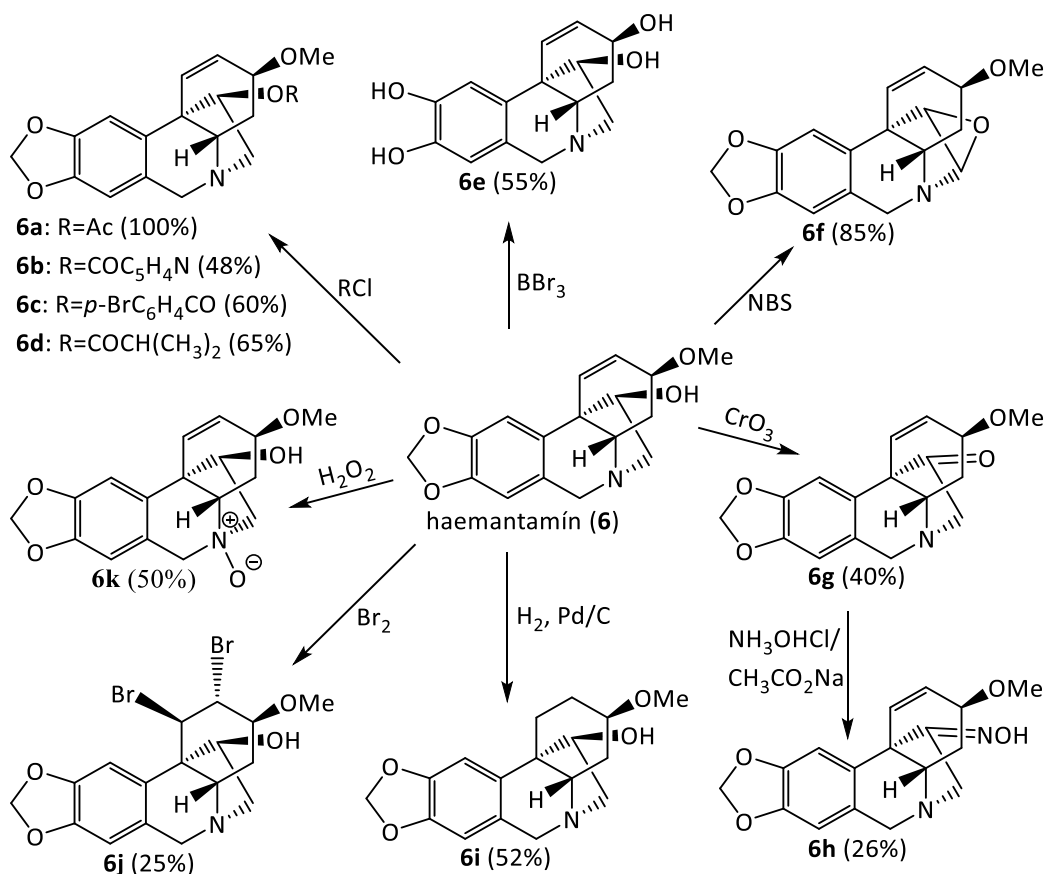
Polosyntetické deriváty 11-hydroxyvittatínu (5) (Obrázok 12), haemantamínu (6) (Obrázok 14) a haemantidínu (7) (Obrázok 13) boli pripravené v rámci štúdie Cedrón J. C. et al. (2015)⁷⁶ rôznymi chemickými obmenami z cieľom získať štruktúrne rozmanité zlúčeniny. Obmeny prebiehali hlavne na hydroxylových skupinách alkaloidov v polohe C-3, C-11 alebo C-6 reakciou s acylhalogenidmi za vzniku mono alebo diesterov (5a – 5c, 6a – 6d, 7a – 7d). V haemantamíne bola hydroxylová skupina C-11 oxidovaná na ketón (6g) a následne reakciou s hydroxylamín hydrochloridom premenená na oxim (6h). Reakciou haemantamínu a haemantidínu s BBr₃ došlo k otvoreniu dioxolánového kruhu a vznikli polyhydroxylované deriváty (6e, 7e). Dvojité väzby v haemantamíne bola odstránená adíciou brómu (6j) a katalytickou hydrogenáciou za prítomnosti paládia na aktívnom uhlí (6i). Reakciou s N-brómsukcínimidom (NBS) bol haemantamín modifikovaný na 11,12-epoxyhaemantamín (6f) a reakciou s H₂O₂ na haemantamín-*N*-oxid (6k). Podrobnejšie informácie o príprave derivátov a reakčných podmienkach možno nájsť v článku Cedrón J. C. et al. (2012)¹⁰⁴.



Obr. 12: Príprava derivátov 11-hydroxyvittatínu (5a – 5c)⁷⁶



Obr. 13: Príprava derivátov haemantidínu (7a – 7e)⁷⁶



Obr. 14: Príprava derivátov haemantamínu (6a – 6k)⁷⁶

Cytotoxicita alkaloidov a polosyntetických derivátov (Tabuľka 11) bola testovaná na štyroch nádorových bunkových líniiach (A2780 - vaječník, SW1573 - pľúca, T-47D - prsník, WiDr - hrubé črevo). Z porovnania aktivity alkaloidov vittatínu, 11-hydroxyvittatínu (5), haemantamínu (6) a haemantidínu (7) vyplýva, že prítomnosť metoxy skupiny na C-3 a hydroxy skupiny na C-11 je pre antiproliferatívnu aktivitu potrebná. Tento predpoklad bol potvrdený prípravou derivátov 6a – 6f, ktoré boli menej aktívne ako haemantamín. Neaktívne deriváty 6i a 6j svedčia o dôležitosti dvojitej väzby medzi uhlíkmi C-1 a C-2. Odstránenie metyléndioxy skupiny v deriváte 6e viedlo ku zníženiu aktivity, čo naznačuje význam tejto skupiny pre antiproliferatívne účinky. Haemantidín, obsahujúci hydroxylovú skupinu na C-6, možno považovať za rovnako aktívny ako haemantamín. Acylácia hydroxylových skupín na C-6 a C-11 viedla k strate antiproliferatívnej aktivity haemantidínu (7a, 7c, 7d), ale derivát 7b s voľnou hydroxylovou skupinou na C-11 a nikotinoylovou skupinou na C-6 si aktivitu zachoval. Najvyššiu antiproliferatívnu aktivitu vykázali alkaloidy haemantamín (6) a haemantidín (7) a polosyntetické deriváty 11-oxohaemantamín (6g) a 6-nikotinoylhaemantidín (7b)⁷⁶.

Tabuľka 11: Cytotoxická aktivita haemantamínových alkaloidov a ich derivátov⁷⁶

testovaná látka	GI ₅₀ (μM) ^a			
	A2780	SW1573	T47-D	WiDr
vittatín	≥100	≥100	≥100	≥100
11-hydroxyvittatín (5)	21,0 ± 2,0	16,9 ± 4,0	12,5 ± 9,0	21,1 ± 6,0
5a	≥100	≥100	≥100	≥100
5b	35,9 ± 5,0	34,8 ± 4,0	51,1 ± 3,0	53,8 ± 3,0
5c	100	100	100	100
haemantamín (6)	0,7 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 0,4	1,2 ± 0,5
6a	≥100	≥100	≥100	≥100
6b	27,2 ± 10,0	29,5 ± 12,0	72,3 ± 24,0	63,3 ± 35,0
6c	19,1 ± 1,0	21,9 ± 4,0	46,1 ± 30,0	32,8 ± 22,0
6d	≥100	≥100	≥100	≥100
6e	≥100	≥100	≥100	≥100
6f	≥100	≥100	≥100	≥100
6g	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	4,4 ± 1,5	3,5 ± 2,0
6h	33,2 ± 2,0	39,1 ± 20,0	78,6 ± 24,0	67,4 ± 34,0
6i	31,4 ± 7,0	29,8 ± 3,0	≥100	58,9 ± 12,0
6j	≥100	≥100	≥100	≥100
6k	27,2 ± 5,0	22,0 ± 20,0	≥100	≥100
haemantidín (7)	1,5 ± 0,1	2,0 ± 1,0	1,8 ± 1,0	2,7 ± 2,0
7a	≥100	≥100	≥100	≥100
7b	6,9 ± 1,0	4,5 ± 0,7	8,2 ± 1,2	10,1 ± 0,5
7c	≥100	≥100	≥100	≥100
7d	≥100	≥100	≥100	≥100
7e	≥100	≥100	≥100	≥100

GI₅₀ - koncentrácia potrebná pre 50% inhibíciu bunkovej proliferácie

neaktívne: GI₅₀ ≥ 100 μM; mierna aktivita: GI₅₀ = 10 - 100 μM; vysoká aktivita: GI₅₀ ≤ 10 μM

^a hodnoty sú priemerom z dvoch až troch experimentov

V rámci výskumu skupiny ADINACO bolo na Katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové pripravených už niekoľko desiatok alifatických a aromatických derivátov haemantamínu, ktoré vznikli obmenou OH- skupiny na C-11 (Obrázok 18). Boli testované na rôznych nádorových bunkových líniiach. Deriváty nevyvolali významnejšie cytotoxické a apoptotické účinky. Výnimkou je látka LC-70 pripravená v rámci diplomovej práce Mgr. Viery Bodoríkovej, ktorá prejavila veľmi silnú cytotoxickú aktivitu. Jej štruktúra zatiaľ nie je zverejnená kvôli plánovanému podaniu patentovej prihlášky¹⁰⁵.

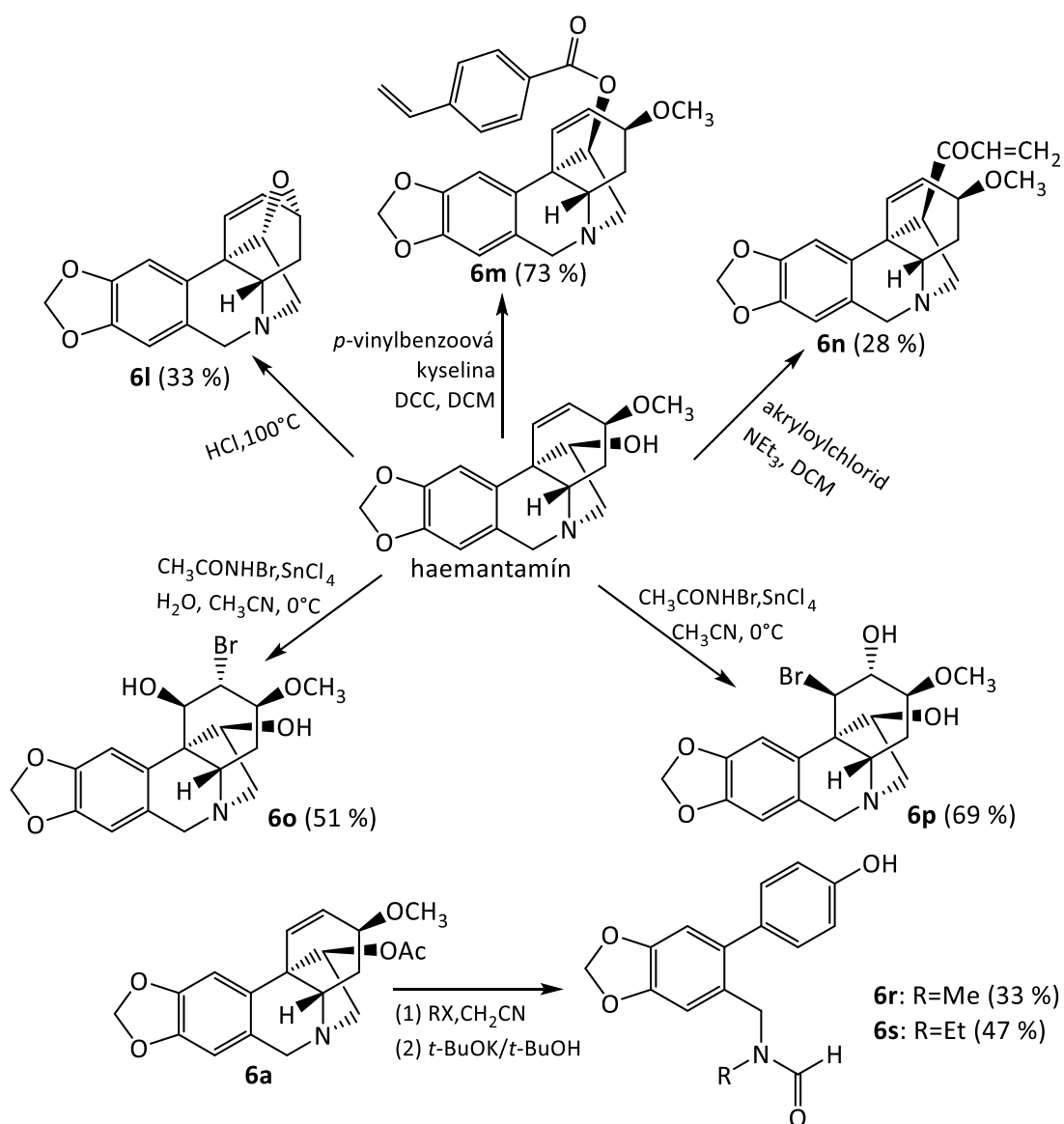
Na základe porovnania aktivity haemantamínových alkaloidov a ich derivátov boli objavené určité štruktúrne prvky farmkofóru indukujúceho apoptózu. Pre cytotoxickú aktivitu je potrebná prítomnosť etylénového mostíka v α -polohe a dvojitej väzby medzi C-1 a C-2, ktorá mierne moduluje aktivitu vďaka svojim konformačným účinkom, ale nie je striktne nevyhnutná. Na C-3 je tolerovaná α - alebo β -metoxyskupina alebo aj β -hydroxyl, avšak α -hydroxylová skupina spôsobuje mierny pokles aktivity. Podľa výsledkov je na C-3 potrebný akceptor H-väzby a jeho umiestnenie môže byť do istej miery flexibilné. Na C-11 je žiaduca prítomnosť malého substituentu a tolerovaná je hydroxylová skupina alebo aj vodík^{59,101}.

3.3.2 Deriváty s antimalarickou aktivitou

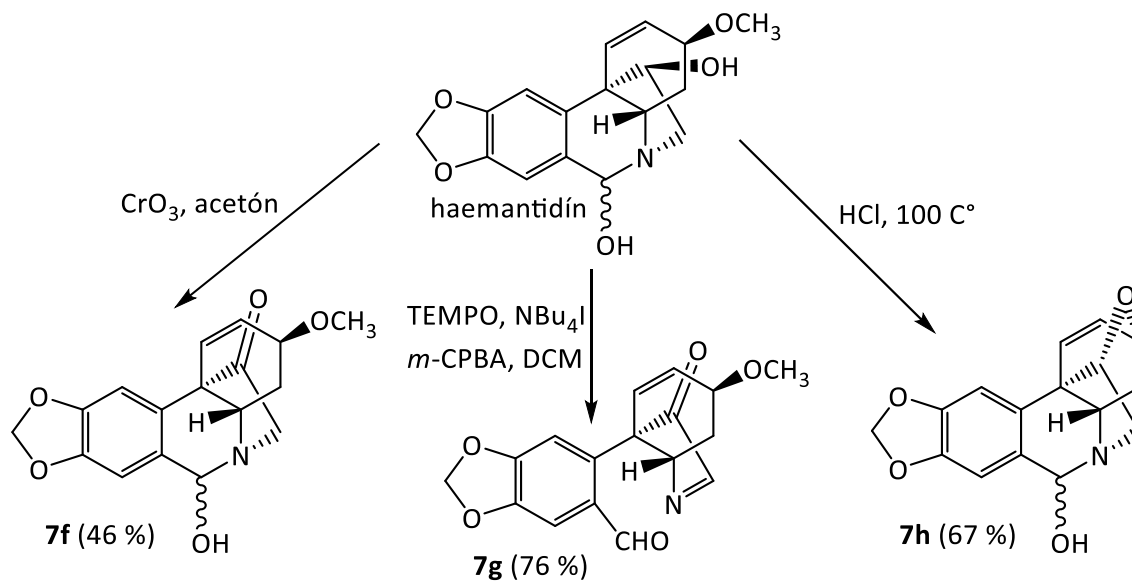
Malária je závažné infekčné ochorenie spôsobené parazitickými prvokmi rodu *Plasmodium*. Najčastejšie ide o druhy *P. falciparum* a *P. vivax*. Tieto prvoky prenášajú na ľudí infikované samičky komárov rodu *Anopheles*. Rýchle šírenie kmeňov rezistentných na antimalariká zvyšuje dopyt po selektívnejších a účinnejších liečivách na maláriu.

Potenciálnym zdrojom nových antimalarík môžu byť haemantamínové alkaloidy. Antimalarická aktivita bola zistená u krinamínu, haemantamínu, haemantidínu, 3-epibulbispermínu, vittatínu, 11-hydroxyvittatínu a ďalších alkaloidov⁹⁸. Za účelom odhalenia SAR bolo v štúdií Cedrón J. C. et al. (2012)¹⁰⁴ pripravených 31 polosyntetických derivátov haemantamínu, haemantidínu a 11-hydroxyvittatínu. Väčšina z nich bola neskôr testovaná aj na cytotoxickú aktivitu v rámci štúdie Cedrón J. et al. (2015)⁷⁶. Príprava týchto derivátov (Obrázky 12, 13, 14) je už rozobraná v predchádzajúcej kapitole. V tejto kapitole je popísaná príprava derivátov, ktoré boli testované iba na antimalarickú aktivitu (Obrázky 15, 16, 17). Modifikované boli najmä hydroxylové skupiny alkaloidov. Esterifikáciou haemantamínu *p*-vinylbenzoovou kyselinou vznikol 11-(*p*-vinylbenzoyl)haemantamín (6m) a acyláciou akryloylchloridom vznikol 11-akryloylhaemantamín (6n). Z 11-hydroxyvittatínu bol esterifikáciou za použitia kyseliny metoxyfenyloctovej pripravený 3,11-bis(metoxyfenylacetyl)-11-hydroxyvittatín (5e) a acyláciou s butyrylchloridom bol pripravený 3,11-diizobutyryl-11-hydroxyvittatín (5d). Hydroxylová skupina na C-11 v haemantidíne bola selektívne oxidovaná Jonesovým činidlom za vzniku 11-oxohaemantidínu (7f). S cieľom oxidovať C-6 hydroxylovú skupinu haemantidínu a získať laktám bol pri reakcii použitý katalyzátor TEMPO

((2,2,6,6-tetrametyl-piperidín-1-yl)oxyl), ale namiesto vytvorenia laktámu došlo k otvoreniu kruhu B (7g). Reakciou s koncentrovanou HCl pod spätným chladičom bol pripravený apohaemantidín (7h) a tiež apohaemantamín (6l), prírodný alkaloid vyskytujúci sa v rastlinách. Obmenou dvojitej väzby haemantamínu za použitia N-bromoacetamidu vznikol 2-bromo-1-hydroxyhaemantamín (6o) a keď táto reakcia prebiehala v bezvodom prostredí, vznikol 1-bromo-2-hydroxyhaemantamín (6p). Na 11-acetylhaemantamíne (6a) bola uskutočnená Hoffmanova eliminácia. Najskôr prebehla reakcia s alkylhalogenidmi a po pôsobení *t*-butanolu a *t*-butoxidu draselného sa vytvorili formamidy (6r a 6s) s bifenylovou štruktúrou. Pri reakcii došlo k aromatizácii kruhu C a k otvoreniu kruhu D.



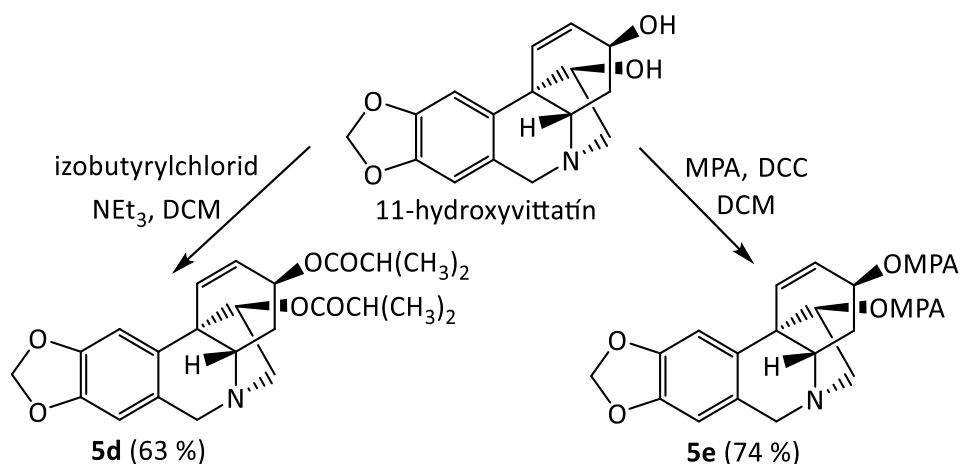
Obr. 15: Príprava derivátov haemantamínu (6l – 6s)¹⁰⁴



m-CPBA: *m*-chloroperbenzoová kyselina

NBu₄I: tetrabutylamónium jodid

Obr. 16: Príprava derivátov haemantidínu (7f – 7g)¹⁰⁴



MPA: (*R*)-(-)-metoxyfenyloctová kyselina

DCC: 1,3-dicyklohexylkarbodiimid

DCM: dichlorometán

Obr. 17: Príprava derivátov 11-hydroxyvittatínu (5d, 5e)¹⁰⁴

Antimalarická aktivita haemantamínových alkaloidov a 31 derivátov bola testovaná *in vitro* na chlorochín-senzitívnom kmeni *Plasmodium falciparum* a ako štandard bol použitý chlorochín. Podľa výsledkov (Tabuľka 12) najlepšie antiplazmodiálne účinky vykázal derivát 3,11-dinikotinoyl-11-hydroxyvittatín (5b) a najaktívnejšími

prírodnými alkaloidmi boli haemantamín a haemantidín. Podobnú aktivitu ako haemantamín mal jeho epoxidový derivát (6f), čo však mohlo byť zapríčinené hydrolyzou oxiránového kruhu. Ostatné obmeny štruktúr alkaloidov viedli k zníženiu alebo až k strate aktivity¹⁰⁴.

Tabuľka 12: Antimalarická aktivita haemantamínových alkaloidov a ich derivátov¹⁰⁴

aktivita proti <i>Plasmodium falciparum</i> F32					
testovaná látka		IC ₅₀ (μM)	testovaná látka		IC ₅₀ (μM)
	8- <i>O</i> -demetylmartidín	91,5 ± 10,4	6j	1,2-dibromohaemantamín	6,5 ± 0,9
	6- <i>O</i> -metylmartidín	75,5 ± 9,0	6k	haemantamín- <i>N</i> -oxid	>100
	vittatín	7,3 ± 0,1	6l	apohaemantamín	92,9 ± 14,8
	11-hydroxyvittatín	13,2 ± 1,4	6m	11-(<i>p</i> -vinylbenzoyl)haemantamín	>100
5a	3,11-diacetyl-11-hydroxyvittatín	>100	6n	11-akryloylhaemantamín	8,4 ± 1,7
5b	3,11-dinikotinoyl-11-hydroxyvittatín	0,8 ± 0,1	6o	2-bromo-1-hydroxyhaemantamín	62,6 ± 7,5
5c	3,11-bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)-11-hydroxyvittatín	3,0 ± 0,6	6p	1-bromo-2-hydroxyhaemantamín	72,6 ± 5,0
5d	3,11-diizobutyryl-11-hydroxyvittatín	7,0 ± 1,2	6r	<i>N</i> -{[6-(4-hydroxyfenyl)-1,3-benzodioxolo-5-yl]metyl}- <i>N</i> -metylformamid	73,4 ± 10,5
5e	3,11-bis(metoxifynylacetyl)-11-hydroxyvittatín	5,1 ± 0,7	6s	<i>N</i> -etyl- <i>N</i> -{[6-(4-hydroxyfenyl)-1,3-benzodioxolo-5-yl]metyl}formamid	>100
	haemantamín	1,3 ± 0,2		haemantidín	1,2 ± 0,1
6a	11-acetylhaemantamín	75,8 ± 8,7	7a	6,11-diacetylhaemantidín	52,3 ± 7,5
6b	11-nikotinoylhaemantamín	51,7 ± 4,9	7b	6-nikotinoylhaemantidín	7,1 ± 0,9
6c	11-(<i>p</i> -bromobenzoyl)-haemantamín	43,3 ± 4,1	7c	6,11-bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)-haemantidín	2,9 ± 0,6
6d	11-izobutyrylhaemantamín	56,6 ± 8,1	7d	6,11-diizobutyrylhaemantidín	52,5 ± 6,6
6e	8,9-nor-11-hydroxyvittatín	13,4 ± 1,8	7e	8,9-nor-6,11-dihydroxyvittatín	72,1 ± 10,0
6f	11,12-epoxyhaemantamín	1,6 ± 0,1	7f	11-oxohaemantidín	85,7 ± 9,5
6g	11-oxohaemantamín	73,5 ± 10,0	7g	6-(6-metoxo-3-oxo-3,6,7,7a-tetrahydro-3a <i>H</i> -indol-3a-yl)-1,3-benzodioxol-5-karbaldehyd	76,6 ± 9,6
6h	11-oxohaemantamín oxim	95,5 ± 9,5	7h	apohaemantidín	84,2 ± 10,5
6i	1,2-dihydrohaemantamín	9,9 ± 1,3		chlorochín ^a	0,04

^a štandard

Na základe výsledkov boli pozorované určité vzťahy medzi štruktúrou a antimalarickou aktivitou. Dôležitá je prítomnosť dvojitej väzby medzi C-1 a C-2 a tiež

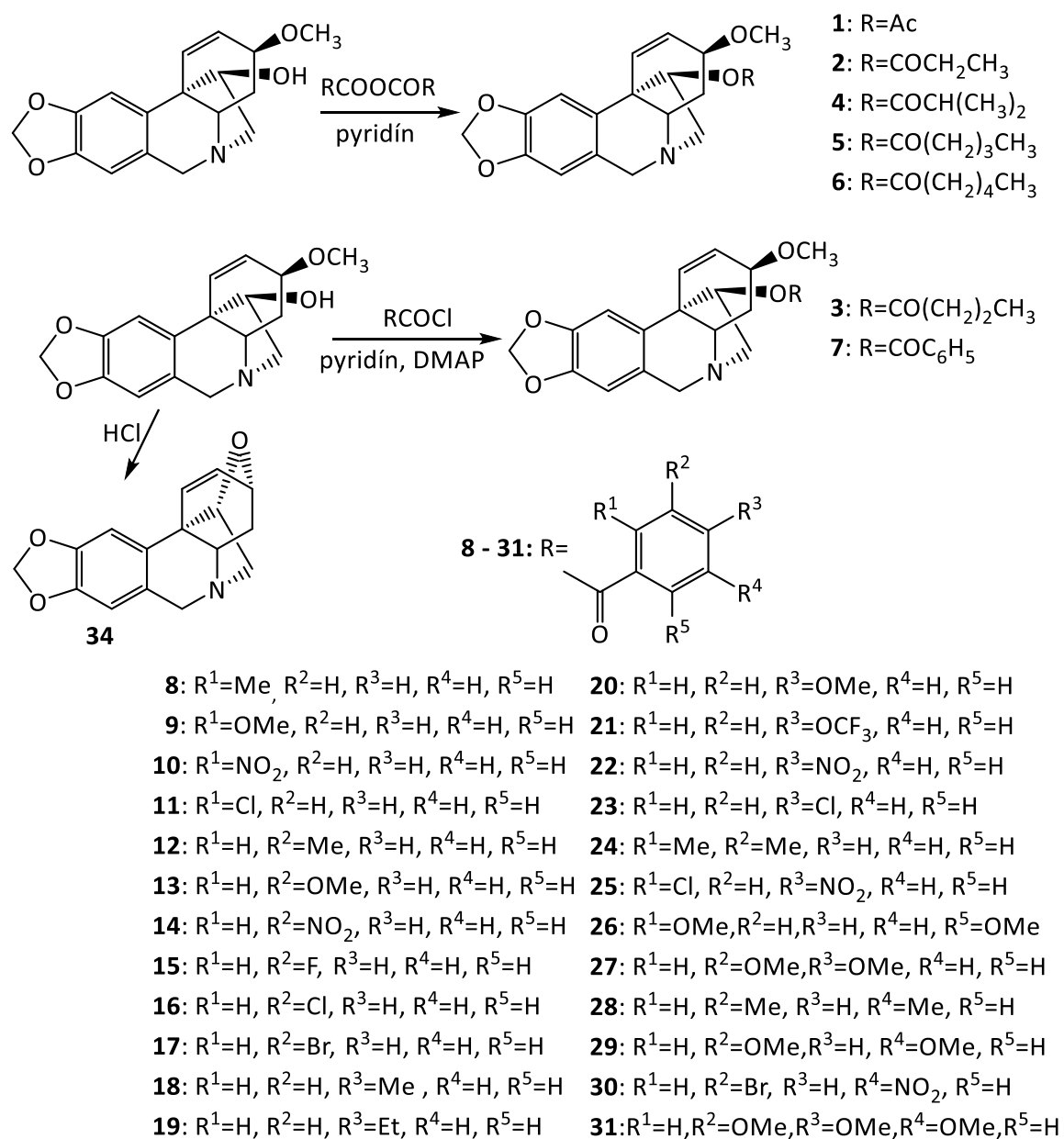
prítomnosť metyléndioxy skupiny. Z porovnania hodnôt acylderivátov vyplýva, že voľný hydroxyl na C-11 (donor vodíkovej väzby) je nevyhnutný pre zachovanie aktivity v sérii derivátov haemantamínu (6a - 6d, 6m, 6n). Pri derivátoch haemantidínu (7a – 7d) a 11-hydroxyvittatínu (5a – 5e) stratu antiplazmodiálnej aktivity spojenú s acyláciou OH- skupiny na C-11 moduluje povaha acylu na C-6 alebo na C-3. Derivát 3,11-diacetyl-11-hydroxyvittatín (5a) bol neaktívny, zavedenie izobutyrátov (5d) spôsobilo mierne zvýšenie aktivity a najvyššia aktivita bola nameraná u derivátu s dvoma aromatickými acylmi – nikotinátmi (5b). Deriváty haemantidínu s aromatickým substituentom na C-6 mali lepšiu antiplazmodiálnu aktivitu v porovnaní s derivátmi haemantamínu s rovnakým substituentom umiestneným na C-11 (6b vs. 7b, 6c vs. 7c)¹⁰⁴.

3.3.3 Deriváty s aktivitou využiteľnou v terapii Alzheimerovej choroby

Medzi molekulárne ciele potenciálnych liečiv vyvíjaných proti Alzheimerovej chorobe patria okrem iných aj enzýmy AChE, BuChE, GSK-3 β a POP. Väčšina doposiaľ testovaných alkaloidov haemantamínového typu má len veľmi slabú alebo žiadnu inhibičnú aktivitu voči cholínesterázam a POP a sú slabými inhibítormi GSK-3 β . Možnosťou zvýšenia ich účinku je príprava polosyntetických analógov.

Skúmaním biologickej aktivity AA a ich derivátov súvisiacej s Alzheimerovou chorobou sa zaoberá výskumná skupina ADINACO na Farmaceutickej fakulte Karlovej Univerzity v Hradci Králové v spolupráci s ďalšími výskumnými pracoviskami. V rámci tohto výskumu už bolo pripravených niekoľko desiatok polosyntetických derivátov AA rôznych štruktúrnych typov, medzi nimi aj deriváty haemantamínu. Príprava haemantamínových derivátov bola náplňou diplomových prác Mgr. Zuzany Kavkovej¹⁰⁶, Mgr. Jany Markovej¹⁰⁷, Mgr. Ludmily Homolkovej¹⁰⁸ a Mgr. Viery Bodoríkovej¹⁰⁵. Výsledky sú publikované v článkoch Kohelová E. et al. (2019)¹⁰⁹ a Peřinová R. et al. (2020)¹¹⁰. Pôvodným cieľom bolo pripraviť látky s vyššou protinádorovou aktivitou. Väčšina derivátov ale nevykazovala cytotoxické účinky proti testovaným nádorovým a nenádorovým bunkovým líniam, čo následne viedlo k preskúmaniu ich inhibičného potenciálu voči cholínesterázam. Tento pokus bol zároveň inšpirovaný štúdiami zaoberajúcimi sa derivátmi lykorínu, ktorý má rovnako ako haemantamín veľmi nízku anticholínesterázovú aktivitu, no jeho acylované a éterifikované deriváty vykázali silné inhibičné účinky proti obom cholínesterázam¹⁰⁹.

Jednoduché deriváty haemantamínu boli pripravené reakciou alkaloidu s anhydridmi alebo benzoylchloridmi, pri ktorej prebehla substitúcia na OH- skupine haemantamínu v polohe C-11 (Obrázok 18). Syntetizované boli alifatické (1 - 6) a najmä aromatické (7 - 31) deriváty. Tie alifatické boli pripravené acyláciou haemantamínu príslušnými anhydridmi. Jeden alifatický (3) a všetky aromatické estery haemantamínu vznikli acyláciou rôzne substituovanými benzoylchloridmi^{107,108,109,110}. Reakciou haemantamínu s HCl bol pripravený apohaemantamín¹⁰⁶ (34).



Obr. 18: Príprava derivátov haemantamínu (1 - 34)^{106,107,108,109,110}

Polosyntetické deriváty haemantamínu boli testované na inhibičnú aktivitu proti ľudským cholínesterázam (AChE, BuChE) (Tabuľka 13). Najvýraznejšia aktivita voči AChE bola nameraná u derivátov (32, 33) pripravených v rámci diplomovej práce Mgr. Viery Bodoríkovej pod označením LC-70 a LC-73¹⁰⁵, ktorých štruktúra zatiaľ nebola zverejnená kvôli plánovanému podaniu patentovej prihlášky. Obe zlúčeniny sú aktívnejšie proti AChE ako štandard galantamín a vyznačujú sa selektivitou voči tomuto enzýmu. Podľa dostupných výsledkov alifatické deriváty nepreukázali významnejšie inhibičné účinky, zatiaľ čo viaceré aromatické estery boli značne aktívne. Najsilnejším inhibítorom AChE bol 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemantamín (14), o niečo menej aktívne boli deriváty 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)haemantamín (10), 11-*O*-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemantamín (25), 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemantamín (30) a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemantamín (22), všetky bez aktivity voči BuChE. Niektoré deriváty sa naopak vyznačovali selektívnym a relatívne silným inhibičným účinkom na BuChE v porovnaní so štandardnými látkami, a to najmä 11-*O*-(2-metoxybenzoyl)haemantamín (9) a tiež analóg s nesubstituovaným benzoylom, 11-*O*-benzoylhaemantamín (7). Medzi testovanými látkami boli aj deriváty, ktoré inhibovali obe cholínesterázy. Najlepšiu duálnu aktivitu vykázali 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemantamín (11) a 11-*O*-(2-metylbenzoyl)haemantamín (8), pričom mierne prevažovala inhibícia BuChE.

Výsledky *in vitro* testovania anticholínesterázovej aktivity boli doplnené dokovacími štúdiami *in silico*, pri ktorých sa analyzovali pravdepodobné väzbové interakcie derivátov a enzýmov, čo umožnilo lepšie preskúmať vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou. Zistilo sa, že pre anticholínesterázovú aktivitu je potrebná prítomnosť arylového substituentu na haemantamíne v polohe C-11. Najvýraznejšia inhibícia AChE bola spojená s nitroskupinou na benzoylovom kruhu a jej najvýhodnejšie umiestnenie bolo v *meta* polohe. BuChE najviac inhibovali deriváty s benzoylom substituovaným v polohe 2, pričom najaktívnejší bol derivát s metoxyskupinou. Porovnateľnú aktivitu voči BuChE vykázal aj derivát bez substituentov na benzoyle. Deriváty substituované v polohe 2 na benzoyle boli aktívne aj proti AChE. Substituenty v polohe 2 pravdepodobne bránia voľnej rotácii benzoylovej skupiny a umožňujú vhodnú orientáciu v aktívnom mieste cholínesteráz^{109,110}.

Tabuľka 13: Inhibičná aktivita derivátov haemantamínu proti cholinesterázam

testovaná látka		IC ₅₀ (μM)		zdroj dát
		AChE	BuChE	
1	11- <i>O</i> -acetylhaemantamín	> 100	> 100	109
2	11- <i>O</i> -propionylhaemantamín	> 100	> 100	109
3	11- <i>O</i> -butanoylhaemantamín	> 100	> 100	109
4	11- <i>O</i> -izobutanoylhaemantamín	> 100	> 100	109
5	11- <i>O</i> -pentanoylhaemantamín	> 100	> 100	109
6	11- <i>O</i> -hexanoylhaemantamín	> 100	> 100	109
7	11- <i>O</i> -benzoylhaemantamín	> 100	5,8 ± 0,3	109
8	11- <i>O</i> -(2-metylbenzoyl)haemantamín	18,2 ± 1,3	6,6 ± 1,2	109
9	11- <i>O</i> -(2-metoxybenzoyl)haemantamín	90,0 ± 6,0	3,3 ± 0,4	110
10	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)haemantamín	9,9 ± 0,5	> 100	110
11	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemantamín	13,0 ± 1,0	5,6 ± 0,6	110
12	11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)haemantamín	> 100	26,0 ± 3,0	110
13	11- <i>O</i> -(3-metoxybenzoyl)haemantamín	> 100	75,5 ± 12,5	109
14	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemantamín	4,0 ± 0,3	> 100	110
15	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzoyl)haemantamín	80,0 ± 8,0	42,0 ± 3,4	110
16	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)haemantamín	85,1 ± 6,4	80,2 ± 10,2	109
17	11- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	109
18	11- <i>O</i> -(4-metylbenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	110
19	11- <i>O</i> -(4-etylbenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	110
20	11- <i>O</i> -(4-metoxybenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	110
21	11- <i>O</i> -(4-trifluorometoxybenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	107
22	11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemantamín	14,7 ± 1,8	> 100	109
23	11- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	110
24	11- <i>O</i> -(2,3-dimetylbenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	108
25	11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemantamín	9,9 ± 0,8	> 100	108
26	11- <i>O</i> -(2,6-dimetoxibenzoil)haemantamín	n.	n.	108
27	11- <i>O</i> -(3,4-dimetoxibenzoil)haemantamín	> 100	> 100	110
28	11- <i>O</i> -(3,5-dimetylbenzoyl)haemantamín	> 100	> 100	108
29	11- <i>O</i> -(3,5-dimetoxibenzoil)haemantamín	> 100	> 100	110
30	11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemantamín	12,8 ± 0,5	> 100	108
31	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimetoxibenzoil)haemantamín	> 100	> 100	108
32	LC-70	0,12 ± 0,01	> 100	105
33	LC-73	0,17 ± 0,01	> 100	105
34	apohaemantamín	n.	n.	106
šstandard	galantamín	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	105,107, 108,109,110
	huperzín A	0,03 ± 0,00	> 100	109
	eserín	0,063 ± 0,005	0,13 ± 0,01	110

n. – netestované

Miestom pôsobenia liečiv proti AD je CNS, preto bola testovaná schopnosť aktívnych derivátov (7 - 12, 14, 22) prechádzať hematoencefalickou bariérou (HEB). Na predikciu permeácie bol použitý paralelný test priepustnosti umelej membrány

(PAMPA), ktorým je možné stanoviť pasívnu difúziu látok cez biologické membrány a tiež výpočet logBB, čo je hodnota definovaná ako logaritmický pomer koncentrácie látky v mozgu a v krvi. Získané výsledky z oboch testov permeability naznačujú, že testované deriváty majú potenciál prechádzať cez HEB pasívnou difúziou^{109,110}.

Vybrané deriváty (9, 10, 12, 14, 22) boli podrobené skríningu na inhibičnú aktivitu proti GSK-3 β (Tabuľka 14). Najviac inhiboval tento enzým derivát 11-*O*-(2-metoxybenzoyl)haemantamín (9). V už spomínanej práci Hulcová D. et al. (2018)⁹⁰ bolo preukázané, že GSK-3 β inhibuje aj samotný haemantamín (Tabuľka 5), ale zatiaľ nebola stanovená jeho hodnota IC₅₀ a tak nie je možné porovnať ho s derivátmi.

Tabuľka 14: Inhibičná aktivita derivátov haemantamínu proti GSK-3 β

testovaná látka		GSK-3 β IC ₅₀ (μ M)	zdroj dát
22	11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemantamín	34,8 \pm 0,0	109
12	11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)haemantamín	32,9 \pm 9,8	105
10	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)haemantamín	31,5 \pm 1,9	105
14	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemantamín	31,0 \pm 0,2	105
9	11- <i>O</i> -(2-metoxybenzoyl)haemantamín	26,2 \pm 5,0	105
	SB-415286 ^a	70,0 nM	105

^a štandard

Látky schopné inhibovať POP by mohli mať potenciál v podpornej terapii AD a preto v rámci diplomovej práce Mgr. Zuzany Kavkovej bola snaha testovať 2 pripravené haemantamínové deriváty na ich inhibičnú aktivitu voči tomuto enzýmu. Kvôli zlej rozpustnosti 11-*O*-izobutyrylhaemantamínu sa podarilo zmerať iba 11-*O*-propionylhaemantamín, ktorý vykázal zaujímavú hodnotu¹⁰⁶ (Tabuľka 15). Samotný haemantamín nie je schopný inhibovať POP⁸⁹ a obmena jeho štruktúry aktivitu dramaticky zvýšila. Ostatné haemantamínové deriváty zatiaľ neboli testované.

Tabuľka 15: Inhibičná aktivita haemantamínu a jeho derivátu proti POP

testovaná látka	POP (IC ₅₀ [mM])	zdroj
haemantamín	>100	89
11- <i>O</i> -propionylhaemantamín	0,28 \pm 0,11	106
baikalín ^a	0,19 \pm 0,01	106
berberín ^a	0,14 \pm 0,02	89

^a štandard

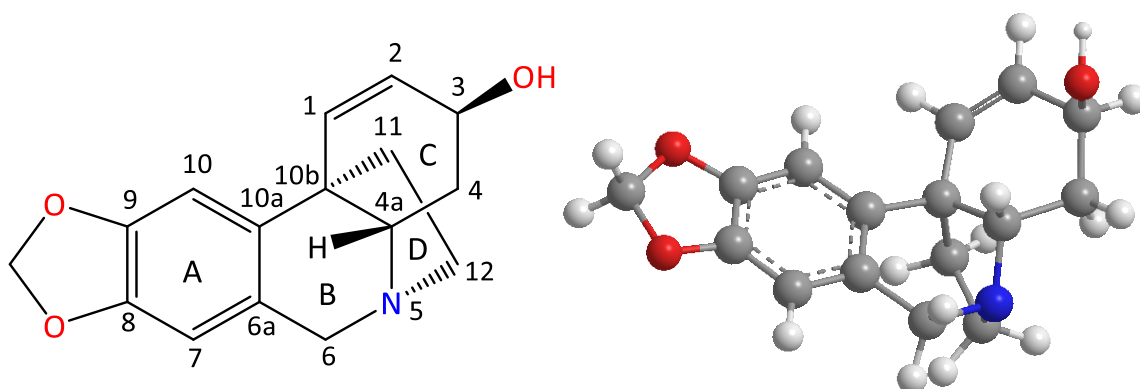
3.4 Alkaloid vittatín

3.4.1 Charakteristika štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností vittatínu

Alkaloid, triviálne pomenovaný ako vittatín, je látka so systematickým názvom (3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-ol a sumárnym vzorcom C₁₆H₁₇NO₃. Bolo mu pridelené CAS registračné číslo 510-69-0¹¹¹. Označovaný je aj synonymami (3β,5α,13β,19α)-1,2-didehydro-krinan-3-ol, (+)-vittatín a (+)-krinín^{111,112}.

Je to žltkastá kryštalická látka s relatívnou molekulovou hmotnosťou 271,31 a teplotou topenia 207 – 208 °C. Jeho pKa je 14,03 ± 0,20¹¹¹. Nositeľom bazických vlastností je terciárny dusík. Špecifická optická otáčavosť vittatínu $[\alpha]_D^{25^\circ}$ (c = 0,1; CHCl₃) má hodnotu +30°¹¹³. Rovnakú absolútnu hodnotu optickej otáčavosti má alkaloid krinín (synonymum (-)-krinín), ktorý je enantiomérom vittatínu¹¹⁴ a teda otáča rovinu polarizovaného svetla v opačnom smere. Ich hodnoty špecifickej optickej otáčavosti sa líšia len znamienkom +/-.

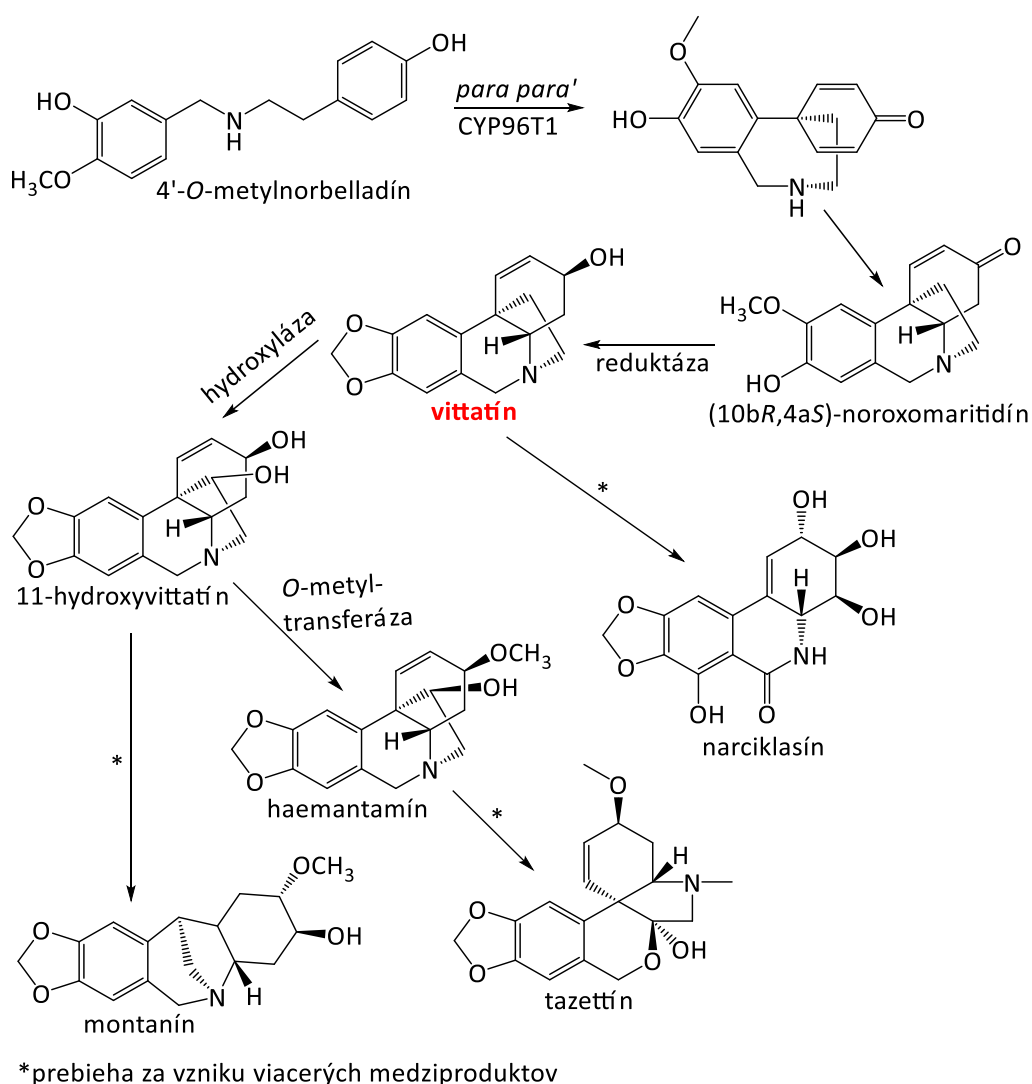
Vittatín je pentacyklický Amaryllidaceae alkaloid, ktorý vychádza zo štruktúry 5,10*b*-etanofenantridínu (Obrázok 19). Etylénový mostík spájajúci atómy N-5 a C-10*b* je orientovaný do polohy α, preto sa vittatín zaraďuje medzi haemantamínové alkaloidy inak označované aj α-krinanové. K aromatickému kruhu A je prikonenzovaný 1,3-dioxolán, kruhy B a D majú spoločný terciárny dusík a kruh C obsahuje jednu dvojitú väzbu medzi uhlíkmi C-1 a C-2. β-orientovaná hydroxyskupina je viazaná na uhlíku C-3.



Obr. 19: Štruktúra vittatínu

3.4.2 Biosyntéza vittatínu

Prekursorom všetkých Amaryllidaceae alkaloidov je norbelladín a to platí aj v prípade vittatínu. Jeho biosyntetická dráha (Obrázok 20) začína metyláciou norbelladínu na 4'-*O*-metylnorbelladín. Ten následne podlieha cyklizácii za prítomnosti enzýmu CYP96T1. Fenolové kruhy sa spájajú v *para-para'* polohe a vzniká noroxomaritidín. Potom dochádza k enzymatickej redukcii oxoskupiny v polohe 3 na hydroxyskupinu a vzniká vittatín, ktorý je prekursorom ďalších alkaloidov.^{45,49}



Obr. 20: Biosyntéza vittatínu a ďalších odvodených štruktúr¹¹⁶

Niekoľkými hydroxylačnými a redukčnými reakciami sa z vittatínu formuje narciklasínový štruktúrny typ. Hydroxyláciou v polohe C-11 vzniká z vittatínu 11-hydroxyvittatín. Modifikáciou 11-hydroxyvittatínu môže vzniknúť pankracín a jeho

O-metyláciou montanín. Ďalšou možnosťou je metylácia 11-hydroxyvittatínu katalyzovaná O-metyltransferázou a vytvorenie haemantamínu, z ktorého postupne vznikajú alkaloidy tazettínového typu^{45,115}.

3.4.3 Výskyt a zdroje vittatínu

Prvýkrát bol vittatín izolovaný z 2-ročných cibúľ rastliny *Hippeastrum vittatum* nazbieraných v Holandsku. Izoloval ho v roku 1956 Hans - G. Boit z Chemického inštitútu Humboldtovej univerzity v Berlíne¹¹⁴. Nachádza sa aj v ďalších druhoch rodu *Hippeastrum*, napríklad v *H. aulicum*¹¹⁷, *H. papilio*¹¹⁸, *H. puniceum*, *H. solandriiflorum*, *H. santacatarina* a *H. breviflorum*¹¹⁹. Na katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové bol skúmaný obsah alkaloidov v čerstvých cibuliach šiestich komerčne dostupných kultivarov rodu *Hippeastrum*. Prítomnosť vittatínu bola potvrdená v piatich kultivároch. Následne bolo izolovaných 5 alkaloidov v čistej forme. Medzi nimi bol aj vittatín získaný z alkaloidového extraktu *Hippeastrum* cv. Double King. Kultivary rodu *Hippeastrum* (zornica) sú veľmi obľúbené ako dekoratívne izbové rastliny. Bežne sú známe pod názvom amaryllis, čo však môže viesť k zámene s druhom *Amaryllis belladonna* (amarylka krásna). Obidva rody majú podobný vzhľad, ale amarylka má plnú stonku a zornica ju má dutú. Existuje mnoho vyšľachtených odrôd *Hippeastrum*, ktoré ponúkajú veľký výber farieb a tvarov kvetov. Tieto kultivary sú väčšinou hybridy vytvorené krížením niekoľkých druhov pochádzajúcich z Južnej Ameriky a južnej Afriky¹²⁰. Vittatín použitý v experimentálnej časti tejto diplomovej práce bol izolovaný z čerstvých cibúľ *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari¹⁴ (Obrázok 21).



Obr. 21: *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari¹⁴

Alkaloid vittatín produkujú aj iné Amaryllidaceae rastliny. Druhy, v ktorých bol identifikovaný a z niektorých následne aj izolovaný sú napríklad *Zephyranthes citrina*⁵⁴, *Zephyranthes robusta*¹¹³, *Zephyranthes grandiflora*¹²¹, *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton⁴⁹, *Narcissus cantabricus*¹²², *Narcissus hedraeanthus*¹²³, *Lycoris aurea*, *Lycoris quangxiensis*¹²⁴, *Amaryllis belladonna*⁹⁵, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*¹²⁵, *Galanthus fosteri*¹²⁶, *Hymenocallis rotata*¹²⁷, *Crinum bulbispermum*¹²⁸, *Crinum yemense*⁹⁹ a *Crinum scillifolium*¹²⁹.

Obsah vittatínu v jednotlivých častiach rastliny sa u rôznych rodov a druhov líši. Chemický profil tureckých druhov snežienok *Galanthus gracilis* a *Galanthus krasnovii* ukázal, že vittatín sa nachádzal v cibuliach týchto rastlín, zatiaľ čo v nadzemných častiach nebol prítomný¹³⁰. Pri analýze druhu *Pancratium canariense* bol zistený najvyšší obsah vittatínu v alkaloidovom extrakte z listov a plodov¹³¹. V rastline *Lycoris radiata* sa vyskytuje v cibuliach⁷² aj v kvetoch¹³². V niektorých prípadoch sa podarilo izolovať vittatín z extraktov z celých rastlín alebo z nadzemných častí, no väčšinou bol získaný z cibúľ, kde býva obsah AA zvyčajne najvyšší. Obsah vittatínu v rastlinách sa môže meniť aj v závislosti na ich vegetačnom období. V rastline *Amaryllis belladonna* z Egypta bol zistený najvyšší obsah vittatínu počas obdobia kvitnutia¹³³. Dôležitým faktorom pre syntézu obsahových látok sú tiež podmienky, v ktorých rastliny rastú.

Kvôli zvýšenému dopytu po AA a obmedzenej dostupnosti rastlinných zdrojov je potrebné hľadať iné alternatívy pre ich udržateľnú produkciu. Jednou z možností je kultivácia rastlinných explantátov *in vitro*. Výskum v tejto oblasti sa zatiaľ zameriava predovšetkým na alkaloid galantamín používaný v terapii¹³⁴. V rámci výskumov zaoberajúcich sa kultúrami Amaryllidaceae rastlín boli *in vitro* vypestované aj druhy obsahujúce alkaloid vittatín, a to napríklad *Hippeastrum vittatum*¹³⁵ a *Rhodophiala pratensis*¹³⁶. Ďalšou možnosťou získania AA je ich chemická syntéza. Vittatín bol prvýkrát pripravený stereoselektívnou syntézou v roku 2004 z D-glukózy¹³⁷. Dnes je známych už viacero spôsobov jeho prípravy^{138,139,140}.

3.4.4 Biologická aktivita vittatínu

Keďže vittatín patrí medzi haemantamínové alkaloidy, z ktorých mnohé sa vyznačujú výraznou protinádorovou aktivitou, bol podrobený testom na cytotoxicitu vo viacerých štúdiách.

McNulty J. et al. (2009)¹⁰¹ skúmali schopnosť α -krinanových alkaloidov a ich derivátov indukovať apoptózu u línie buniek ľudskej leukémie (Jurkat). Zistilo sa, že vittatín po 24 hod inkubácii významne zvyšoval mieru apoptózy. Po zafarbení buniek farbivom Hoechst boli pozorované charakteristické znaky apoptózy, kondenzované jadrá buniek. Ďalším dôkazom navodenia apoptózy bol presun fosfatidylserínu z vnútornej na vonkajšiu stranu membrány. Vittatín vykázal účinok v závislosti na dávke. Po 24 hodinách pri koncentrácii 20 μ M spôsobil apoptózu približne u 65 % buniek Jurkat. Pri koncentrácii 10 μ M po 18 hodinách vyvolal aktiváciu kaspázy-3, čo svedčí o mechanizme jeho cytotoxického pôsobenia. Vittatín indukuje apoptózu u Jurkat buniek prostredníctvom aktivácie kaspáz¹⁰¹.

V štúdií Al Shamari L. et al. (2020)¹²⁰ bola hodnotená protinádorová aktivita vittatínu, montanínu a hippeastrínu. Testovanie sa uskutočnilo na línii ľudských rakovinových buniek rôzneho histotypu (Jurkat - akútna T-bunková leukémia, MOLT-4 - akútna lymfoblastická leukémia, A549 - karcinóm pľúc, HT-29 - kolorektálny adenokarcinóm, PANC-1 - epitelioidný karcinóm pankreasu, A2780 - karcinóm vaječníkov, HeLa - adenokarcinóm krčka maternice, MCF-7 - adenokarcinóm prsníka, SAOS-2 - osteosarkóm). Kvôli stanoveniu toxicity proti zdravým bunkám boli alkaloidy testované aj na línii normálnych pľúcnych fibroblastov MRC-5. Stanovenie cytotoxickej aktivity bolo vykonané pomocou testu metabolickej aktivity s využitím činidla WST-1 (4-[2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)tetrazól-3-ium-5-yl]benzén-1,3-disulfonát sodný) a ako štandard poslužil doxorubicín. Vittatín bol z testovaných alkaloidov najmenej aktívny (Tabuľka 16). Vykázal len veľmi slabé antiproliferačné vlastnosti voči nádorovým bunkám, ale aj voči zdravým bunkám¹²⁰.

Tabuľka 16: Cytotoxická aktivita vittatínu, montanínu a hippeastrínu¹²⁰

bunková línia	viabilita buniek po 48 hod (%)			
	montanín	vittatín	hippeastrín	doxorubicín
	c = 10 µM			c = 1 µM
Jurkat	4 ± 1	91 ± 3	40 ± 1	2 ± 0
MOLT-4	2 ± 1	92 ± 12	50 ± 20	0 ± 0
A549	23 ± 2	80 ± 4	69 ± 4	11 ± 5
HT-29	36 ± 3	84 ± 5	66 ± 5	47 ± 4
PANC-1	29 ± 5	84 ± 4	84 ± 5	78 ± 3
A2780	26 ± 7	98 ± 5	50 ± 10	5 ± 1
HeLa	18 ± 2	100 ± 5	86 ± 5	11 ± 6
MCF-7	12 ± 2	79 ± 2	70 ± 21	37 ± 3
SAOS-2	25 ± 4	79 ± 6	83 ± 2	17 ± 5
MRC-5	22 ± 11	83 ± 8	69 ± 10	29 ± 3

Podobné výsledky boli pozorované aj v práci Silva A. F. S. et al. (2008)¹⁴¹, ktorá hodnotila cytotoxicitu vittatínu a montanínu izolovaných z rastliny *Hippeastrum vittatum*. Protinádorová aktivita bola hodnotená proti bunkovým líniam HT29 (nemalobunkový adenokarcinóm hrubého čreva), NCI-H460 (karcinóm pľúc), RXF393 (karcinóm obličiek), MCF7 (rakovina prsníka) a OVCAR3 (epiteliálny ovariálny karcinóm). Štandard nebol uvedený. Vittatín rovnako aj v tejto štúdii vykázal oveľa nižšiu aktivitu ako montanín¹⁴¹ (Tabuľka 17).

Tabuľka 17: Cytotoxická aktivita alkaloidov izolovaných z *Hippeastrum vittatum*¹⁴¹

alkaloid	aktivita proti bunkovým líniam IC ₅₀ [µg/ml]				
	HT29	H460	RXF393	MCF7	OVCAR3
montanín	0,71 ± 0,10	0,57 ± 0,57	0,65 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,84 ± 0,11
vittatín	21,91 ± 1,61	15,88 ± 3,28	29,57 ± 12,66	NT	NT

aktivita: < 5 silná, 5 - 20 mierna, 20 - 50 slabá, > 50 neaktívne; NT: nebolo testované

Ďalšou testovanou biologickou aktivitou vittatínu bola schopnosť inhibovať ľudské cholínesterázy a POP. Výsledky meraní Al Shammari L. et al. (2020) ukázali, že vittatín cholínesterázy neinhibuje (Tabuľka 18). Nepreukázal inhibičnú aktivitu ani voči POP¹⁴.

V štúdií Kulhánková A. et al. (2013)⁸⁷ vittatín takisto nebol aktívny voči HuAChE ani HuBuChE (Tabuľka 2).

Tabuľka 18: hAChE, hBuChE a POP inhibičná aktivita vybraných alkaloidov izolovaných z *Hippeastrum* cv. Ferrari¹⁴

alkaloid	hAChE IC ₅₀ (μM)	hBuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)
montanín	>100	> 100	>500
1,2- <i>O,O'</i> -diacetyl-dihydrolykorín	>100	68 ± 3	n.m.
vittatín	>100	> 100	> 500
11-hydroxyvittatín	>100	> 100	> 500
zefyrantín	>100	>100	142 ± 10
galantamín ^a	1,7 ± 0,1	42 ± 1	> 200
berberín ^a	0,7 ± 0,1	30,7 ± 3,5	142 ± 21
Z-pro-prolinal ^a	n.d.	n.d.	2,75 x 10 ⁻³

^a štandard; n.m- namerané, kvôli limitovanému množstvu; n.d.- nestanovené

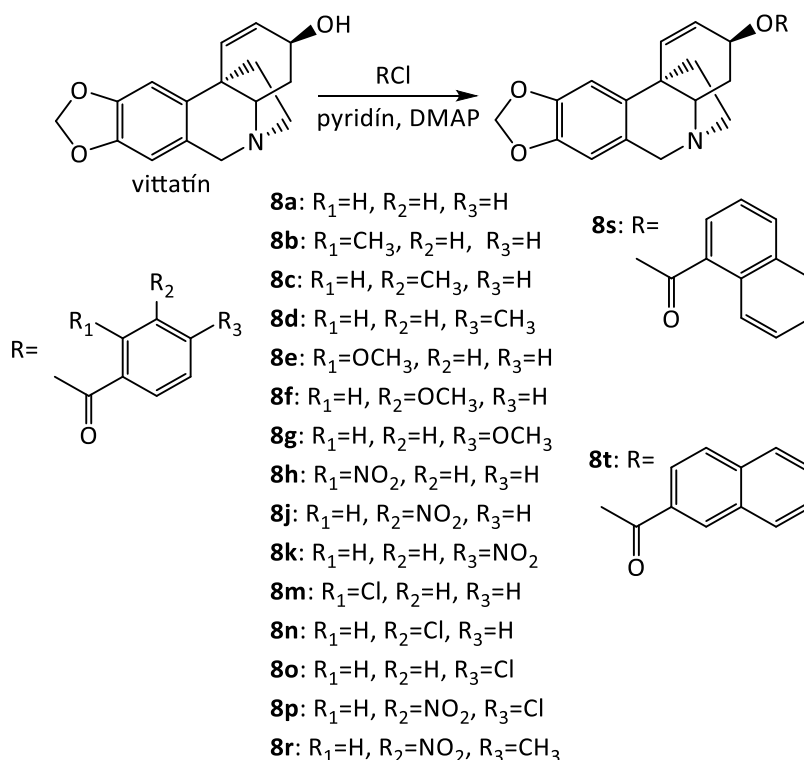
Antibakteriálne a antimykotické účinky vittatínu boli objavené pri skríningu alkaloidov izolovaných z rastliny *Amaryllis belladonna*. Testovanie prebiehalo difúznou metódou na agare. Vittatín v koncentrácii 3mg/ml inhiboval množenie grampozitívnej baktérie *Staphylococcus aureus* (inhibičná zóna = 19 mm) a gramnegatívnej baktérie *Escherichia coli* (inhibičná zóna = 22 mm). Antimykotický účinok vittatínu v koncentrácii 3 mg/ml bol preukázaný voči kvasinke *Candida albicans* (inhibičná zóna = 17 mm). Hodnoty štandardov ampicilínu a klotrimazolu neboli v článku uvedené¹³³.

3.4.5 Deriváty vittatínu

Viacere aromatické estery haemantamínu pripravené na Katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové preukázali významnú inhibičnú aktivitu proti cholinesterázam, a preto bola snaha pripraviť deriváty ďalších alkaloidov haemantamínového štruktúrneho typu. Na tento účel bol vybraný vittatín, ktorý sa podarilo izolovať z *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari v dostatočnom množstve. Na rozdiel od haemantamínu má vittatín v polohe C-3 namiesto CH₃O- skupiny viazanú OH- skupinu a na C-11 nemá OH- skupinu, ale iba vodík. Zatiaľ boli publikované údaje o príprave a biologickej aktivite 17 aromatických derivátov vittatínu, a to v článku

Al Shammari L. et al. (2020)¹⁴ a v diplomovej práci Mgr. Ivy Valachovej¹⁵. V dostupných odborných informačných zdrojoch neboli nájdené iné publikácie týkajúce sa syntézy derivátov alkaloidu vittatínu.

Modifikácia štruktúry vittatínu prebiehala na OH- skupine v polohe C-3 reakciou s rôzne substituovanými benzoylchloridmi alebo nesubstituovanými naftoylchloridmi za vzniku príslušných esterov (Obrázok 22).



Obr. 22: Príprava derivátov vittatínu (8a – 8r)^{14,15}

Ich inhibičná aktivita proti ľudským cholinesterázam bola testovaná Ellmanovou metódou (Tabuľka 19). Podobne ako u aromatických derivátov haemantamínu, najvýznamnejšiu aktivitu voči AChE preukázal derivát obsahujúci nitroskupinu v polohe 3 na benzoylovej časti štruktúry, 3-O-(3-nitrobenzoyl)vittatín (8j), s hodnotou IC₅₀ = 12 ± 0 μM. Zároveň sa vyznačoval aj miernou aktivitou proti BuChE. Pridanie ďalšieho substituentu do polohy 4 na benzoyle v prípade derivátov 8p a 8r spôsobilo pokles účinku proti AChE a stratu aktivity proti BuChE. Rovnako aj presunutie nitroskupiny do polohy 2 na benzoyle v deriváte 8h výrazne potlačilo aktivitu voči AChE, ale naopak dramaticky zvýšilo účinok proti BuChE.

Hodnotenie inhibičnej aktivity voči BuChE prinieslo oveľa zaujímavejšie výsledky. Okrem derivátov 8g, 8o, 8p a 8r boli všetky ostatné viac či menej aktívne. Najvýraznejší

účinok vykazovali 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatín (8h) ($IC_{50} = 1,4 \pm 0,1 \mu M$), 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatín (8m) ($IC_{50} = 5,4 \pm 0,1 \mu M$) a 3-*O*-(2-metylbenzoyl)vittatín (8b) ($IC_{50} = 8,0 \pm 0,1 \mu M$). Tieto tri deriváty pôsobili selektívne voči BuChE. Substitúcia benzoylu v polohe *orto* sa zdá byť z hľadiska inhibície BuChE najvýhodnejšia, pričom najlepší vplyv na účinok mala nitroskupina. Prítomnosť substituentu buď v *meta* alebo v *para* polohe výrazne znížila aktivitu.

Tabuľka 19: Anticholinesterázová aktivita derivátov vittatínu^{14,15}

	testovaná látka	<i>hAChE</i> % inhibícia c = 100 μM	<i>hAChE</i> IC_{50} (μM) ^a	<i>hBuChE</i> % inhibícia c = 100 μM	<i>hBuChE</i> IC_{50} (μM) ^a	SI ^b
	vittatín	9 ± 1	> 100	6 ± 1	> 100	n.c.
8a	3- <i>O</i> -benzoylvittatín	30 ± 3	> 100	84 ± 3	17 ± 3	> 5,9
8b	3- <i>O</i> -(2-metylbenzoyl)vittatín	17 ± 0	> 100	84 ± 1	8,0 ± 0,1	> 12,5
8c	3- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)vittatín	28 ± 0	> 100	65 ± 1	44 ± 1	> 2,3
8d	3- <i>O</i> -(4-metylbenzoyl)vittatín	8 ± 2	> 100	60 ± 1	57 ± 0	> 1,8
8e	3- <i>O</i> -(2-metoxibenzoyle)vittatín	23 ± 1	> 100	73 ± 2	22 ± 0	> 4,6
8f	3- <i>O</i> -(3-metoxibenzoyle)vittatín	35 ± 1	> 100	58 ± 2	67 ± 0	> 1,5
8g	3- <i>O</i> -(4-metoxibenzoyle)vittatín	37 ± 2	> 100	46 ± 2	> 100	n.c.
8h	3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)vittatín	66 ± 1	60 ± 2	99 ± 1	1,4 ± 0,1	42,9
8j	3- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)vittatín	75 ± 1	12 ± 0	60 ± 2	56 ± 1	0,2
8k	3- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)vittatín	26 ± 1	> 100	68 ± 1	22 ± 0	> 4,6
8m	3- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)vittatín	25 ± 1	> 100	93 ± 3	5,4 ± 0,1	> 18,5
8n	3- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)vittatín	43 ± 3	> 100	62 ± 1	36 ± 2	> 2,8
8o	3- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)vittatín	23 ± 6	> 100	42 ± 3	> 100	n.c.
8p	3- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatín	73 ± 0	17,0 ± 0,4	30 ± 1	> 100	n.c.
8r	3- <i>O</i> -(4-metyl-3-nitrobenzoyl)vittatín	57 ± 1	37 ± 0	38 ± 0	> 100	n.c.
8s	3- <i>O</i> -(1-naftoyl)vittatín	6 ± 0	> 100	54 ± 1	29,7 ± 0,8	> 3,4
8t	3- <i>O</i> -(2-naftoyl)vittatín	17 ± 1	> 100	63 ± 1	15,4 ± 0,4	> 6,5
	galantamín ^c	—	1,7 ± 0,1	—	42 ± 1	0,1
	eserín ^c	—	0,063 ± 0,012	—	0,13 ± 0,01	0,5

^a priemerná hodnota ± štandardná odchýlka z troch nezávislých meraní, každé sa uskutočnilo trojmo; ^b index selektivity pre *hBuChE* = pomer *hAChE* IC_{50} /*hBuChE* IC_{50} ; ^c štandard; n.c. - nebolo počítané

Rovnaké vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou boli odhalené u derivátov haemantamínu, kde bola taktiež najsilnejšia inhibícia BuChE spojená so substitúciou v *orto* polohe, rozdiel bol však v povahe substituentu. V sérii haemantamínu bol najaktívnejší derivát s metoxyskupinou a v sérii vittatínu derivát s nitroskupinou. Pre podrobnejšie vysvetlenie SAR je potrebné uskutočniť dokingové štúdie širšej škály derivátov haemantamínu a vittatínu¹⁴.

U najaktívnejších derivátov vittatínu 8b, 8h a 8m sa hodnotila metódou PAMPA a výpočtom logBB ich schopnosť prechádzať cez HEB. Podľa výsledkov môžu byť distribuované do CNS pasívnou difúziou¹⁴.

V diplomovej práci Mgr. Ivy Valachovej bola u derivátov 8b a 8m stanovená schopnosť inhibovať agregáciu β -amyloidu pri koncentrácii 50 μ M. V porovnaní so štandardom doxycyklínom, ktorého hodnota pri rovnakej koncentrácii dosahovala okolo 100 %, mali deriváty len mierny inhibičný účinok s hodnotami $44,92 \pm 5,03$ % (8b) a $32,58 \pm 3,62$ % (8m)¹⁵.

Protinádorová aktivita bola testovaná u 12 derivátov vittatínu (8b – 8f, 8j – 8m, 8p – 8t), a to na 9 nádorových bunkových líniiach (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a 1 nenádorovej (MRC-5). Významnú aktivitu vykázal derivát 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatín (8p) proti 4 nádorovým líniiam (A549, HT-29, HeLa, MCF-7), ale bol toxický aj na zdravé bunky. Cytotoxický potenciál mal tiež derivát 3-*O*-(2-naftoyl)vittatín (8t) voči bunkovej línii HT-29 bez toxického účinku na zdravé bunky, čo z neho robí potenciálneho kandidáta pre ďalší výskum. U ostatných vittatínových derivátov neboli zistené významnejšie cytotoxické účinky¹⁵.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie a materiál

4.1.1 Rastlinný materiál

Alkaloid vittatín bol izolovaný z čerstvých cibúľ rastliny *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari od spoločnosti Lukon Glads (Sadská, ČR). Botanickú identifikáciu rastliny vykonal prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a jej vzorka je uložená v herbári Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej pod označením CUFPH-16130/AL-562.

4.1.2 Rozpúšťadlá a chemikálie

- 1M roztok suchého HCl v Et₂O
- 2,3-difluoro-4-metylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-furoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3,5-dimetylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-bromo-5-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-bromobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-furoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-[2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)tetrazól-3-ium-5-yl]benzén-1,3-disulfonát sodný (Roche) (WST-1)
- 4-fluorobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-chlorobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-metoxybenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- acetonitril, ≥ 99% (Sigma-Aldrich) (MeCN)
- acetyltiocholín jodid, p. a. (Sigma Aldrich, Praha)
- benzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- butyryltiocholín jodid, p. a. (Sigma Aldrich, Praha)
- deuterovaný chloroform, ≥ 99% (Sigma-Aldrich) (CDCl₃)
- dietylamin, p. a. (Penta) (Et₂NH)
- dietyléter, p. a. (Penta) (Et₂O)
- dichlórmetán, p. a. (Penta) (CH₂Cl₂)

- dimethylaminopyridín, p. a. (Penta) (DMAP)
- dimetylsulfoxid, p. a. (Sigma Aldrich, Nemecko) (DMSO)
- etanol 95%, č. (Penta) (EtOH)
- chlorid sodný, p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- chloroform, č. (Penta) (CHCl₃)
- kyselina 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoová), ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (DTNB)
- kyselina chlorovodíková, 2% roztok (Penta) (HCl)
- kyselina sírová, 96% (Penta) (H₂SO₄)
- pyridín, p. a. (Penta)
- síran sodný bezvodý, p. a. (Penta) (Na₂SO₄)
- toluén, p. a. (Penta) (To)
- uhličitan sodný, 10% roztok (Penta) (Na₂CO₃)

4.1.3 Detekčné činidlo

- Dragendorffovo činidlo (podľa Muniera):

- 1) Najskôr sa pripraví roztok A (zásaditý dusičnan bizmutitý 1,7 g, kyselina vínna 20,0 g, destilovaná voda 80,0 g) a roztok B (jodid draselný 16,0 g, destilovaná voda 40,0 g).
- 2) Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1:1 vznikne zásobný roztok.
- 3) Detekčné činidlo sa pripraví zmiešaním 5 ml zásobného roztoku a 10 g kyseliny vínnej v 50 g destilovanej vody.
- 4) Zásobné aj detekčné roztoky sa uchovávajú pri teplote 2 – 8 °C.

4.1.4 Mobilná fáza pre analytickú a preparatívnu TLC

$$S_1 = \text{To} : \text{Et}_2\text{NH} (9:1)$$

4.1.5 Stacionárna fáza pre analytickú a preparatívnu TLC

- hliníkové dosky TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) s rozmerom 10 × 20 cm pokryté vrstvou silikagélu o hrúbke 0,2 mm s fluorescenčným indikátorom

4.2 Metódy

4.2.1 Izolácia alkaloidu vittatínu

Alkaloid vittatín bol získaný izoláciou z cibúľ *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari na Katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové v rámci dizertačnej práce Lattifah Al Shammari a podrobnosti k fytochemickej práci možno nájsť v článku Al Shammari L. et al. (2020)¹⁴.

Na izoláciu bolo použitých približne 25 kg čerstvých cibúľ pomletých na častice menšie než 5 mm. Tento rastlinný materiál spolu s dvojnásobným množstvom 95% EtOH bol 3× extrahovaný varom pod spätným chladičom vo vodnom kúpeli po dobu 30 min. Spojením jednotlivých extraktov a ich zahustením na vákuovej odparke vzniklo 420 g surového extraktu, ktorý bol okyslený 1 l 2% HCl na pH 1 – 2 a nariedený vodou na objem 5 l. Potom nasledovala krátka sonikácia a filtrácia cez vrstvu kremeliny. Filtračná vrstva bola premytá malým množstvom 2% HCl. Kyslý filtrát bol odtučený dietyléterom (3× 1,5 l) a následne alkalizovaný na pH 9 – 10 10% roztokom Na₂CO₃. Po alkalizácii nasledovala extrakcia do chloroformu (6× 300 ml). Chloroformové vrstvy boli vysušené bezvodým Na₂SO₄, spojené a odparené na vákuovej odparke. Vzniklo 29,46 g koncentrovaného alkaloidného extraktu.

Extrakt bol separovaný na frakcie stĺpcovou chromatografiou za použitia oxidu hlinitého (Al₂O₃; 1200 g) ako stacionárnej fázy a zmesi CHCl₃ a EtOH (99:1 – 0:100) ako fázy mobilnej. Získané frakcie, ktoré mali na základe GC-MS a TLC analýzy rovnaký alkaloidný profil, boli spojené a vzniklo 15 konečných frakcií. Jednotlivé frakcie boli následne opakovane delené stĺpcovou chromatografiou alebo preparatívnou tenkovrstvovou chromatografiou.

Podľa výsledkov GC-MS analýzy bola na izoláciu alkaloidu vittatínu vybraná frakcia číslo 3 s hmotnosťou 3,16 g. Po jej prečistení kryštalizáciou zo zmesi CHCl₃ : EtOH (1:1) boli získané 2 g čistého vittatínu. NMR, GC-MS analýzou a zmeraním optickej otáčavosti bola potvrdená čistota a štruktúrna identifikácia tohto alkaloidu.

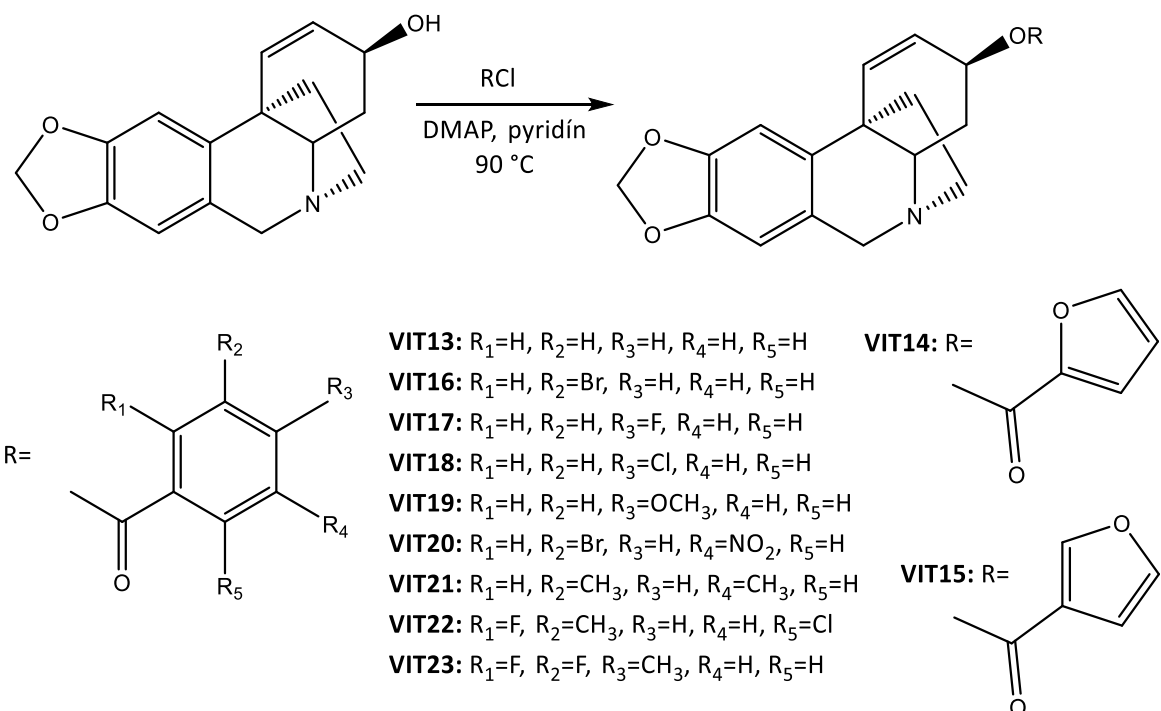
4.2.2 Príprava polosyntetických derivátov vittatínu

V skúmavke so zábrusom bolo rozpustených približne 30 mg (0,11 mmol) vittatínu (VIT 13 – VIT 19) alebo cca 20 mg (0,07 mmol) vittatínu (VIT 20 – VIT 23) v 2 ml suchého pyridínu. Následne bol pridaný acylchlorid (RCl) v miernom nadbytku podľa vypočítaného ekvimolárneho množstva na základe uvedenej rovnice.

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

- $m_{(RCl)}$ = hmotnosť acylchloridu [g]
- $m_{(VIT)}$ = hmotnosť vittatínu [g]
- $M_{(RCl)}$ = molárna hmotnosť acylchloridu [g/mol]
- $M_{(VIT)}$ = molárna hmotnosť vittatínu [g/mol]

Nakoniec bolo pridané katalytické množstvo DMAP. Do reakčnej zmesi bolo vložené magnetické miešadlo, skúmavka bola uzavretá sklenenou zátkou a umiestnená do olejového kúpeľa na elektromagnetickej miešačke s ohrevom. Reakcie prebiehali za stáleho miešania pri teplote 90 °C po dobu 12 h. Priebeh reakcie a zreagovanie východzej látky boli monitorované pomocou analytickej TLC. Reakčná schéma prípravy derivátov je znázornená na Obrázku 23. Po ukončení reakcie bol z produktu odľúkaný suchý pyridín.



Obr. 23: Reakčná schéma prípravy derivátov vittatínu

4.2.2.1 Analytická tenkovrstvová chromatografia

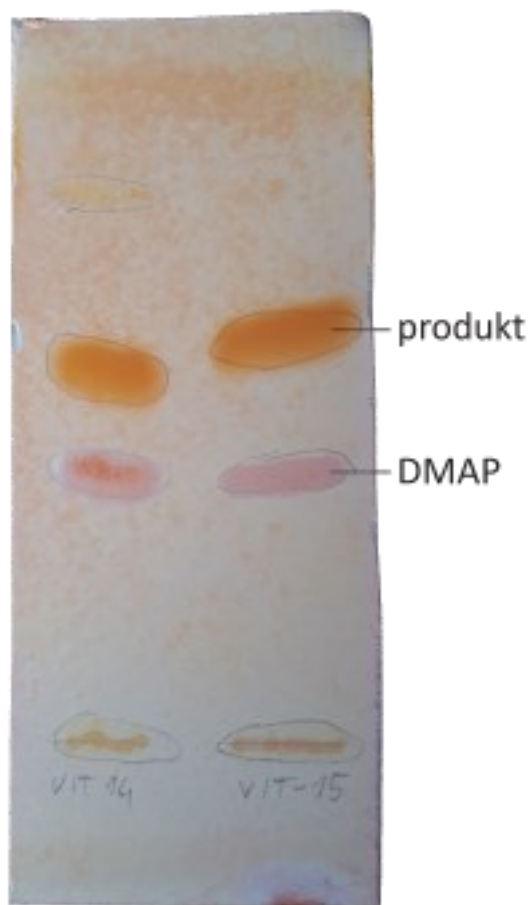
Analytickou TLC bol kontrolovaný priebeh reakcií. Na dosku s rozmerom 5 × 10 cm bola približne 1,5 cm od kratšieho okraja vyznačená línia štartu a na ňu bol kapilárou nanesený vittatín, produkt reakcie a katalyzátor reakcie DMAP (Obrázok 24). Vyvíjanie dosiek prebiehalo v nasýtenej chromatografickej komore za použitia mobilnej fázy S_1 a následne boli dosky v digestore vysušené pomocou fénu. Zóny na chromatograme boli detegované najskôr pod UV lampou žiarením s vlnovou dĺžkou 254 nm (Obrázok 25) a potom postrekom Dragendorffovým činidlom, ktoré farbí alkaloidy do oranžova až červenooranžova (Obrázok 26).



Obr. 24: Analytická TLC



Obr. 25: Detekcia na TLC chromatograme pod UV žiarením



Obr. 26: Detekcia na TLC chromatograme postrekom Dragendorffovym činidlom

4.2.2.2 Preparatívna tenkovrstvová chromatografia

Táto metóda bola použitá na oddelenie produktu od ďalších zložiek reakcie. Produkt reakcie zbavený suchého pyridínu bol rozpustený v malom množstve CHCl_3 a postupne nanášaný chromatografickým perom na 4 až 5 dosiek o veľkosti 10×20 cm v línii 1,5 cm od spodného (dlhšieho) a asi 1 cm od bočných (kratších) okrajov. Po odparení rozpúšťadla boli dosky vložené do vopred nasýtenej chromatografickej komory a vyvíjané v mobilnej fáze S_1 . Vyvíjanie v komore prebehlo podľa potreby pri niektorých produktoch viackrát pre lepšie oddelenie jednotlivých zón. Následne boli dosky vysušené v digestore fénom alebo samovoľne do úplného odparenia mobilnej fázy. Zóny s produktom detegované pod UV žiarením boli označené separačnou ihlou a špachtličkou mechanicky separované z dosky.

4.2.2.3 Elúcia, odparovanie a sušenie

Zóny získané z preparatívnej TLC boli premývané v kolóne cez vrstvu vaty zmesou EtOH a CHCl₃ v pomere 1:1.

Na odparenie zmesi rozpúšťadiel bola použitá rotačná vákuová odparka Heidolph Laborota 4000. Odparovanie prebiehalo vo vodnom kúpeli pri teplote 60 °C.

Následne boli pripravené deriváty dosušené v exsikátore s podtlakom. Funkciu sušiacej látky plnil silikagél vo forme perál.

4.2.3 Štruktúrna analýza derivátov vittatínu

Pripravené deriváty boli identifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením (ESI-HRMS), nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) a zmeraním optickej otáčavosti.

4.2.3.1 ESI-HRMS analýza

Meranie spektier hmotnostnou spektrometriou s vysokým rozlíšením bolo realizované na Katedre analytickej chémie, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej a analýzu vykonala prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Táto metóda bola použitá na identifikáciu pripravených derivátov. Deteguje molekuly prevedené na ióny podľa pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Spektrá boli namerané hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením Synapt G2-Si Q-TOF (Waters) s ionizáciou elektrosprejom v kladnom móde a technológiou analyzátoru kvadrupól Time-of-Flight kombinovaným s UHPLC systémom Acquity I-Class (Waters). Vzorky boli merané v roztoku MeCN. Namerané hodnoty m/z boli porovnané s teoretickými. Tieto hodnoty sa nesmú odlišovať viac než rádovo v tisícinach.

4.2.3.2 NMR analýza

Štruktúrna analýza pripravených derivátov pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie bola vykonaná na Katedre organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej. NMR spektrá namerali a interpretovali doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. a Mgr. Jana Maříková, Ph.D.

Vzorky boli analyzované pri teplote 25 °C v roztoku CDCl₃ spektrometrom VNMR S500, ktorý pracoval pri frekvencii 500 MHz pre ¹H jadrá a pri frekvencii 125 MHz pro ¹³C

jadrá. Na ožarovanie a detekciu signálov bola použitá širokopásmová dvojkanálová gradientová sonda OneNMR s reguláciou teploty. Chemické posuny δ boli merané ako hodnoty pars per milion (ppm) a boli vzťahované k štandardu TMS (tetrametylsilánu) pomocou zvyškového signálu rozpúšťadla. Chemický posun pre CDCl_3 má u atómov ^1H hodnotu $\delta = 7,26$ ppm a u atómov ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Poradie nameraných dát je nasledovné: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^1H NMR spektier, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletu dubletu, td = triplet dubletu, m = multiplet, bs = široký singlet), integračná konštanta J (Hz).

4.2.3.3 Meranie optickej otáčavosti

Optická otáčavosť bola meraná na automatickom polarimetri ADP 220 BS v roztokoch derivátov pri teplote $24\text{ }^\circ\text{C}$. Ako rozpúšťadlo bol použitý chloroform. Špecifická otáčavosť bola následne vypočítaná podľa uvedeného vzorca:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

α - nameraná optická otáčavosť [$^\circ$]

t - teplota merania = $24\text{ }^\circ\text{C}$

D - vlnová dĺžka D-línie sodíkového svetla = $589,3\text{ nm}$

c - koncentrácia meraného derivátu alkaloidu [mg/ml]

l - dĺžka kvety = $0,5\text{ dm}$

4.2.4 Meranie biologickej aktivity pripravených derivátov vittatínu

4.2.4.1 Príprava hydrochloridov derivátov

Za účelom zvýšenia rozpustnosti boli pripravené deriváty vittatínu prevedené na hydrochloridy, aby bolo možné testovanie ich biologickej aktivity.

Na prípravu sú potrebné bezvodé rozpúšťadlá CH_2Cl_2 , Et_2O a 1 M roztok suchého HCl v Et_2O . Tento roztok sa pripravuje pridaním 96% kyseliny sírovej pomaly po kvapkách k chloridu sodnému, vznikajúci chlorovodík sa absorbuje do dietyléteru. Použitelnosť

roztoku je 2 dni. Rozpúšťadlá a roztok pripravila Mgr. Eliška Kohelová na Katedre farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej.

Navážka derivátu bola najskôr rozpustená aspoň v desaťnásobnom množstve bezvodého Et₂O. Ak sa nerozpúšťa, primiešava sa ešte čo najmenšie potrebné množstvo CH₂Cl₂. Následne bol pridávaný 1 M roztok HCl v Et₂O až pokiaľ sa pH zmesi zmenilo na kyslé aby bola na hydrochlorid prevedená celá navážka derivátu. Vznik hydrochloridu signalizovalo vytvorenie bieleho zákalu v skúmavke. Zo zmesi sa odparilo rozpúšťadlo vo vodnom kúpeli pri teplote 40 °C odfúkaním prúdom vzduchu. Potom bolo nutné znova pridať bezvodý Et₂O a odpariť ho, kvôli odstráneniu zvyšku nadbytočného HCl a tento postup zopakovať ešte 2-krát. Hydrochlorid bol nakoniec vysušený v exsikátore s perlami silikagélu pripojenom na vákuum.

4.2.4.2 Stanovenie inhibičnej aktivity voči AChE a BuChE

Inhibičnú aktivitu derivátov vittatínu voči AChE a BuChE stanovila PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. na Katedre farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej.

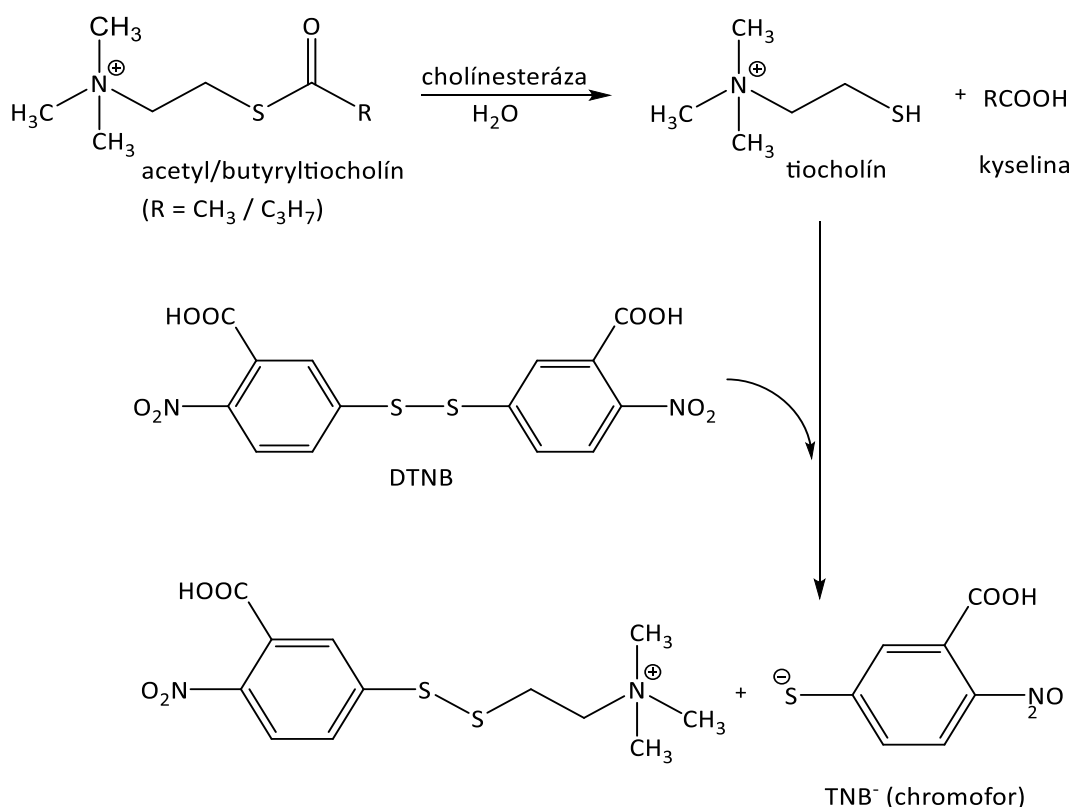
Stanovenie inhibičnej aktivity prebiehalo Ellmanovou metódou¹⁴² s využitím rekombinantných ľudských enzýmov AChE a BuChE pripravených na Katedre chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Hradec Králové. Táto metóda je spektrofotometrická. Hodnoty absorbancie boli namerané pomocou spektrofotometra Synergy™ HT Multi Detection Microplate Reader.

Pre každú meranú látku bolo do 6 jamiek mikrotitračnej doštičky napipetovaných 8,3 µl roztoku enzýmu, 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl roztoku testovaného derivátu v DMSO v rôznych koncentráciách. Do poslednej jamky bol napipetovaný čistý DMSO ako slepá vzorka. Po premiešaní a 5 minútach inkubácie pri teplote 37 °C bolo pridaných 33,3 µl roztoku substrátu cholínesterázy (acetyltiocholín jodid alebo butyryltiocholín jodid) v koncentrácii 10 mM, čím bola odštartovaná enzymatická hydrolýza. Jej podstatou je rozklad substrátu na tiocholín a kyselinu (Obrázok 27). Následne prebiehala reakcia tiocholínu s DTNB, pri ktorej vzniká farebný produkt TNB⁻ (5-merkaptó-2-nitrobenzoátový anión).¹⁴³ Nárast absorbancie vznikajúceho TNB⁻ (ΔA) bol meraný pri vlnovej dĺžke 412 nm

pri 37 °C po dobu 1 minúty. Následne bola vypočítaná percentuálna inhibícia cholínesteráz podľa vzorca:

$$\%I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}} \right)$$

kde ΔA_{Bl} znamená nárast absorbancie slepej vzorky a ΔA_{Sa} je nárast absorbancie vzorky s danou koncentráciou. Najskôr bolo vykonané screeningové meranie látok pri koncentrácii 100 μ M. U derivátov s inhibičnou aktivitou vyššou než 50 % bola stanovená hodnota IC_{50} (stredná inhibičná koncentrácia). Pre meranie IC_{50} látky boli zvolené vhodné koncentrácie podľa screeningu. Následne boli hodnoty IC_{50} vypočítané pomocou programu GraphPad Prism (verzia pre Windows; výrobca GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Namerané hodnoty boli porovnané s hodnotami štandardu. Ako štandard bol zvolený alkaloid galantamín. Ďalšie informácie o tejto metóde sú uvedené v publikovanej literatúre.¹⁴⁴

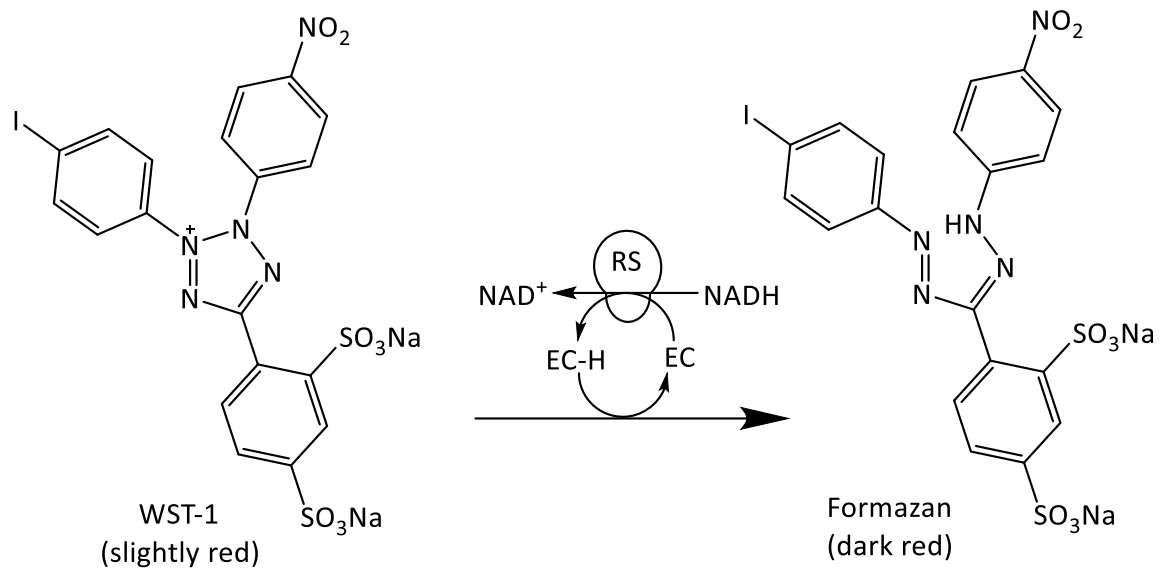


Obr. 27: Enzymatická hydrolýza substrátu v prítomnosti Ellmanovho činidla (DTNB)¹⁴⁵

4.2.4.3 Stanovenie cytotoxickej aktivity

Testovanie cytotoxickej aktivity pripravených derivátov sa uskutočnilo v spolupráci s Ústavom lekárskej biochémie, Lekárskej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej. Testy vykonal RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

Cytotoxicita derivátov vittatínu bola stanovená *in vitro* na deviatich nádorových bunkových líniách – Jurkat (akútna leukémia T-lymfocytov), MOLT-4 (akútna lymfoblastová leukémia), A549 (karcinóm pľúc), HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm), PANC-1 (epiteliálny karcinóm pankreasu), A2780 (karcinóm vaječníkov), HeLa (cervikálny adenokarcinóm), MCF-7 (adenokarcinóm prsníka), SAOS-2 (osteosarkóm) a na jednej nenádorovej bunkovej línii – MRC-5 (normálne pľúcne fibroblasty). Bunkové línie v médiu boli kultivované a udržiavané v inkubátore pri teplote 37 °C vo zvlhčenom prostredí s 5 % CO₂ a 95 % vzduchu. K bunkám v médiu boli pridané deriváty vittatínu (rozpustené v DMSO) v takom množstve, aby výsledná koncentrácia bola 10 μM. Ako referenčná látka bol použitý doxorubicín (v prostredí DMSO), ktorý bol testovaný v koncentrácii 1 μM. Po 48 hodinách inkubácie v 5 % CO₂ pri 37 °C bolo pridané činidlo WST-1. Toto činidlo umožňuje spektrofotometrické stanovenie bunkovej proliferácie, rastu a viability. Tetrazóliová soľ WST-1 je štiepená na rozpustný formazán (Obrázok 28) bunkovými reductázami najmä extracelulárne na plazmatickej membráne.¹⁴⁶ Táto redukcia je závislá od životaschopnosti buniek. Následne bola zmeraná absorbancia vzniknutého formazánu pri vlnovej dĺžke 440 nm. Na základe nameraných hodnôt bola vypočítaná viabilita buniek v percentách. Výsledky boli porovnané so štandardom. Podrobnejšie informácie o popisovanej metóde je možné nájsť v publikovanej literatúre.¹⁴⁷



Obr. 28: Redukcia tetrazóliovej soli WST-1 na formazán¹⁴⁸

EC = akceptor elektrónov

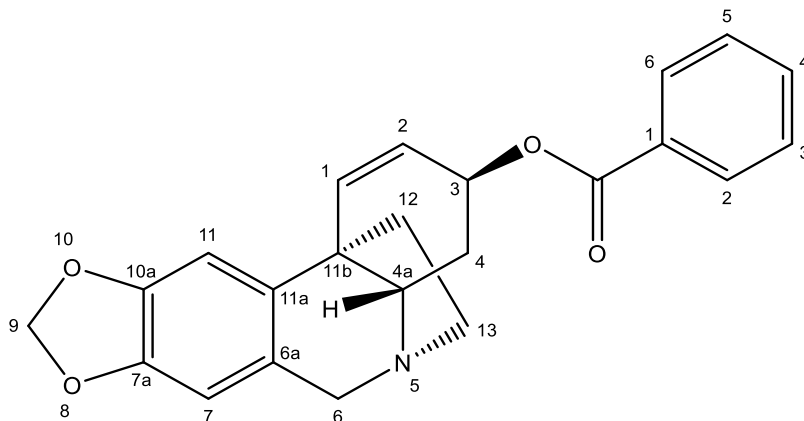
RS = reduktázový systém

NADH = nikotínamidadenínindinukleotid

5. VÝSLEDKY

5.1 Pripravené deriváty vittatínu a ich štruktúrna analýza

5.1.1 3-O-benzoylvittatín (VIT13)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl benzoát

Sumárny vzorec: C₂₃H₂₁NO₄

Molekulová hmotnosť: 375,42

Obr. 29: Štruktúra 3-O-benzoylvittatínu (VIT13)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 376,1546

m/z teoretický (pro C₂₃H₂₁NO₄ [M+H]⁺) = 376,1543

Optická otáčavosť:

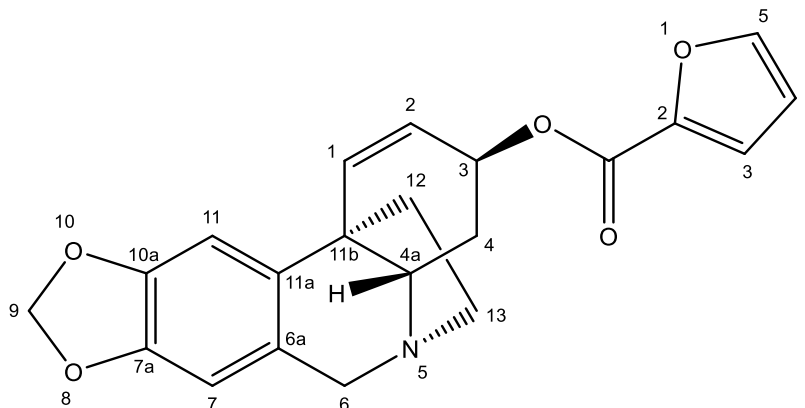
$[\alpha]_D^{24^\circ\text{C}} = -112,8^\circ$ (*c* = 0,114 mg/ml, CHCl₃)

NMR:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.02–7.98 (2H, m), 7.55–7.50 (1H, m), 7.42–7.37 (2H, m), 6.88 (1H, s), 6.76 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 6.53 (1H, s), 6.06 (1H, dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 5.3 Hz), 5.91 (1H, d, *J* = 11.5, overlapped), 5.90 (1H, d, *J* = 11.5, overlapped), 5.63–5.58 (1H, m), 4.46 (1H, d, *J* = 16.9 Hz), 3.82 (1H, d, *J* = 16.9 Hz), 3.47 (1H, dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 4.3 Hz), 3.45–3.38 (1H, m), 2.99–2.89 (1H, m), 2.27–2.20 (1H, m), 2.17–2.10 (1H, m), 2.02–1.95 (1H, m), 1.92 (1H, td, *J* = 13.8 Hz, *J* = 4.4 Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.0, 146.2, 145.8, 138.1, 134.7, 132.8, 130.3, 129.6, 128.2, 126.5, 123.7, 107.0, 102.8, 100.8, 67.2, 63.5, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 30.0, 29.7

5.1.2 3-O-(2-furoyl)vittatín (VIT14)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl furán-2-karboxylát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$
Molekulová hmotnosť: 365,39

Obr. 30: Štruktúra 3-O-(2-furoyl)vittatínu (VIT14)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 366,1348

m/z teoretický (pre $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 366,1336

Optická otáčavosť:

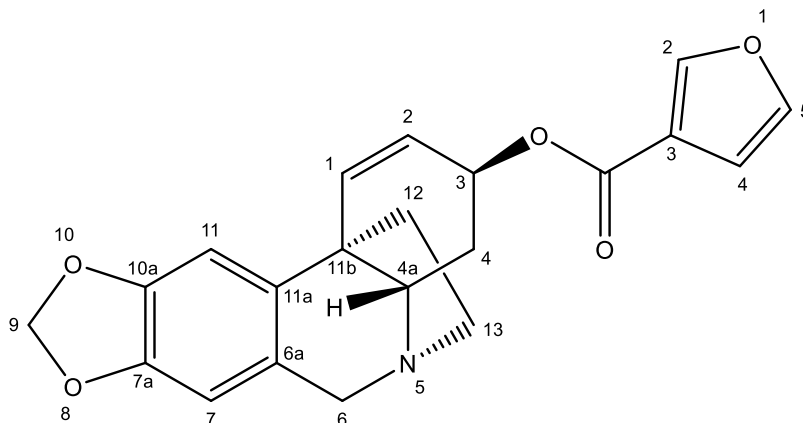
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ} = -93,7^\circ$ ($c = 0,111$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (1H, dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 7.12 (1H, dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 6.86 (1H, s), 6.75 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 6.02 (1H, ddd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz, $J = 1.4$ Hz), 5.90 (2H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 1.4$ Hz), 5.60–5.55 (1H, m), 4.44 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.81 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.47–3.35 (2H, m), 2.93 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.22 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.14–2.08 (1H, m), 2.00–1.92 (1H, m), 1.88 (1H, td, $J = 13.8$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 158.2, 146.21, 146.17, 145.8, 144.6, 137.9, 135.0, 126.3, 123.4, 118.0, 111.7, 107.0, 102.8, 100.8, 67.2, 63.2, 62.3, 53.5, 44.2, 44.1, 29.9

5.1.3 3-O-(3-furoyl)vittatín (VIT15)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl furán-3-karboxylát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$

Molekulová hmotnosť: 365,39

Obr. 31: Štruktúra 3-O-(3-furoyl)vittatínu (VIT15)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 366,1346

m/z teoretický (pre $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 366,1336

Optická otáčavosť:

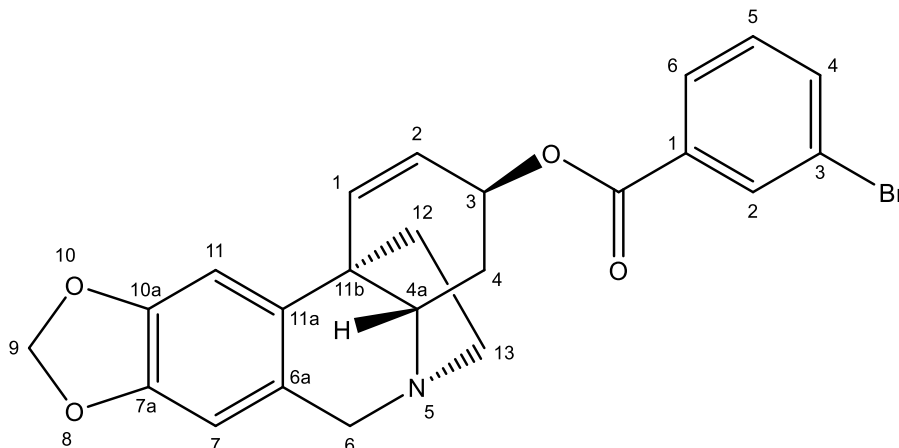
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -79,0^\circ$ ($c = 0,117$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.96 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.38 (1H, t, $J = 1.8$ Hz), 6.86 (1H, s), 6.73 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.70 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.01 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 5.90 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, overlapped), 5.55–5.51 (1H, m), 4.44 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.36–3.33 (2H, m), 2.93 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.22 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.13 – 2.05 (1H, m), 2.00 – 1.92 (1H, m), 1.87 (1H, td, $J = 13.8$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 162.5, 147.8, 146.2, 145.8, 143.5, 138.0, 134.6, 126.2, 123.7, 119.3, 109.8, 107.0, 102.8, 100.8, 66.6, 63.3, 62.3, 53.5, 44.2, 44.1, 29.9

5.1.4 3-O-(3-bromobenzoyl)vittatín (VIT16)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl
3-bromobenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrNO}_4$

Molekulová hmotnosť: 454,32

Obr. 32: Štruktúra 3-O-(3-bromobenzoyl)vittatínu (VIT16)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 454,0653

m/z teoretický (pre $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 454,0649

Optická otáčavosť:

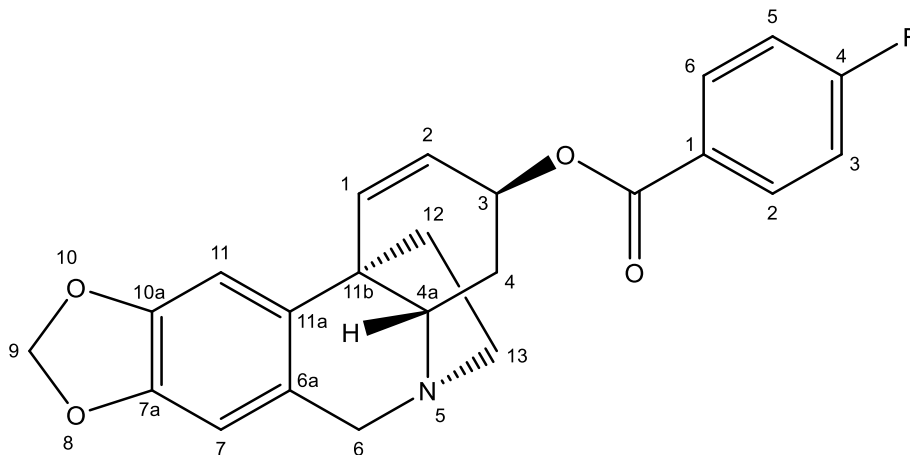
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -84,4^\circ$ ($c = 0,109$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.15–8.07 (1H, m), 7.92 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.27 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.87 (1H, s), 6.77 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.04 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 5.90 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, overlapped), 5.62–5.56 (1H, m), 4.46 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.50–3.34 (2H, m), 3.00–2.88 (1H, m), 2.23 (1H, ddd, $J = 13.1$, $J = 9.1$, $J = 4.3$ Hz), 2.17–2.08 (1H, m), 2.04–1.85 (2H, m)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.7, 146.3, 145.9, 137.9, 135.8, 135.1, 132.6, 132.3, 129.9, 128.3, 126.4, 123.4, 122.4, 107.1, 102.9, 100.9, 67.8, 63.4, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 29.9

5.1.5 3-O-(4-fluorobenzoyl)vittatín (VIT17)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl
4-fluorobenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FNO}_4$

Molekulová hmotnosť: 393,41

Obr. 33: Štruktúra 3-O-(4-fluorobenzoyl)vittatínu (VIT17)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 394,1452

m/z teoretický (pre $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 394,1449

Optická otáčavosť:

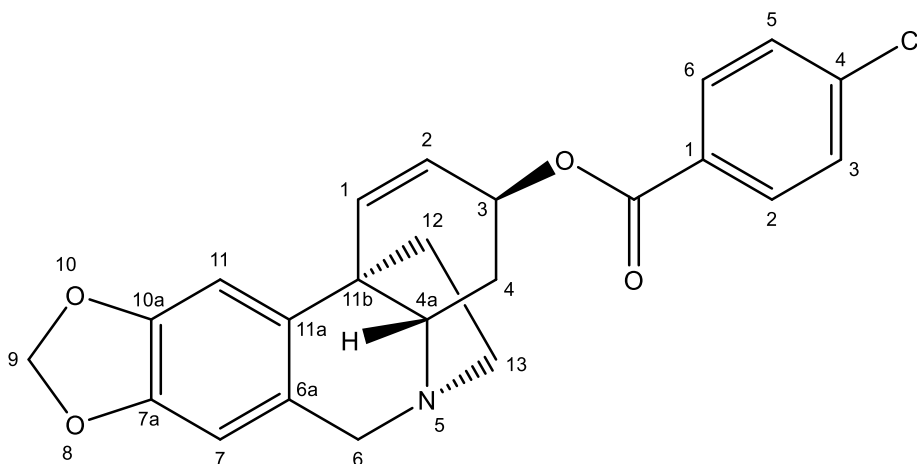
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ} = -87^\circ$ ($c = 0,115$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.06 – 7.96 (2H, m), 7.12 – 7.02 (2H, m), 6.87 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.04 (1H, ddd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz), 5.90 (1H, d, overlap, $J = 11.0$ Hz), 5.90 (1H, d, overlap, $J = 11.0$ Hz), 5.62 – 5.56 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.48 – 3.36 (2H, m), 2.94 (1H, ddd, $J = 15.1$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.23 (1H, ddd, $J = 12.2$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.16 – 2.08 (1H, m), 2.02 – 1.95 (1H, m), 1.91 (1H, ddd, $J = 14.4$ Hz, $J = 13.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.7 (d, $J = 253.3$ Hz), 165.0, 146.2, 145.8, 138.0, 134.8, 132.2 (d, $J = 9.3$ Hz), 126.5 (d, $J = 3.0$ Hz), 126.3, 123.5, 115.3 (d, $J = 21.9$ Hz), 107.0, 102.8, 100.8, 67.3, 63.4, 62.3, 53.5, 44.24, 44.16, 29.9

5.1.6 3-O-(4-chlorobenzoyl)vittatín (VIT18)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl
4-chlorobenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$

Molekulová hmotnosť: 409,87

Obr. 34: Štruktúra 3-O-(4-chlorobenzoyl)vittatínu (VIT18)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 410,1162

m/z teoretický (pre $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 410,1154

Optická otáčavosť:

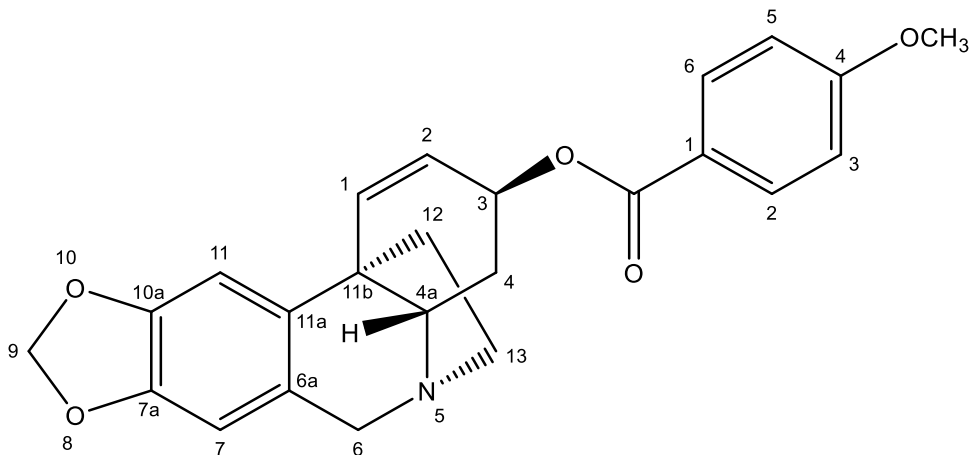
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ} = -74,1^\circ$ ($c = 0,103$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.98–7.82 (2H, m, AA'BB'), 7.41–7.30 (2H, m, AA'BB'), 6.87 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.04 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 5.91 (1H, s), 5.89 (1H, s), 5.64–5.53 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.50–3.33 (2H, m), 3.01–2.87 (1H, m), 2.23 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.2$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.13 (1H, dd, $J = 14.6$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.06–1.83 (2H, m)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.1, 146.2, 145.9, 139.2, 137.9, 134.8, 131.0, 128.7, 128.5, 126.3, 123.5, 107.0, 102.8, 100.8, 67.4, 63.4, 62.3, 53.5, 44.2, 44.2, 29.9

5.1.7 3-O-(4-metoxybenzoyl)vittatín (VIT19)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl
4-metoxybenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$

Molekulová hmotnosť: 405,45

Obr. 35: Štruktúra 3-O-(4-metoxybenzoyl)vittatínu (VIT19)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 406,1654

m/z teoretický (pre $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 406,1649

Optická otáčavosť:

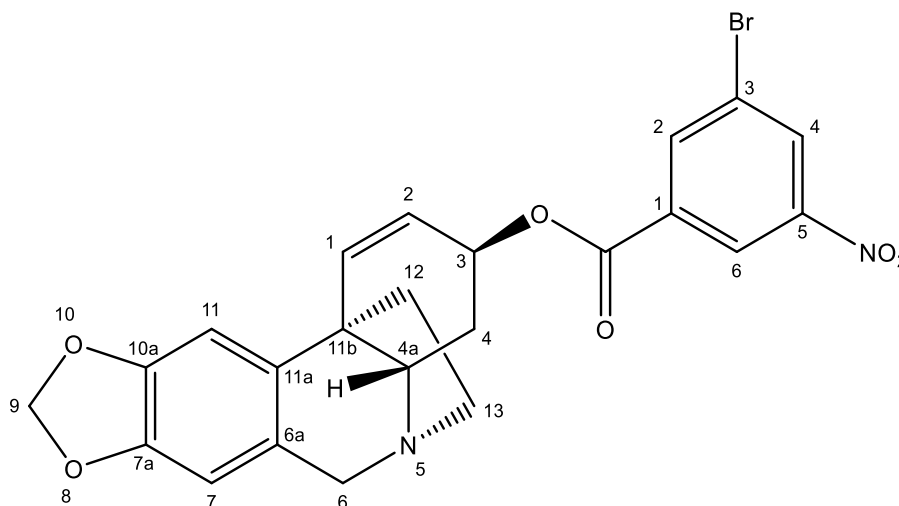
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -100,9^\circ$ ($c = 0,111$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.99–7.91 (2H, m, AA'BB'), 6.93–6.83 (3H, m), 6.73 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 5.90 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, overlapped), 5.60–5.55 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.83 (3H, s), 3.82 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, overlapped), 3.46 (1H, dd, $J = 13.2$, 4.4 Hz), 3.44–3.37 (1H, m), 2.94 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.22 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 2.16–2.09 (1H, m), 2.02–1.94 (1H, m), 1.90 (1H, td, $J = 13.8$, 4.4 Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.7, 163.3, 146.2, 145.8, 138.1, 134.4, 131.6, 126.3, 123.9, 122.7, 113.4, 107.0, 102.8, 100.8, 66.7, 63.4, 62.3, 55.3, 53.5, 44.23, 44.15, 30.0

5.1.8 3-O-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatín (VIT20)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl 3-bromo-5-nitrobenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_6$

Molekulová hmotnosť: 499,32

Obr. 36: Štruktúra 3-O-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatínu (VIT20)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 499,0505

m/z teoretický (pre $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 499,0499

Optická otáčavosť:

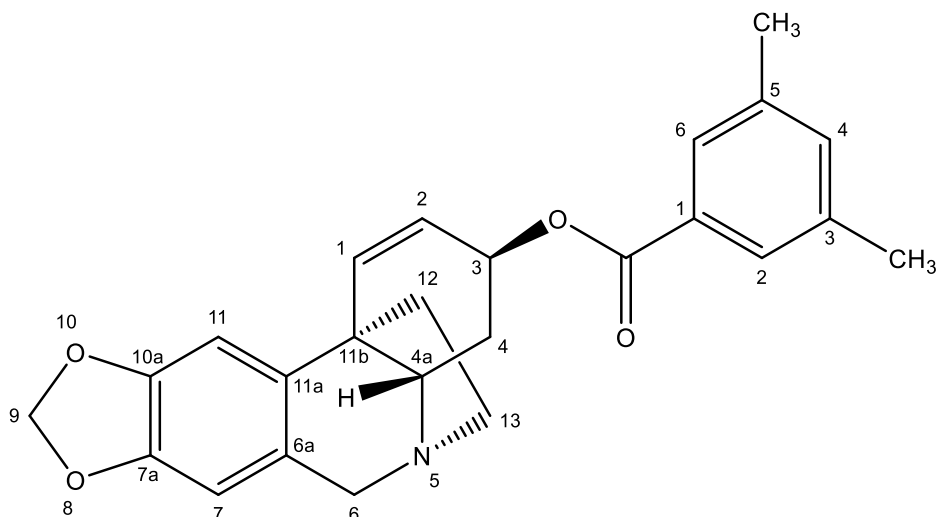
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ} = -67^\circ$ ($c = 0,108$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.74–8.70 (1H, m), 8.54–8.50 (1H, m), 8.44–8.40 (1H, m), 6.88 (1H, s), 6.82 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 5.95–5.88 (2H, m), 5.66–5.60 (1H, m), 4.48 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.84 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.48–3.38 (2H, m), 2.97 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.26 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.21–2.13 (1H, m), 2.06–1.91 (2H, m)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 162.8, 148.7, 146.3, 146.0, 138.2, 137.6, 135.8, 133.5, 130.4, 126.3, 123.2, 123.0, 122.7, 107.2, 102.8, 100.9, 69.1, 63.2, 62.3, 53.6, 44.2, 44.2, 29.8

5.1.9 3-*O*-(3,5-dimetylbenzoyl)vittatín (VIT21)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl 3,5-dimetylbenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_4$

Molekulová hmotnosť: 403,48

Obr. 37: Štruktúra 3-*O*-(3,5-dimetylbenzoyl)vittatínu (VIT21)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 404,1858

m/z teoretický (pre $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 404,1856

Optická otáčavosť:

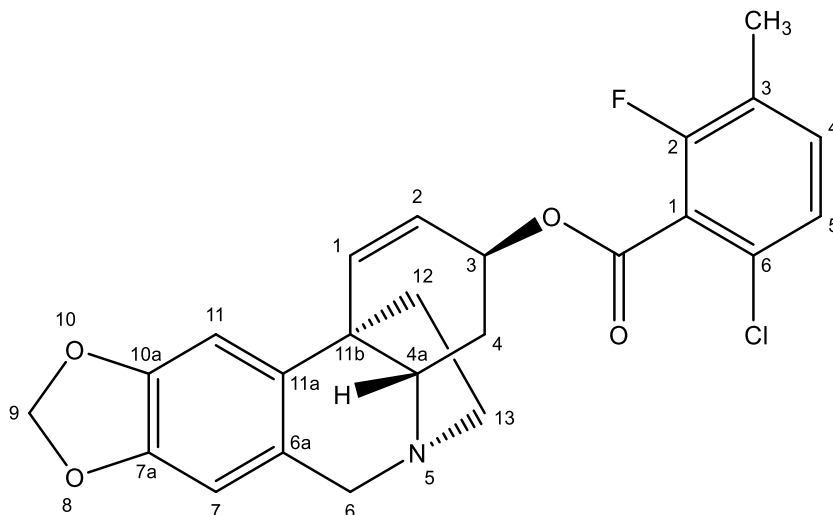
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -93,5^\circ$ ($c = 0,107$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.60 (2H, s), 7.15 (1H, s), 6.90 (1H, s), 6.75 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.2$ Hz), 5.92 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, overlapped), 5.91 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, overlapped), 5.62–5.56 (1H, m), 4.47 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.83 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.51–3.38 (2H, m), 2.95 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.33 (6H, s), 2.23 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 2.19–2.11 (1H, m), 1.99 (1H, ddd, $J = 12.3$ Hz, $J = 10.4$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 1.91 (1H, dd, $J = 13.8$, 4.4 Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.4, 146.3, 145.9, 138.1, 137.9, 134.5, 134.4, 130.2, 127.3, 126.4, 123.9, 107.0, 102.9, 100.8, 67.0, 63.4, 62.3, 53.5, 44.3, 44.2, 30.0, 21.1

5.1.10 3-*O*-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín (VIT22)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl 6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{ClFNO}_4$

Molekulová hmotnosť: 441,88

Obr. 38: Štruktúra 3-*O*-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatínu (VIT22)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 442,1226

m/z teoretický (pre $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{ClFNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 442,1216

Optická otáčavosť:

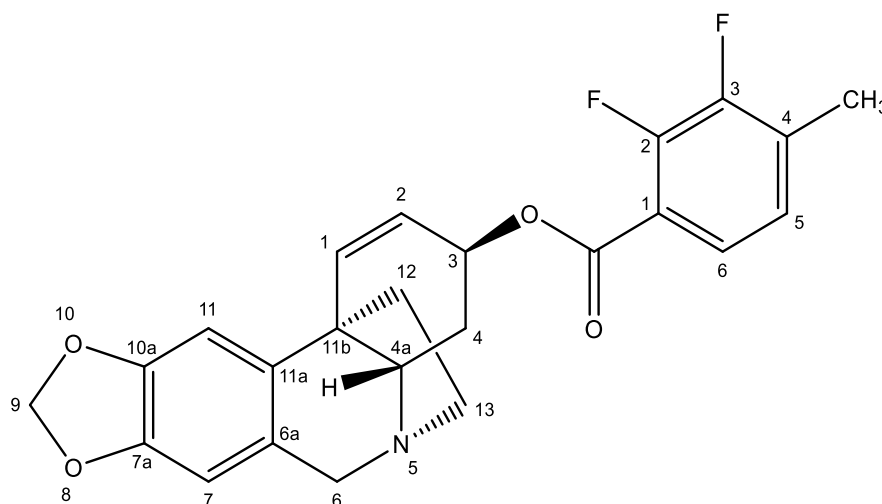
$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -37,9^\circ$ ($c = 0,106$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.16 – 7.10 (1H, m), 7.05 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.85 (1H, s), 6.78 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.49 (1H, s), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 5.91 – 5.87 (2H, m), 5.73 – 5.67 (1H, m), 4.41 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.80 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.48 – 3.36 (2H, m), 2.94 (1H, ddd, $J = 13.2$ Hz, $J = 9.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.27 – 2.18 (5H, m), 1.98 (1H, ddd, $J = 12.3$ Hz, $J = 10.4$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 1.90 (1H, td, $J = 13.2$ Hz, $J = 4.2$ Hz)

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3) δ : 163.0, 157.8 (d, $J = 252.0$ Hz), 146.2, 145.8, 137.9, 135.4, 132.8 (d, $J = 6.1$ Hz), 129.2, 126.3, 124.8 (d, $J = 3.9$ Hz), 124.2 (d, $J = 17.3$ Hz), 122.9, 122.0 (d, $J = 21.5$ Hz), 107.0, 102.8, 100.8, 68.6, 63.2, 62.3, 53.5, 44.3, 44.2, 29.7, 14.2 (d, $J = 3.4$ Hz).

5.1.11 3-O-(2,3-difluoro-4-metylbenzoyl)vittatín (VIT23)



(3*S*,4*aS*,5*R*,11*bR*)-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]fenantridín-3-yl 2,3-difluoro-4-metylbenzoát

Sumárny vzorec: $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}_4$

Molekulová hmotnosť: 425,43

Obr. 39: Štruktúra 3-O-(2,3-difluoro-4-metylbenzoyl)vittatínu (VIT23)

ESI-HRMS:

m/z experimentálny = 426,1516

m/z teoretický (pre $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 426,1511

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24^\circ\text{C}} = -76,4^\circ$ ($c = 0,110$ mg/ml, CHCl_3)

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (1H, ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 6.98 – 6.91 (1H, m), 6.86 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.06 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.3$ Hz), 5.90 (1H, d, overlap, $J = 11.2$ Hz), 5.90 (1H, d, overlap, $J = 11.2$ Hz), 5.63 – 5.57 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.81 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.50 – 3.36 (2H, m), 2.94 (1H, ddd, J

= 12.5 Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 2.32 (3H, d, $J = 2.2$ Hz), 2.23 (1H, ddd, $J = 13.1$ Hz, $J = 9.1$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 2.17 – 2.09 (1H, m), 1.98 (1H, ddd, $J = 12.5$ Hz, $J = 10.5$ Hz, $J = 5.9$ Hz), 1.91 (1H, ddd, $J = 14.1$, 13.1, 4.3 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.0, 150.6 (dd, $J = 262.4$ Hz, $J = 14.4$ Hz), 149.6 (dd, $J = 247.3$ Hz, $J = 13.0$ Hz), 146.2, 145.9, 137.9, 134.9, 132.3 (d, $J = 14.4$ Hz), 126.2, 125.7 (d, $J = 4.2$ Hz), 125.64, 125.1 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 3.7$ Hz), 123.4, 118.1 (d, $J = 6.9$ Hz), 107.0, 102.8, 100.8, 67.7, 63.4, 62.3, 53.5, 44.2, 29.8, 14.7 (dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 2.0$ Hz)

5.2 Výťažnosť reakcií

Pre zistenie výťažnosti reakcií boli najskôr vypočítané teoretické výťažky všetkých pripravených derivátov podľa uvedeného vzorca:

$$\text{teoretický výťažok (mg)} = \frac{\text{navážka vittatínu} \times M_r \text{ derivátu}}{M_r \text{ vittatínu}}$$

Následne bola vypočítaná skutočná percentuálna výťažnosť derivátov z reakcií (Tabuľka 20) podľa vzorca:

$$\text{skutočná výťažnosť reakcie (\%)} = \frac{\text{výťažok}}{\text{teoretický výťažok}} \times 100$$

Tabuľka 20: Percentuálna výťažnosť pripravených derivátov vittatínu

označenie derivátu	názov derivátu	navážka vittatínu (mg)	výťažok (mg)	skutočná výťažnosť (%)
VIT13	3-O-benzoylvittatín	15,80	21,30	97,50
VIT14	3-O-(2-furoyl)vittatín	31,00	41,00	98,21
VIT15	3-O-(3-furoyl)vittatín	31,90	38,90	90,55
VIT16	3-O-(3-bromobenzoyl)vittatín	30,40	47,60	93,51
VIT17	3-O-(4-fluorobenzoyl)vittatín	31,70	42,20	91,81
VIT18	3-O-(4-chlorobenzoyl)vittatín	30,60	46,20	99,94
VIT19	3-O-(4-metoxybenzoyl)vittatín	31,40	46,00	98,03
VIT20	3-O-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatín	21,10	25,40	65,41
VIT21	3-O-(3,5-dimetylbenzoyl)vittatín	21,00	21,70	69,49
VIT22	3-O-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín	20,70	22,40	66,44
VIT23	3-O-(2,3-difluoro-4-metylbenzoyl)vittatín	21,80	29,60	86,59

5.3 Biologická aktivita derivátov vittatínu

5.3.1 Inhibičná aktivita voči cholinesterázam a schopnosť transportu cez HEB

Na všetkých jedenástich pripravených derivátoch vittatínu (VIT13 – VIT23) boli vykonané testy inhibičnej aktivity voči AChE a BuChE. Najskôr sa všetky látky testovali pri koncentrácii 100 μM . Pre deriváty, ktoré pri screeningu vykázali inhibičnú aktivitu vyššiu ako 50%, bola zmeraná a vypočítaná hodnota IC_{50} . Je to hodnota udávajúca koncentráciu derivátu, ktorá je potrebná pre 50% inhibíciu enzýmu. Výsledky testov sú zhrnuté v tabuľke (Tabuľka 21) a porovnané s hodnotami IC_{50} galantamínu (vo forme hydrobromidu), ktorý bol použitý ako štandard a s hodnotami alkaloidu vittatínu.

U derivátov so stanovenou hodnotou IC_{50} bol vypočítaný distribučný koeficient $\log\text{BB}$, čo je logaritmickej pomer koncentrácie látky v mozgu a v krvi. Hodnota $\log\text{BB}$ vyjadruje schopnosť látok pasívne prechádzať cez HEB. Deriváty s $\log\text{BB} > 0,3$ môžu ľahko preniknúť cez HEB, deriváty s hodnotou $0,3 > \log\text{BB} > -1$ sú tiež schopné prieniku, zatiaľ čo zlúčeniny s $\log\text{BB} < -1$ majú len veľmi obmedzenú schopnosť distribúcie do CNS¹⁴.

Tabuľka 21: Anticholinesterázová aktivita derivátov vittatínu VIT13 – VIT23 a ich $\log\text{BB}$

testovaná látka	% inhibícia AChE (c=100 μM)	AChE IC_{50} (μM)	% inhibícia BuChE (c=100 μM)	BuChE IC_{50} (μM)	$\log\text{BB}^a$
vittatín ¹⁴	9 \pm 1	>100	6 \pm 1	>100	-
VIT13	30,28 \pm 2,90	>100	83,91 \pm 2,84	17,32 \pm 2,57	0,289
VIT14	27,92 \pm 3,18	>100	54,58 \pm 2,01	20,39 \pm 3,09	0,251
VIT15	19,57 \pm 3,52	>100	64,18 \pm 1,09	65,19 \pm 7,69	0,372
VIT16	31,86 \pm 2,47	>100	53,32 \pm 1,55	66,96 \pm 2,29	0,289
VIT17	35,42 \pm 2,99	>100	61,92 \pm 3,15	61,29 \pm 11,00	0,434
VIT18	21,57 \pm 5,60	>100	41,92 \pm 3,18	>100	-
VIT19	36,87 \pm 1,97	>100	45,94 \pm 2,05	>100	-
VIT20	10,69 \pm 11,22	>100	16,61 \pm 2,27	>100	-
VIT21	29,23 \pm 2,22	>100	30,04 \pm 4,21	>100	-
VIT22	25,22 \pm 2,20	>100	92,64 \pm 2,63	0,29 \pm 0,03	0,535
VIT23	30,32 \pm 4,44	>100	59,08 \pm 4,60	70,20 \pm 1,87	0,372
galantamín ^s	94,88 \pm 0,43	2,01 \pm 0,14	68,23 \pm 1,24	33,69 \pm 2,66	-

^s štandard; ^a vypočítané na <http://www.way2drug.com/geb/>

5.3.2 Cytotoxická aktivita

Cytotoxicita bola stanovená u derivátov VIT14 – VIT22 na 9 nádorových bunkových líniah a na jednej zdravej bunkovej línii (MRC-5). Výsledky (Tabuľka 22 a 23) sú uvedené v % viability buniek a sú porovnané so štandardom doxorubicínom (DOX) a alkaloidom vittatínom (VIT).

Tabuľka 22: Cytotoxická aktivita derivátov vittatínu VIT14 – VIT18

bunková línia	viabilita buniek po 48 hod pôsobenia testovanej látky (%)						
	c =10 µM						c =1 µM
	VIT ¹²⁰	VIT 14	VIT 15	VIT 16	VIT 17	VIT 18	DOX
Jurkat	91 ± 3	101 ± 11	102 ± 7	113 ± 8	100 ± 9	104 ± 13	3 ± 1
MOLT-4	92 ± 12	85 ± 5	80 ± 3	101 ± 10	90 ± 7	92 ± 4	2 ± 2
A549	80 ± 4	90 ± 6	85 ± 2	97 ± 4	86 ± 2	89 ± 3	9 ± 3
HT-29	84 ± 5	98 ± 4	82 ± 12	68 ± 14	71 ± 13	76 ± 13	37 ± 11
PANC-1	84 ± 4	95 ± 3	94 ± 3	100 ± 5	89 ± 7	90 ± 5	80 ± 5
A2780	98 ± 5	102 ± 6	100 ± 6	100 ± 8	98 ± 9	98 ± 4	10 ± 6
HeLa	100 ± 5	112 ± 12	103 ± 12	111 ± 14	104 ± 18	109 ± 17	9 ± 1
MCF-7	79 ± 2	96 ± 3	93 ± 6	98 ± 5	92 ± 7	88 ± 5	38 ± 4
SAOS-2	79 ± 6	94 ± 5	89 ± 8	105 ± 4	91 ± 4	89 ± 2	14 ± 3
MRC-5	83 ± 8	94 ± 12	100 ± 9	115 ± 2	109 ± 0	108 ± 4	36 ± 5

DOX: štandard doxorubicín, VIT: alkaloid vittatín

Tabuľka 23: Cytotoxická aktivita derivátov vittatínu VIT19 – VIT22

bunková línia	viabilita buniek po 48 hod pôsobenia testovanej látky (%)					
	c =10 µM					c =1 µM
	VIT ¹²⁰	VIT 19	VIT 20	VIT 21	VIT 22	DOX
Jurkat	91 ± 3	102 ± 10	105 ± 11	108 ± 18	97 ± 10	3 ± 1
MOLT-4	92 ± 12	91 ± 4	99 ± 8	100 ± 8	81 ± 2	2 ± 2
A549	80 ± 4	90 ± 16	89 ± 18	98 ± 14	110 ± 6	9 ± 3
HT-29	84 ± 5	74 ± 15	71 ± 14	49 ± 12	80 ± 8	37 ± 11
PANC-1	84 ± 4	94 ± 13	86 ± 16	109 ± 16	111 ± 8	80 ± 5
A2780	98 ± 5	97 ± 5	90 ± 7	94 ± 4	96 ± 10	10 ± 6
HeLa	100 ± 5	107 ± 17	103 ± 23	118 ± 29	106 ± 5	9 ± 1
MCF-7	79 ± 2	84 ± 10	89 ± 9	91 ± 8	81 ± 8	38 ± 4
SAOS-2	79 ± 6	96 ± 5	100 ± 4	106 ± 5	97 ± 25	14 ± 3
MRC-5	83 ± 8	117 ± 2	110 ± 7	127 ± 15	95 ± 11	36 ± 5

DOX: štandard doxorubicín, VIT: alkaloid vittatín

0 - 25 %	26 - 50 %	51 - 75 %	>75 %
----------	-----------	-----------	-------

farebné rozlíšenie hodnôt v tabuľkách

6. DISKUSIA A ZÁVER

Amaryllidaceae alkaloidy haemantamínového štruktúrneho typu a ich deriváty sa vyznačujú pestrou biologickou aktivitou. Do tejto skupiny patrí aj alkaloid vittatín, u ktorého boli zistené protinádorové^{120,101,141}, antibakteriálne¹³³, antimykotické¹³³ a antimalarické^{98,104} účinky. Na Katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové boli po prvýkrát pripravené polosyntetické deriváty alkaloidu vittatínu. Ich príprava bola realizovaná v rámci výskumu skupiny ADINACO, ktorá sa dlhodobo venuje štúdiu účinkov prírodných látok na patofyziologické procesy ovplyvňujúce vývoj Alzheimerovej choroby. Zistilo sa, že hoci samotný vittatín neinhibuje cholinesterázy^{14,87}, jeho polosyntetické deriváty vykázali sľubnú inhibičnú aktivitu, a to najmä proti BuChE¹⁴. Táto diplomová práca nadväzuje na získané výsledky a jej cieľom bolo pripraviť ďalšiu sériu derivátov vittatínu a otestovať ich biologickú aktivitu.

Podarilo sa pripraviť 11 aromatických esterov (VIT13 – VIT23) modifikáciou hydroxylovej skupiny vittatínu v polohe C-3. Deriváty VIT13, VIT18 a VIT19 už boli publikované v článku Al Shammari L. et al. (2020)¹⁴. Na prípravu vittatínových derivátov boli použité rôzne substituované benzoylchloridy a nesubstituované furoylchloridy. Reakcie prebiehali v prostredí suchého pyridínu s katalyzátorom DMAP za zvýšenej teploty a priebeh bol kontrolovaný analytickou TLC. Vzniknuté deriváty boli z reakčnej zmesi oddelené pomocou preparatívnej TLC a identifikácia bola vykonaná pomocou ESI-HRMS, NMR a zmeraním optickej otáčavosti. Výťažnosť reakcií sa pohybovala v rozmedzí 65,41 - 99,94 %. Aby mohla byť testovaná biologická aktivita derivátov, bolo potrebné zvýšiť ich rozpustnosť prevedením na hydrochloridy.

Na základe zaujímavých výsledkov biologickej aktivity prvej série vittatínových derivátov bola aj u derivátov VIT13 – VIT23 skúmaná inhibičná aktivita proti cholinesterázam. Anticholinesterázová aktivita sa testovala Ellmanovou metódou s využitím rekombinantných ľudských enzýmov AChE a BuChE a ako štandard bol zvolený galantamín. U derivátov s inhibičnou aktivitou presahujúcou 50 % bola stanovená hodnota IC₅₀.

Ani jeden z derivátov nepreukázal významnejšiu inhibičnú aktivitu voči AChE. Podľa poznatkov z predchádzajúcich štúdií, ktoré sa venovali derivátom haemantamínu a vittatínu, je inhibícia AChE spojená s prítomnosťou nitroskupiny na aromatickom jadre.

Najvýhodnejšie umiestnenie je v polohe 3 na benzoyle^{14,110}. Medzi pripravenými derivátmi bol iba jeden obsahujúci nitroskupinu, 3-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)vittatín (VIT20), no jeho aktivita bola veľmi nízka.

Zaujímavé výsledky ukázali testy na inhibičnú aktivitu voči BuChE. Všetky deriváty okrem štyroch (VIT18 – VIT21) boli schopné inhibovať BuChE. Mierne aktívne boli 3-*O*-benzoylvittatín (VIT13) a 3-*O*-(2-furoyl)vittatín (VIT14) s hodnotami IC₅₀ 17,32 ± 2,57 μM a 20,39 ± 3,09 μM. Najvýznamnejšiu aktivitu vykázal derivát 3-*O*-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín (VIT22), ktorý bol účinný už pri submikromolárnej koncentrácii s hodnotou IC₅₀ 0,29 ± 0,03 μM. Ostatné zlúčeniny boli slabo aktívne. Aj v prípade tejto série derivátov vittatínu platí, že najvýhodnejšia je pre BuChE inhibičnú aktivitu substitúcia na benzoyle v polohe *orto* a substituenty v *meta* alebo *para* polohe ovplyvňujú aktivitu negatívne¹⁴. V deriváte VIT22 je však metylová skupina v polohe *meta* tolerovaná. Momentálne prebieha dokingová štúdia pre vysvetlenie väzby molekuly na enzým a objasnenie SAR.

Látka VIT22 patrí medzi deriváty AA s najvyššou aktivitou voči BuChE, ktoré boli zatiaľ na Katedre farmaceutickej botaniky pripravené (Tabuľka 24). Deriváty lykorínu⁴³, chlidantínu¹⁴⁹, tazettínu^{150,151} a haemantamínu^{105,106,107,108,109,110} boli menej aktívne. Porovnateľne silnú aktivitu vykázali iba deriváty krinínového alkaloidu ambellínu. Najaktívnejší je 11-*O*-(1-naftoyl)ambellín (IC₅₀ = 0,10 ± 0,01 μM)¹⁵². Vittatín a ambellín majú rovnaký základný štruktúrny skelet (5,10*b*-etanofenantridín), ale odlišujú sa v α/β orientácii etylénového mostíka. Na aktivitu derivátov krinanových alkaloidov proti BuChE teda pravdepodobne nemá vplyv orientácia etylénového mostíka.

Tabuľka 24: Deriváty AA inhibujúce BuChE s hodnotou IC₅₀ < 5 μM

derivát	inhibícia BuChE IC ₅₀ (μM)	zdroj dát
11- <i>O</i> -(1-naftoyl)ambellín	0,10 ± 0,01	152
11- <i>O</i> -(2-metylbenzoyl)ambellín	0,28 ± 0,02	152
3-<i>O</i>-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín	0,29 ± 0,03	
11- <i>O</i> -(2-metoxibenzoyle)ambellín	0,43 ± 0,04	152
11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)ambellín	0,86 ± 0,03	152
3- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)vittatín	1,4 ± 0,1	15
11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)ambellín	2,3 ± 0,2	152
11- <i>O</i> -(2-metoxibenzoyle)haemantamín	3,30 ± 0,4	110
11- <i>O</i> -benzoyleambellín	3,8 ± 0,1	152

Keďže liečivá na AD pôsobia v mozgu, musia byť schopné prechodu cez HEB. Preto bola u aktívnych derivátov vypočítaná hodnota $\log BB$, ktorá udáva logaritmický pomer koncentrácie látky v mozgu a v krvi a vyjadruje schopnosť látok pasívne prechádzať cez HEB. Vypočítané hodnoty boli v rozsahu od 0,251 do 0,535, čo znamená, že tieto deriváty môžu prenikať cez HEB a majú potenciál pôsobiť v CNS. Najaktívnejší derivát VIT22 bude v najbližšom čase testovaný aj metódou PAMPA.

V liečbe AD dominujú v súčasnosti inhibítory AChE. S progresiou ochorenia však klesá v mozgu hladina AChE a jej nedostatok kompenzuje BuChE, ktorej hladina sa naopak zvyšuje. Jej aktivita pravdepodobne súvisí aj s agregáciou A β v senilných plakoch. Tieto zistenia robia z BuChE zaujímavý cieľ vo vývoji nových liečiv proti AD. Bolo pripravených už viacero BuChE-selektívnych inhibítorov^{152,153} a predložených niekoľko patentov na inhibítory BuChE¹⁵⁴. V rámci tejto diplomovej práce sa podarilo pripraviť derivát vittatínu VIT22 s veľmi sľubnou selektívnou aktivitou proti BuChE, ktorý je vhodným kandidátom pre ďalší výskum.

Ďalej sa skúmali protinádorové účinky pripravených derivátov. Cytotoxicita bola stanovená *in vitro* testom viability s činidlom WST-1 na 9 nádorových bunkových líniiach (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a na jednej zdravej bunkovej línii (MRC-5). Testované boli deriváty VIT14 – VIT22 v koncentrácii 10 μ M. Ako štandard bol použitý doxorubicín v koncentrácii 1 μ M. Miernu aktivitu vykázal derivát 3-*O*-(3,5-dimetylbenzoyl)vittatín (VIT21), ktorý znížil viabilitu nádorových buniek HT-29 na 49 ± 12 % bez toxického účinku na zdravé bunky (MRC-5). Táto látka by mohla byť predmetom ďalších štúdií. Deriváty VIT16, VIT17, VIT19 a VIT20 boli len slabo cytotoxické takisto na bunky línie HT-29. Ostatné látky nemali výraznejšie protinádorové účinky. Žiadny z testovaných derivátov nepôsobil negatívne na viabilitu zdravých pľúcnych fibroblastov (MRC-5). Nízka toxicita voči zdravým bunkám je výhodou pre ďalší výskum súvisiaci s ich potenciálnym využitím v terapii AD. Cytotoxicita látok VIT13 a VIT23 bude stanovená v najbližšej dobe.

Pri porovnaní hodnôt cytotoxicity vittatínu a jeho doposiaľ pripravených derivátov možno pozorovať, že vo väčšine prípadov obmena hydroxylovej skupiny v polohe 3 cytotoxickú aktivitu proti bunkovým líniiach nezvýšila. Výnimkou bola línia HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm), proti ktorej boli viaceré deriváty aktívnejšie ako samotný vittatín, pričom nepôsobili toxicky na zdravé bunky^{120,15}.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognózie

Kandidát: Michaela Teplanská

Školiteľ: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Deriváty Amaryllidaceae alkaloidu vittatínu ako potenciálne liečivá

Amaryllidaceae alkaloidy haemantamínového typu sa vyznačujú zaujímavou biologickou aktivitou. Do tejto skupiny patrí aj alkaloid vittatín s protinádorovými, antibakteriálnymi, antimykotickými a antimalarickými účinkami. Hoci vittatín neinhibuje cholinesterázy, jeho deriváty vykázali sľubnú aktivitu proti butyrylcholinesteráze, ktorá je jedným z cieľov potenciálnych liečiv v terapii Alzheimerovej choroby.

V rámci tejto diplomovej práce bola pripravená ďalšia séria polosyntetických derivátov vittatínu z cieľom preskúmať ich biologickú aktivitu. Reakciou s acylchloridmi vzniklo 11 aromatických esterov. Identifikácia pripravených látok bola vykonaná pomocou ESI-HRMS, NMR a zmeraním optickej otáčavosti.

Deriváty boli testované na inhibičnú aktivitu voči ľudským cholinesterázam. Výsledky ukázali, že látky neboli aktívne voči acetylcholinesteráze, ale takmer všetky boli schopné inhibovať butyrylcholinesterázu. Najaktívnejší bol 3-O-(6-chloro-2-fluoro-3-metylbenzoyl)vittatín s hodnotou IC_{50} $0,29 \pm 0,03 \mu M$. Podľa vypočítanej hodnoty $\log BB$ môže ľahko prenikať cez HEB a má potenciál pôsobiť v CNS.

Stanovená bola tiež cytotoxicita pripravených látok. Testovala sa *in vitro* na 9 nádorových a na jednej nenádorovej bunkovej línii. Miernu cytotoxickú aktivitu vykázal iba 3-O-(3,5-dimetylbenzoyl)vittatín proti bunkám kolorektálneho adenokarcinómu HT-29. Žiadny z testovaných derivátov neznižoval viabilitu zdravých buniek (MRC-5).

Kľúčové slová: Amaryllidaceae alkaloidy, vittatín, deriváty, Alzheimerova choroba, butyrylcholinesteráza, cytotoxicita

8. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Michaela Teplanská

Supervisor: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Derivatives of Amaryllidaceae alkaloid vittatine as potential drugs

Haemanthamine type Amaryllidaceae alkaloids are characterized by interesting biological activity. This group also includes alkaloid vittatine with antitumor, antibacterial, antifungal and antimalarial effects. Although vittatine does not inhibit cholinesterases, its derivatives have shown promising activity against butyrylcholinesterase, which is one of the targets of potential drugs in the treatment of Alzheimer's disease.

Another series of semisynthetic vittatine derivatives was prepared in order to examine their biological activity. Reactions with acyl chlorides gave 11 aromatic esters. Identification of the prepared substances was performed by ESI HRMS, NMR and optical rotation measurements.

The derivatives were tested for inhibitory activity against human cholinesterases. The results show that the substances were not active against acetylcholinesterase, but almost all of them inhibited butyrylcholinesterase. The most active was 3-*O*-(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoyl)vittatine with an IC_{50} value $0.29 \pm 0.03 \mu\text{M}$. According to the calculated value of logBB this derivative can be easily transmitted through HEB and has the potential to act in the CNS.

The cytotoxicity of the prepared substances was also determined. It was tested *in vitro* on 9 tumor and one non-tumor cell line. Only the 3-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)vittatine showed moderate cytotoxic activity against HT 29 colorectal adenocarcinoma cells. None of the tested derivatives reduced the viability of healthy cells (MRC-5).

Keywords: Amaryllidaceae alkaloids, vittatine, derivatives, Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase, cytotoxicity

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

- ¹ H Hartl J., Palát K.: *Farmaceutická chemie I.* 3. vyd. Karolinum, 2011.
- ² Li F., Wang Y., Li D., Chen Y., Dou Q. P. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019, 14(5), 417-420.
- ³ Nagy M., Mučaji P., Grančai D. *Farmakognózia: Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje*. 2. doplnené a opravené vyd. Herba, 2017.
- ⁴ Tavolinejad H., Soltani D., Zargaran A., Rezaeizadeh H., Vasheghani-Farahani A. The story of amiodarone. *European Heart Journal*. 2019, 40(33), 2758-2759.
- ⁵ Pinheiro Luiz C. S., Feitosa Lívia M., Silveira Flávia F. DA, Boechat N. Current antimalarial therapies and advances in the development of semi-synthetic artemisinin derivatives. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2018, 90(1 suppl 2), 1251-1271.
- ⁶ Blažejová R., Hošek J. Liečivá rastlinného pôvodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení. *Česká a slovenská farmacie*. 2019, 68(1), 311.
- ⁷ Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 2020, 83(3), 770-803.
- ⁸ Zenk M. H., Juenger M.: Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*. 2007, 68(22-24), 2757-2772.
- ⁹ Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. *Farmakognozie*. Karolinum, 2016.
- ¹⁰ Ka S., Koirala M., Mérindol N., Desgagné-Penix I.: Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules*. 2020, 25(21), 4901.
- ¹¹ Ding Y., Qu D., Zhang K., Cang X., Kou Z., Xiao W., Zhu J. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2016, 19(1), 53-100.
- ¹² Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021, 71(3), 209-249.
- ¹³ Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R. The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications*. 2016, 11(10), 1587-1594.

- ¹⁴ Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., Šafratová M., Nováková L., Schmidt M., Pulkrábková L., Janoušek J., Soukup O., Kuneš J., Opletal L., Cahlíková L. 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*. January 2021, 136, 137-146.
- ¹⁵ VALACHOVÁ I. *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů jako látky potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁶ Angiosperm Phylogeny Grp. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016, 181(1), 1-20.
- ¹⁷ Hrabovský M., Zahradníková., Mičeta K. Proposal of slovak names for Angiosperm Phylogeny Group classification of flowering plants: APG IV. *Acta Botanica Universitatis Comenianae*. Univerzita Komenského v Bratislave, 2016, 51, 9 - 21.
- ¹⁸ Meerow A. W., Gardner E. M., Nakamura K. Phylogenomics of the Andean tetraploid clade of the American Amaryllidaceae (subfamily Amaryllidoideae): unlocking a polyploid generic radiation abetted by continental geodynamics. *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11, 582422.
- ¹⁹ Jahodář L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3., upr. a dopl. Karolinum, 2011.
- ²⁰ Asparagales. *Angiosperm Phylogeny Website*. Stevens, P. F., 2017. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [cit. 2021-03-06]
- ²¹ Hulcová D. *Biologická aktivita alkaloidů Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae)*. Hradec Králové, 2018. Doktorská dizertačná práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ²² *Cyrtanthus mackenii* Hook.f. *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:64233-1> [cit. 2021-03-10]
- ²³ *Scadoxus multiflorus* subsp. Katherinae. *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p8037542.jpg [cit. 2021-03-10]
- ²⁴ *Nerine bowdenii* W.Watson. *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:66292-1> [cit. 2021-03-10]
- ²⁵ *Hippeastrum blossfeldiae*. *Digitální fotoherbář*. Kocna P. http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p8250720.jpg [cit. 2021-03-10]

- ²⁶ *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60455959-2> [cit. 2021-03-10]
- ²⁷ *Sternbergia lutea*. *Digitální fotoherbář*. Kocna P. http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p9171554.jpg [cit. 2021-03-10]
- ²⁸ Rønsted N., Symonds M. R. E., Birkholm T., Christensen S., Meerow A. W., Molander M., Mølgaard P., Petersen G., Rasmussen N., van Staden J., Stafford G. I., Jäger A. K. Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology*. 2012, 12(1), 182.
- ²⁹ Nair J. J., Bastida J., Codina C., Viladomat F., van Staden J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: A review. *Natural Product Communications*. 2013, 8(9), 1335 - 1350.
- ³⁰ Chytrý M., Danihelka J., Kaplan Z., Wild J., Holubová D., Novotný P., Řezníčková M., Rohn M., Dřevojan P., Grulich V., Klimešová J., Lepš J., Lososová Z., Pergl J., Sádlo J., Šmarda P., Štěpánková P., Tichý L., Axmanová I., Bartušková A., Blažek P., Chrtek J., Fischer F. M., Guo W., Herben T., Janovský Z., Konečná M., Kühn I., Moravcová L., Petřík P., Pierce S., Prach K., Prokešová H., Štech M., Těšitel J., Těšitelová T., Večeřa M., Zelený D., Pyšek P. Pladias Database of the Czech flora and vegetation. *Preslia*. 2021, 93(1), 1-87.
- ³¹ *Pladias - databáze české flóry a vegetace*. <https://pladias.cz/> [cit. 2021-03-07].
- ³² Danihelka J., Chrtek Jr. J., Kaplan Z. Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia*. 2012, 84(3), 647-811.
- ³³ *Narcissus poeticus* - narcis bílý. *Herbář Wendys*. Pazdera Z., Netušil P., Wronská W., Zavadil V. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/308-narcissus-poeticus-narcis-bily> [cit. 2021-03-10]
- ³⁴ *Narcissus pseudonarcissus* - narcis žlutý. *Herbář Wendys*. Pazdera Z., Netušil P., Wronská W., Zavadil V. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/307-narcissus-pseudonarcissus-narcis-zluty> [cit. 2021-03-10]
- ³⁵ *Leucojum vernalis*. *Portál české flóry*. Vašut R. J., Duchoslav M., Dančák M. (eds) <http://flora.upol.cz/kvetena/info/7241-Leucojum-vernalis.html> [cit. 2021-03-10]
- ³⁶ *Leucojum aestivum*. *Portál české flóry*. Vašut R. J., Duchoslav M., Dančák M. (eds) <http://flora.upol.cz/kvetena/info/7240-Leucojum-aestivum.html> [cit. 2021-03-10]
- ³⁷ *Galanthus nivalis*. *Portál české flóry*. Vašut R. J., Duchoslav M., Dančák M. (eds) <http://flora.upol.cz/kvetena/info/6609-Galanthus-nivalis.html> [cit. 2021-03-10]

- ³⁸ Fennell C.W., van Staden J. Crinum species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, 78(1), 15-26.
- ³⁹ Balogun F., Ashafa A. A review of plants used in South African traditional medicine for the management and treatment of hypertension. *Planta Medica*. 2019, 85(4), 312-334.
- ⁴⁰ Stafford G. I., Pedersen M. E., van Staden J., Jäger A. K. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 119(3), 513-537.
- ⁴¹ Nair J. J., Van Staden J. Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2014, 151(1), 12-26.
- ⁴² Nair J. J., van Staden J., Bonnet S. L., Wilhelm A. Distribution and diversity of usage of the Amaryllidaceae in the traditional remediation of infectious diseases. *Natural Product Communications*. 2017, 12(4), 635-639.
- ⁴³ Lipovská K. *Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ⁴⁴ Berkov S., Osorio E., Viladomat F., Bastida J. *The Alkaloids: Chemistry and Biology. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids*. Volume 83. Elsevier, 2020.
- ⁴⁵ Desgagné-Penix I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*. April 2021, 20, 409–431.
- ⁴⁶ Takos A., Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(6), 11713-11741.
- ⁴⁷ Jin Z., Yao G. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*. 2019, 36(10), 1462-1488.
- ⁴⁸ Masi M., Di Lecce R., Cimmino A., Evidente A. Advances in the chemical and biological characterization of Amaryllidaceae alkaloids and natural analogues isolated in the last decade. *Molecules*. 2020, 25(23), 5621.
- ⁴⁹ Al Mamun A., Maříková J., Hulcová D., Janoušek J., Šafratová M., Nováková L., Kučera T., Hrabínová M., Kuneš J., Korábečný J., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*. 2020, 10(5), 800.
- ⁵⁰ Šafratová M. *Studium inhibičního (toxického) vlivu alkaloidů vybraných druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae na některé lidské enzymové systémy (in vitro studie) III*. Hradec

- Králové, 2016. Doktorská dizertačná práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ⁵¹ Jin Z. Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Natural Product Reports*. 2011, 28(6), 1126–1142.
- ⁵² Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Hošťálková A., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Opletal L., De Simone A., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2019, 165, 112055.
- ⁵³ Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*. 2018, 41(2), 208-218.
- ⁵⁴ Kohelová E., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Jun D., Chlebek J., Jenčo J., Šafratová M., Hrabínová M., Ritomská A., Malaník M., Peřinová R., Breiterová K., Kuneš J., Nováková L., Opletal L., Cahlíková L. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*. 2021, 107, 104567.
- ⁵⁵ Maříková J., Al Mamun A., Al Shammari L., Korábečný J., Kučera T., Hulcová D., Kuneš J., Malaník M., Vašková M., Kohelová E., Nováková L., Cahlíková L., Pour M. Structure elucidation and cholinesterase inhibition activity of two new minor Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules*. 2021, 26(5), 1279.
- ⁵⁶ Nair J. J., van Staden J. Cell cycle modulatory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Life Sciences*. November 2018, 213, 94-101.
- ⁵⁷ Akhtar M. F., Saleem A., Rasul A., Faran A. B. M. M., Bin-Jumah M., Abdel D. M. M. Anticancer natural medicines: An overview of cell signaling and other targets of anticancer phytochemicals. *European Journal of Pharmacology*. December 2020, 888, 173488.
- ⁵⁸ Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. Amaryllidaceae family alkaloids as potential drugs for cancer treatment. *Chem. Listy*. 2013, 107(9), 701–708.
- ⁵⁹ Cahlíková L., Kawano I., Řezáčová M., Blunden G., Hulcová D., Havelek R. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews*. 2021, 20(1), 303-323.
- ⁶⁰ Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids

- against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*. September 2015, 13, 394-398.
- ⁶¹ Pellegrino S., Meyer M., Zorbas C., Bouchta S. A., Saraf K., Pelly S. C., Yusupova G., Evidente A., Mathieu V., Kornienko A., Lafontaine D. L. J., Yusupov M. The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth. *Structure*. 2018, 26(3), 416-425.
- ⁶² Havelek R., Seifrtová M., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L., Dalecká M., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*. 2014, 21(4), 479-490.
- ⁶³ Seifrtová M., Havelek R., Cahlíková L., Hulcová D., Mazánková N., Řezáčová M. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21 WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine*. November 2017, 35, 1-10.
- ⁶⁴ Likhitwitayawuid K., Angerhofer C. K., Chai H., Pezzuto J. M., Cordell G. A., Ruangrunsi N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*. 1993, 56(8), 1331-1338.
- ⁶⁵ Nair J. J., Rárová L., Strnad M., Bastida J., Cheesman L., van Staden J. Crinine alkaloids of the Amaryllidaceae with cytotoxic effects in human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells. *Natural Product Communications*. 2014, 9(4), 461-466.
- ⁶⁶ McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*. 2007, 68(7), 1068-1074.
- ⁶⁷ Khumkhong P., Piboonprai K., Chaichompoo W., Pimtong W., Khongkow M., Namdee K., Jantimaporn A., Japrungrung D., Asawapirom U., Suksamrarn A., Iempridee T. Crinamine induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and angiogenesis in cervical cancer SiHa cells. *Biomolecules*. 2019, 9(9), 494.
- ⁶⁸ Adekanmi A. E., Fouche G., Steenkamp V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, 143(2), 572-578.
- ⁶⁹ Abebe B., Tadesse S., Hymete A., Bisrat D., Dey G. Antiproliferative effects of alkaloids from the bulbs of *Crinum abyssinicum* Hochst. ExA. Rich. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. October 2020, 2020, 2529730.
- ⁷⁰ Arai M. A., Akamine R., Sadhu S. K., Ahmed F., Ishibashi M. Hedgehog/GLI-mediated transcriptional activity inhibitors from *Crinum asiaticum*. *Journal of Natural Medicines*. 2015, 69(4), 538-542.

- ⁷¹ Stanko P. Nové liečivá v EÚ registrované v roku 2013 (II.). *Prakt. lekárn.* 2014, 4(1), 30-31.
- ⁷² Uyeo S., Kotera K., Okada T., Takagi S., Tsuda Y. Occurrence of the alkaloids vittatine and haemanthamine in *Lycoris radiata* HERB. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1966, 14(7), 793-794.
- ⁷³ Hao B., Shen S.-F., Zhao Q.-J. Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Molecules.* 2013, 18(3), 2458-2468.
- ⁷⁴ Katoch D., Kumar D., Sharma U., Kumar N., Padwad Y. S., Lal B., Singh B. Zephgrabetaine: a new betaine-type Amaryllidaceae alkaloid from *Zephyranthes grandiflora*. *Natural Product Communications.* 2013, 8(2), 161-164.
- ⁷⁵ Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., Breiterová K., Blunden G., Hulcová D., Opletal L. The genus *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae): ethnobotany, phytochemistry, and biological activity. *Molecules.* 2019, 24(23), 4238.
- ⁷⁶ Cedrón J. C., Ravelo Á., León L., Padrón J., Estévez-Braun A. Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules.* 2015, 20(8), 13854-13863.
- ⁷⁷ Nair J. J., Bastida J., Viladomat F., van Staden J. Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications.* 2012, 7(12), 1677-1688.
- ⁷⁸ Vlček J., Fialová D., Kulič F., Macek K., Rokyta R., Rudolf K., Šonka K., Tilšer I., Topinková E., Tůma I., Zárubová J. *Klinická farmacie I.* Grada, 2010.
- ⁷⁹ Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules.* 2020, 25(24), 5789.
- ⁸⁰ Špilovská K., Korábečný J., Kuča K., Musílek K. Inhibitory gamma-sekretázy v terapii Alzheimerovej choroby. *Čes. slov. Farm.* 2012, 61(3), 93-100.
- ⁸¹ Sharma P., Srivastava P., Seth A., Tripathi P. N., Banerjee A. G., Shrivastava S. K. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology.* March 2019, 174, 53-89.
- ⁸² Wang L., Bharti, Kumar R., Pavlov P. F., Winblad B. Small molecule therapeutics for tauopathy in Alzheimer's disease: Walking on the path of most resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry.* January 2021, 209, 112915.
- ⁸³ Brunovský M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi.* 2007, 8(2), 112-117.

- ⁸⁴ Zhe Ying H., Shintu M., Keng Yoon Y. Butyrylcholinesterase: A multifaceted pharmacological target and tool. *Current Protein & Peptide Science*. 2020, 21(1), 99-109.
- ⁸⁵ Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*. June 2015, 103, 192-196.
- ⁸⁶ Prokopová I. Pharmacotherapy of Alzheimer disease and neuropsychiatric symptoms of dementia. *Psychiatrie pro praxi*. 2018, 19(1), 7-10.
- ⁸⁷ Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2013, 10(6), 1120-1127.
- ⁸⁸ Ortiz J. E., Garro A., Pigni N. B., Agüero M. B., Roitman G., Slanis A., Enriz R. D., Feresin G. E., Bastida J., Tapia A. Cholinesterase-inhibitory effect and *in silico* analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species. *Phytomedicine*. January 2018, 39, 66-74.
- ⁸⁹ Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., Hulcová D., Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances*. 2016, 6(83), 80114-80120.
- ⁹⁰ Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules*. 2018, 23(4), 719.
- ⁹¹ Kwon H.-C., Cha J.-W., Park J.-S., Chun Y.-S., Moodley N., Maharaj V. J., Youn S.-H., Chung S.-K., Yang H.-O. Rapid identification of bioactive compounds reducing the production of amyloid β -peptide (A β) from South African plants using an automated HPLC/SPE/HPLC coupling system. *Biomolecules and Therapeutics*. 2011, 19(1), 90-96.
- ⁹² Ločárek M., Nováková J., Klouček P., Hošťálková A., Kokoška L., Gábrlová L., Šafratová M., Opletal L., Cahlíková L. Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species. *Natural Product Communications*. 2015, 10(9), 1537-1540.
- ⁹³ He J., Qi W.-B., Wang L., Tian J., Jiao P.-R., Liu G.-Q., Ye W.-C., Liao M. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2013, 7(6), 922-931.

- ⁹⁴ Kaya G. I., Sarıkaya B., Onur M. A., Somer N. U., Viladomat F., Codina C., Bastida J., Lauinger I. L., Kaiser M., Tasdemir D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochemistry Letters*. 2011, 4(3), 301-305.
- ⁹⁵ Tallini L., Andrade J., Kaiser M., Viladomat F., Nair J., Zuanazzi J., Bastida J. Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules*. 2017, 22(9), 1437.
- ⁹⁶ Tallini L., Osorio E., Santos V., Borges W., Kaiser M., Viladomat F., Zuanazzi J., Bastida J. *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): alkaloid profiling, biological activities and molecular docking. *Molecules*. 2017, 22(12), 2191.
- ⁹⁷ Campbell W. E., Nair J. J., Gammon D. W., Codina C., Bastida J., Viladomat F., Smith P. J., Albrecht C. F. Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. *Phytochemistry*. 2000, 53(5), 587-591.
- ⁹⁸ Nair J. J., van Staden J. The Amaryllidaceae as a source of antiplasmodial crinine alkaloid constituents. *Fitoterapia*. April 2019, 134, 305-313.
- ⁹⁹ Abdel-Halim O. B., Morikawa T., Ando S., Matsuda H., Yoshikawa M. New crinine-type alkaloids with inhibitory effect on induction of inducible nitric oxide synthase from *Crinum yemense*. *Journal of Natural Products*. 2004, 67(7), 1119-1124.
- ¹⁰⁰ Naidoo D., Roy A., Slavětínská Poštová L., Chukwujekwu J. C., Gupta S., Van Staden J. New role for crinamine as a potent, safe and selective inhibitor of human monoamine oxidase B: *In vitro* and *in silico* pharmacology and modeling. *Journal of Ethnopharmacology*. February 2020, 248, 112305.
- ¹⁰¹ McNulty J., Nair J. J., Bastida J., Pandey S., Griffin C. Structure activity studies on the crinine alkaloid apoptosis-inducing pharmacophore. *Natural Product Communications*. 2009, 4(4), 483-488.
- ¹⁰² Jitsuno M., Yokosuka A., Sakagami H., Mimaki Y. Chemical constituents of the bulbs of *Habranthus brachyandrus* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2009, 57(10), 1153-1157.
- ¹⁰³ Luchetti G., Johnston R., Mathieu V., Lefranc F., Hayden K., Andolfi A., Lamoral-Theys D., Reisenauer M. R., Champion C., Pelly S. C., van Otterlo W. A. L., Magedov I. V., Kiss R., Evidente A., Rogelj S., Kornienko A. Bulbispermine: a crinine-type Amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem*. 2012, 7(5), 815-822.
- ¹⁰⁴ Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, 20(18), 5464-5472.

- ¹⁰⁵ Bodoríková V. *Syntéza derivátov haemathamínu a ich biologická aktivita*. Hradec Králové, 2019. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁰⁶ Kavková Z. *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁰⁷ Marková J. *Syntéza derivátů haemanthaminu*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁰⁸ Homolková L. *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidu haemanthaminu jako potenciální léčiva*. Hradec Králové, 2019. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁰⁹ Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., Martínez G. L., Hrabínova M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L. Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. *Molecules*. 2019, 24(7), 1307.
- ¹¹⁰ Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Kohelová E., De Simone A., Al Mamun A., Hulcová D., Marková J., Kučera T., Jun D., Šafratová M., Maříková J., Andrisano V., Jenčo J., Kuneš J., Martinez A., Nováková L., Cahlíková L. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*. July 2020, 100, 103928.
- ¹¹¹ Substance Detail. *SciFinder N. CAS*, c2021 <https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/substance/60707def04cee7077e0059b7/substanceDetails> [cit. 2021-04-09].
- ¹¹² Vittatine. *PubChem*. National center for biotechnology information, 2021 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443693> [cit. 2021-04-09].
- ¹¹³ Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2013, 10(6), 1120-1127.
- ¹¹⁴ Boit H.-G. Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*. 1956, 89(5), 1129-1134.
- ¹¹⁵ Feinstein A. I., Wildman W. C. Biosynthetic oxidation and rearrangement of vittatine and its derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*. 1976, 41(14), 2447-2450.
- ¹¹⁶ Kilgore M. B., Kutchan T. M. The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry Reviews*. 2016, 15(3), 317-337.

- ¹¹⁷ de Andrade J. P., Guo Y., Font-Bardia M., Calvet T., Dutilh J., Viladomat F., Codina C., Nair J. J., Zuanazzi J. A. S., Bastida J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*. 2014, 103, 188-195.
- ¹¹⁸ de Andrade J. P., Berkov S., Viladomat F., Codina C., Zuanazzi J. A. S., Bastida J. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*. 2011, 16(8), 7097-7104.
- ¹¹⁹ Öhlschlegelová J. *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod Hippeastrum*. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹²⁰ Al Shammari L., Al Mamun A., Koutová D., Majorošová M., Hulcová D., Šafratová M., Breiterová K., Maříková J., Havelek R., Cahlíková L. Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Records of Natural Products*. 2020, 14(2), 154-159.
- ¹²¹ Cahlíková L., Valterová I., Macáková K., Opletal L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011, 21(4), 575-580.
- ¹²² Bastida J., Contreras J., Codina C., Wright C. W., David P. J. Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry*. 1995, 40(5), 1549-1551.
- ¹²³ Berkov S., Martínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. March 2014, 99, 95-106.
- ¹²⁴ Cahlíková L., Breiterová K., Opletal L. Chemistry and biological activity of alkaloids from the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Molecules*. 2020, 25(20), 4797.
- ¹²⁵ Kaya G. I., Unver-Somer N., Gözler B., Bastida J. (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2004, 32(11), 1059-1062.
- ¹²⁶ Emir A., Emir C., Bozkurt B., Ali O. M., Bastida J., Unver-Somer N. Alkaloids from *Galanthus fosteri*. *Phytochemistry Letters*. September 2016, 17, 167-172.
- ¹²⁷ Kihara M., Koike T., Imakura Y., Kida K., Shingu T., Kobayashi S. Alkaloidal constituents of *Hymenocallis rotata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1987, 35(3), 1070-1075.
- ¹²⁸ Maroyi A. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties of *Crinum bulbispermum* (Burm f) Milne-Redh and Schweick (Amaryllidaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016, 15(11), 2497-2506.
- ¹²⁹ N'Tamon A. D., Okpekon A. T., Bony N. F., Bernadat G., Gallard J.-F., Kouamé T., Séon-Méniel B., Leblanc K., Rharrabti S., Mouray E., Grellier P., Ake M., Amin N'Cho Ch., Champy P., Beniddir M. A., Le Pogam P. Streamlined targeting of Amaryllidaceae

- alkaloids from the bulbs of *Crinum scillifolium* using spectrometric and taxonomically-informed scoring metabolite annotations. *Phytochemistry*. 2020, 179, 112485.
- ¹³⁰ Bozkurt B., Kaya G. I., Ali O. M., Unver-Somer N. Chemo-profiling of some Turkish *Galanthus* L. (Amaryllidaceae) species and their anticholinesterase activity. *South African Journal of Botany*. January 2021, 136, 65-69.
- ¹³¹ Torras-Claveria L., Berkov S., Jáuregui O., Caujapé J., Viladomat F., Codina C., Bastida J. Metabolic profiling of bioactive *Pancratium canariense* extracts by GC-MS. *Phytochemical Analysis*. 2010, 21(1), 80-88.
- ¹³² Kihara M., Konishi K., Xu L., Kobayashi S. Alkaloidal constituents of the flowers of *Lycoris radiata* Herb. Amaryllidaceae. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1991, 39(7), 1849-1853.
- ¹³³ Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., Touema S. M., Hammouda H. M., Shawky E., Motta A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*. 2004, 65(14), 2113-2118.
- ¹³⁴ Georgiev V., Ivanov I., Pavlov A. Recent progress in Amaryllidaceae biotechnology. *Molecules*. 2020, 25(20), 4670.
- ¹³⁵ Zayed R., El-Shamy H., Berkov S., Bastida J., Codina C. *In vitro* micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum vittatum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2011, 47(6), 695-701.
- ¹³⁶ Trujillo-Chacón L. M., Pastene-Navarrete E. R., Bustamante L., Baeza M., Alarcón-Enos J. E., Cespedes-Acuña C. L. In vitro micropropagation and alkaloids analysis by GC-MS of Chilean Amaryllidaceae plants: *Rhodophiala pratensis*. *Phytochemical Analysis*. 2019, 31(1), 46-56.
- ¹³⁷ Bohno M., Imase H., Chida N. A new entry to Amaryllidaceae alkaloids from carbohydrates: total synthesis of (+)-vittatine. *Chemical Communications*. 2004, (9), 1086-1087.
- ¹³⁸ Wei, M.-X., Wang, C.-T., Du, J.-Y., Qu, H., Yin, P.-R., Bao, X., Ma, X.-Y., Zhao, X.-H., Zhang, G.-B. and Fan, C.-A. Enantioselective synthesis of Amaryllidaceae alkaloids (+)-vittatine, (+)-epi-vittatine, and (+)-buphanisine. *Chemistry - An Asian Journal*. 2013, 8(9), 1966-1971.
- ¹³⁹ Zuo X.-D., Guo S.-M., Yang R., Xie J.-H., Zhou Q.-L. Bioinspired enantioselective synthesis of crinine-type alkaloids via iridium-catalyzed asymmetric hydrogenation of enones. *Chemical Science*. 2017, 8(9), 6202-6206.
- ¹⁴⁰ 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*. 2018, 20(15), 4421-4424.
- ¹⁴¹ Silva A. F. S., de Andrade J. P., Machado K. R. B., Rocha A. B., Apel M. A., Sobral M. E. G., Henriques A. T., Zuanazzi J. A. S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*. 2008, 15(10), 882-885.
- ¹⁴² Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961, 7(2), 88-95.
- ¹⁴³ Žďárová Karasová J., Kuča K., Jun D., Bajgar J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. 2010, 104(1), 46-50.
- ¹⁴⁴ Hošťálková A., Maříková J., Opletal L., Korábečný J., Hulcová D., Kuneš J., Nováková L., Perez D. I., Jun D., Kučera T., Andrisano V., Siatka T., Cahlíková L. Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Natural Products*. 2019, 82(2), 239-248.
- ¹⁴⁵ Zeman J., Vetchý D., Franc A., Pitschmann V. Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. *Chemické listy*. 2018, 112(7), 434-439.
- ¹⁴⁶ Berridge M. V., Tan A. S. Trans-plasma membrane electron transport: A cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma*. 1998, 205(1-4), 74-82.
- ¹⁴⁷ Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., Majorošová M., Opletal L., Hošťálková A., Jenčo J., Řezáčová M., Cahlíková L. Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and their cytotoxic activity. *Plants*. 2020, 9(2), 137.
- ¹⁴⁸ *Protocol Guide: WST-1 assay for cell proliferation and viability*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html> [cit. 2020-11-04]
- ¹⁴⁹ Potůčková A. *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a jejich biologická aktivita*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁵⁰ Pidaný F. *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a ich biologická aktivita: deriváty tazettínu I*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

- ¹⁵¹ Zelina D. *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidov a ich biologická aktivita: Deriváty tazettínu II.* Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ¹⁵² Maříková J., Ritomská A., Korábečný J., Peřinová R., Al Mamun A., Kučera T., Kohelová E., Hulcová D., Kobrlová T., Kuneš J., Nováková L., Cahlíková L. Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products*. 2020, 83(5), 1359-1367.
- ¹⁵³ Li Q., Chen Y., Xing S., Liao Q., Xiong B., Wang Y., Lu W., He S., Feng F., Liu W., Chen Y., Sun H. Highly potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors for cognitive improvement and neuroprotection. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, 64(10), 6856-6876.
- ¹⁵⁴ Andrisano V., Naldi M., De Simone A., Bartolini M. A patent review of butyrylcholinesterase inhibitors and reactivators 2010–2017. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018, 28(6), 455-465.