

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ
BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus* sp. II
Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. II

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

Vedoucí katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková Ph.D.

Hradec Králové, květen 2022

Franciska Saaková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 550.

Tímto prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem a vedením PharmDr. Daniely Hulcové, Ph.D.

Veškeré zdroje a literatura, kterou jsem při vypracování práce použila a ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citované. Tato práce nebyla vytvořena za účelem získání jiného titulu nebo stávajícího titulu.

V Hradci Králové, květen 2022

Saaková Franciska

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za její odborné vedení, poskytnuté konzultace, rady a především za trpělivost a ochotu být vždy nápomocná. V neposlední řadě děkuji také za asistenci během experimentální části a za její čas strávený v laboratoři při stanovení inhibičních aktivit sumárních alkaloidních extraktů.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
	Teoretická část.....	3
3	Čeleď Amaryllidaceae.....	3
3.1	Základní charakteristika	3
3.2	Rod <i>Narcissus</i> sp.	4
3.3	Kultivary narcisů použité v experimentální části.....	5
3.3.1	<i>Narcissus</i> cv. Daydream.....	5
3.3.2	<i>Narcissus</i> cv. Gay kybo.....	5
3.3.3	<i>Narcissus</i> cv. High Society	6
3.3.4	<i>Narcissus</i> cv. Love Call	7
3.3.5	<i>Narcissus</i> cv. Peach and Cream	7
3.3.6	<i>Narcissus</i> cv. Sunny Girlfriend	8
3.3.7	<i>Narcissus</i> cv. Yellow Salome.....	9
4	Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae	10
4.1	Biosyntéza alkaloidů	11
4.2	Strukturní typy alkaloidů.....	14
4.2.1	Lykorinový strukturní typ	14
4.2.2	Homolykorinový strukturní typ.....	17
4.2.3	Haemathaminový a krininový strukturní typ	17
4.2.4	Narciklasinový strukturní typ.....	18
4.2.5	Tazettinový strukturní typ	20
4.2.6	Montaninový strukturní typ.....	21
4.2.7	Galanthaminový strukturní typ.....	23
5	Nové izolované alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae	25
5.1	Giganteliin, Gigantellin a Gigankrinin.....	25
5.2	4, 8-dimethoxy-kripovelin C a D, 9-methoxy-kripovelin B, a 4-methoxy-8-hydroxy-kripovelin B	26
5.3	Scillitazettin, Scilli- <i>N</i> -desmethylpretazettin, 3- <i>O</i> -acetylvitattin a 4'- <i>O,N</i> -dimethylnorbelladin <i>N</i> -oxid	28
5.4	Narcipavlin a Narcikachnin.....	28
5.5	Karltonin A, B a C.....	29
5.6	Narcimutalin.....	31
5.7	Oxoinkartin, 3,11- <i>O</i> -diacetyl-9- <i>O</i> -demethylmaritidin a 11- <i>O</i> -acetyl-9- <i>O</i> -demethylmaritidin.....	32
5.8	Sarniensin, Krinsarnin a Sarniensinol	32
5.9	1,4-dihydroxy-3-methoxy povellan.....	34

5.10	Zephykandidin I, II a III	34
5.11	9- <i>O</i> -demethyl-11 β -hydroxygalanthamin, <i>N</i> -hydroxykarbonylpropyl-5,6-dihydroplikan, <i>N</i> -fenethyl-5,6 dihydroplikan, <i>N</i> -3-indolyethyl-5,6-dihydroplikan, Biliquin <i>N</i> -oxid a <i>N</i> -isopentyl-11,12-seco-5,6-dihydroplikan.....	35
5.12	Zephygraniditin A, B, C, D, E a F.....	36
5.13	Zephykarinatin F a I	37
5.14	6 α -ethoxyhippeastidin, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin, narcieliin, zephyjanin, zephycitrin I, 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol a zephycitrin II	38
6	Experimentální část	40
6.1	Všeobecné postupy	40
6.1.1	Destilace	40
6.2	Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení pro izolaci alkaloidů	40
6.2.1	Chemikálie, rozpouštědla a pomocný materiál	40
6.2.2	Přístrojové vybavení.....	40
6.2.3	Databáze použité k vyhodnocení výsledků	40
6.3	Příprava sumárních extraktů.....	41
6.3.1	Použitý rostlinný materiál	41
6.3.2	Průběh extrakce cibulí	41
6.3.3	Zpracování extraktu.....	41
6.4	GC-MS analýza a identifikace alkaloidů	42
6.5	Stanovení inhibiční aktivity vůči humánní AChE a BuChE	42
6.5.1	Chemikálie	42
6.5.2	Tlumivý roztok	43
6.5.3	Činidla	43
6.5.4	Přístrojové vybavení a použité programy.....	43
6.5.5	Rekombinantních enzymy	43
6.5.6	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	43
7	Výsledky.....	45
7.1	Chromatogramy jednotlivých sumárních extraktů	45
7.2	Zastoupené alkaloidy v jednotlivých kultivarech.....	52
7.3	Výtěžky ethanolových a alkaloidních extraktů	52
7.4	Inhibiční aktivita sumárních alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE	53
8	Diskuze a závěr	54
9	Abstrakt	56
10	Abstract	57
11	Zdroje	58

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1. <i>Narcissus</i> cv. Daydream.....	5
Obrázek 2. <i>Narcissus</i> cv. Gay Kybo].....	6
Obrázek 3. <i>Narcissus</i> cv. High Society	6
Obrázek 4. <i>Narcissus</i> cv. Love Call.....	7
Obrázek 5. <i>Narcissus</i> cv. Peach and Cream	8
Obrázek 6. <i>Narcissus</i> cv. Sunny Girlfriend	8
Obrázek 7. <i>Narcissus</i> cv. Yellow Salome.....	9
Obrázek 8. Biosyntéza alkaloidů	13
Obrázek 9. Lykordinové strukturní typy	16
Obrázek 10. Homolykordinové strukturní typy	17
Obrázek 11. Haemanthaminové a krininové strukturní typy	18
Obrázek 12. Narciklasinové strukturní typy	20
Obrázek 13. Tazettinové strukturní typy	21
Obrázek 14. Montaninové strukturní typy	23
Obrázek 15. Galanthaminové strukturní typy	24
Obrázek 16. Gigantelin (1), gigantellin (2), gigakrinin (3), flexinin (4)	26
Obrázek 17. 4,8-dimethoxy-kripovelin C (1), 4,8-dimethoxy-kripovelin D (2), 9-methoxy- kripovelin C (3), 4-methoxy-8-hydroxy-kripovelin B (4)	27
Obrázek 18. Scilitazettin (1), scilli- <i>N</i> -desmethylpretazettin (2), 3- <i>O</i> -acetilvitattin (3) a 4'- <i>O,N</i> -dimethylnorbelladin <i>N</i> -oxid (4)	28
Obrázek 19. Narcipavlin (1) a narcikachnin (2)	29
Obrázek 20. Karltonin A (1), B (2) a C (3).....	30
Obrázek 21. Narcimutalin	31
Obrázek 22. Oxoinkartin (1), 3,11- <i>O</i> -diacetyl-9- <i>O</i> -demethylmaritidin (2) a 11- <i>O</i> -acetyl-9- <i>O</i> - demethylmaritidin (3)	32
Obrázek 23. Sarniensin (1), sarniensinol (2) a krinsarnin (3).....	33
Obrázek 24. 1,4-dihydroxy-3-methoxy povellan	34
Obrázek 25. Zephykandidin I (1), II (2) a III (3)	35
Obrázek 26. 9- <i>O</i> -demethyl-11 β -hydroxygalanthamin (1), <i>N</i> -hydroxykarbonylpropyl-5,6-dihydroplikan (2), <i>N</i> -fenethyl-5,6-dihydroplikan	

(3), <i>N</i> -3-indolyethyl-5,6-dihydroplikan (4), Biliquin <i>N</i> -oxid (5) a <i>N</i> -isopentyl-11,12-seco-5,6-dihydroplikan (6)	36
Obrázek 27. Zephygranditin A (1), B (2), C (3), D (4), E (5) a F (6)	37
Obrázek 28. Zephykarinatin F (1) a I (2)	38
Obrázek 29. 6 α -ethoxyhippeastidin (1), 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin (2), narcieliin (3), zephyjanin (4), zephycitrin I (5), 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol (6) a zephycitrin II (7)	39
Obrázek 31. chromatogram sumárního extraktu AL-725	46
Obrázek 32. chromatogram sumárního extraktu AL-728	47
Obrázek 33. chromatogram sumárního extraktu AL-734	48
Obrázek 34. chromatogram sumárního extraktu AL-739	49
Obrázek 35. chromatogram sumárního extraktu AL-743	50
Obrázek 36. chromatogram sumárního extraktu AL-745	51
Tabulka 1. Přehled obsažených alkaloidů v kultivarech	52
Tabulka 2. Výtěžky ethanolových a alkaloidních extraktů	52
Tabulka 3. Přehled inhibičních aktivit testovaných extraktů vůči AChE/BuChE	53

Seznam zkratek

AChE	acetylcholinesterasa
BuChE	butyrylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
NO	oxid dusnatý
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace
A549	adenokarcinom plic
MCF-7	adenokarcinom prsu
HeLA	karcinomu děložního čípku
MNTD	maximální netoxická dávka
PMST	prodloužením mediánu doby přežití
MOLT-4	akutní lymfoblastická leukémie
MIC	minimální inhibiční koncentrace
Jurkat	akutní T-buněčná leukémie
HT-29	karcinom tlustého střeva
PANC-1	karcinom slinivky břišní
A2780	ovariální karcinom
SAOS-2	osteogenní sarkom
HT-29	karcinom tlustého střeva
1D NMR	jedno dimenzionální nukleární magnetická rezonance
2D NMR	dvou dimenzionální nukleární magnetická rezonance
1H NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
13C NMR	uhlíková nukleární magnetická rezonance
HRESIMS	high resolution electrospray ionisation mass spektrometry (hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem s vysokým rozlišením)
ECD	electronic circular dichroism (elektronický cirkulární dichroismus)
COX-1	cyklooxygenasa 1
COX-2	cyklooxygenasa 2
SC-560	selektivní inhibitor COX-1
NS-398	<i>N</i> -(2-cyklohexyloxy-4-nitrofenyl)methansulfoamid, selektivní inhibitor COX-2
MS	hmotnostní spektrometrie
gHMBC	heteronuclear multiple bond coherence (heteronukleární korelace více vazeb)
POP	prolyl oligopeptidasa (cytosolová serinová proteasa)

HRMS high resolution mass spektrometry (vysoko účinná hmotností spektrometrie)
LD₅₀ 50% latentní dávka
RAW 264,7 myší makrofágová buněčná linie

1 Úvod

Lidská společnost byla od počátku svého vzniku v úzkém kontaktu se svým prostředím a zdroje, které v přírodě nacházela, využívala kromě příjmu potravy také k léčení nemocí. Získávání poznatků a zkušeností bylo tehdy realizováno prostřednictvím metody pokus omyl a tyto informace se následně předávaly z generace na generaci [1].

Nejstarší důkazy o používání rostlin jako léku pocházejí ze 4000 let starých asyrských tabulek psaných klínovým písmem. V tabulkách je uvedeno přibližně 250 různých rostlin včetně těch, co obsahují alkaloidy jako např. *Papaver somniferum* nebo *Atropa belladonna*. Raná „farmakognozie“ dosáhla vrcholu s Hippokratem v období 460-377 př. n. l., který kriticky zhodnotil více než 200 léčivých rostlin. Svou medicínu založil na empirických důkazech a jako takovou ji osvobodil od mýtické minulosti. Již v této době byly známé některé účinky rostlin z čeledi Amaryllidaceae, např. Hippokrates doporučoval narcisový olej získávaný z *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy. Významný mezník přichází s Dioskoroidésem, který ve svém díle *De materia medica* popsal přes 500 léčivých rostlin pro více než 50 indikací. Sbírkou sloužila jako herbář a z informací, které obsahovala, se vycházelo až do středověku [2].

Tradiční rostlinná medicína se v rozvojových i rozvinutých zemích používá již přes tisíce let. Hojně je využívána především v Asii, Africe nebo Latinské Americe a často je označována jako alternativní nebo doplňková medicína. Více než 80 % světové populace se dle WHO (světová zdravotnická organizace) spoléhá na tradiční léčiva (převážně rostliny). Fytoterapie je široce využívána po celém světě a zájem o ní stále roste. Celosvětový trend syntetických sloučenin se tak postupně obrací zpět k rostlinným léčivům. Díky tomuto zvýšenému zájmu o rostlinná léčiva po celém světě je třeba přesně a komplexně studovat otázky týkající se kvality, bezpečnosti a účinnosti. Na rozdíl od používání celých rostlin nebo jejich částí, jak tomu bylo v minulosti, se dnes upřednostňuje izolace sloučenin nebo čistých látek s konkrétní biologickou aktivitou. Důvodem jsou změny obsahu látek v rostlinách, které mohou nastat vlivem různých klimatických podmínek. V důsledku špatného skladování nebo podmínek transportu může docházet také ke změně nebo ztrátě biologické aktivity. Jednou z dalších překážek je i úbytek rostlinných druhů. Odhaduje se, že 50000 až 80000 rostlinných druhů se používá k farmaceutickým účelům a z tohoto počtu je asi 15000 druhů vystaveno riziku vyhynutí v důsledku nadměrného sběru a ničení stanovišť, proto je důležité vzít v úvahu i etický kodex ochrany životního prostředí. I přes tato rizika mají rostliny významnou pozici v terapii řady chorob. Na světě existuje přes půl milionu rostlin a většina z nich nebyla doposud lékařsky zkoumána [2].

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je:

- Zpracování teoretické části, zaměřené na problematiku zadaných taxonomických jednotek, tj. jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus sp.* z čeledi Amaryllidaceae (zařazení, struktura, výskyt, biosyntéza alkaloidů, biologická aktivita apod.)
- Druhá část je soustředěna na nové izolované alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae v posledních 5 letech (2016 až 2022)
- Příprava sumárních alkaloidních extraktů
- GC-MS analýza sumárních alkaloidních extraktů a její následné vyhodnocení
- Stanovení inhibiční aktivity sumárních alkaloidních extraktů vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase (AChE, BuChE)
- Shrnutí výsledků a sepsání diplomové práce

Teoretická část

3 Čeleď Amaryllidaceae

Amaryllidaceae (Amarylkovité) jsou řazeny do řádu Amaryllidales spolu s dalšími farmaceuticky významnými čeledi jako jsou Hyacinthaceae a Agavaceae [3].

3.1 Základní charakteristika

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou jednoděložné, krytosemenné, vytrvalé byliny obvykle s cibulemi, méně často s hlízy nebo oddenky. Stonek tvoří zpravidla stvol. Listy jsou typicky střídavé, čárkovité, mohou být jen přízemní, ale také lodyžní. Vzácně může být čepel rozšířena [4]. Pro čeleď Amaryllidaceae, jsou charakteristické oboupohlavné květy se spodním semeníkem. Většinou jsou uspořádány do okolíkovitého nebo šroubelovitého květenství, ale mohou být i jednotlivé. Nerozlišené květní obaly jsou uspořádány ve 2 kruzích, jsou obvykle volné, pravidelné a zřídka srůstají na bázi. Plodem je tobolka nebo bobule [4].

Amaryllidaceae tvoří širokou čeleď zahrnující přibližně 1000 druhů až v 65 rodech [5]. Navzdory pantropickému rozšíření, jsou zástupci této čeledi významně zastoupeni ve třech rozdílných zeměpisných oblastech, počítaje Andy v Jižní Americe, Středomoří a jižní Afriku. Až jedna třetina z celkového počtu se nachází v Jihoafrické republice, přičemž většina z nich je zastoupená v květné říši Capensis v Západním Kapsku [6].

Do této čeledi patří řada okrasných druhů jako jsou narcisy (*Narcissus*), sněženky (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*), hvězdníky (*Hyppastrum*), klívie (*Clivia*) nebo kalokvěty (*Agapanthus*), které mají květy nejrůznějších tvarů a barev, díky čemuž jsou velmi žádané, jak pro domácí pěstování, tak pro květinářský průmysl. První místo v produkci evropských narcisů drží Velká Británie [6]. Mimo druhy pěstované zejména pro okrasný a ekonomický význam, je čeleď zajímavá především pro svůj obsah biologicky cenných alkaloidů, jejichž využití v tradičních léčebných postupech je možné vysledovat až do dob Hippokrata a Plinia [7]. V současnosti jsou alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae předmětem výzkumné činnosti, ale některé z nich, jako například galanthamin, jsou již používány v terapii Alzheimerovy choroby (AD) [5].

3.2 Rod *Narcissus* sp.

Rod *Narcissus* je považován za nejrozšířenější z čeledi Amaryllidaceae. Od ostatních rodů z této čeledi se liší přítomností perigonální korunní struktury, která tvoří prsteneček nebo trubku. Jsou to vytrvalé, víceleté byliny s cibulemi, které na spodní straně nesou adventní, nevětvené kořeny s výraznou kořenovou čepičkou. Horní část cibule se skládá z cibulových šupin, které obklopují pupen a plní funkci zásobních orgánů. Pupen roste po celý první rok a ve druhém roce iniciuje vznik květů. Květní stvol je bezlistý, jednoduchý a obsahuje velké množství škrobových zrn a rafidů šřavelanu vápenatého. Je zakončen jedním květem nebo květenstvím. Květy jsou oboupohlavné, obvykle jarní, jednotlivé a vonné [7]. Okvětí se skládá z 6 okvětních lístků ve dvou přeslenech srostlé v dolní části v okvětní trubku [8]. Listy, které mohou být čárkovité nebo laločnaté dorůstají do velikosti v rozmezí 5 cm - 1,2 m [9]. Plodem je tobolka [10].

Stanoviště narcisů jsou velmi pestrá, zahrnují pastviny, lesy, křoviny, břehy řek a skalní štěrbin. Většina druhů rozkvétá na jaře a po odkvětu dochází k rychlému stárnutí listů s následným klidovým obdobím [7].

V současnosti čítá rod 80 - 100 volně rostoucích druhů. Přestože je možné zařadit čeleď Amaryllidaceae jako celek mezi tropické a subtropické rostliny, zástupci rodu *Narcissus* jsou lokalizované hlavně ve středomoří s největší diverzitou na Pyrenejském poloostrově, vyskytují se také v jihozápadní Francii, severní Africe, v Itálii nebo na Balkáně [7].

Klasifikace tohoto rodu je obtížná vzhledem k přirozené hybridizaci, která je doprovázena šlechtěním, křížením a selekcí [11]. Výsledkem hybridizace jsou komerční kultivary, které jsou odolnější a větší než divoce rostoucí druhy. Bylo vyšlechtěno velké množství kultivarů zejména pro okrasné účely, např. kultivary s velkou korunou vznikly křížením *N. pseudonarcissus* a *N. poeticus*, vícehlavé kultivary křížením *N. poeticus* a *N. tazetta* [7].

V současnosti je v mezinárodním registru narcisů uvedeno více než 27 000 jmen kultivarů. Další výhodou je, že jsou dostupné ve větším měřítku pro komerční získávání alkaloidů. Z rostlin rodu *Narcissus* bylo izolováno přes 100 alkaloidů rozdílných strukturních typů. Kromě již výše zmíněného alkaloidu galanthaminu, který se používá v terapii AD a působí jako selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor acetylcholinesterasy, vykazují některé další alkaloidy také protinádorovou (haemanthamin, lykorin), antimalarickou, antivirovou nebo antimykotickou aktivitu [12].

3.3 Kultivary narcisů použité v experimentální části

Experimentální část této diplomové práce je zaměřená na získání alkaloidních extraktů a jejich následné vyhodnocení. Pro tento účel bylo vybráno sedm kultivarů. *Narcissus* cv. Daydream (Obrázek 1), *Narcissus* cv. Gay Kybo (Obrázek 2), *Narcissus* cv. High Society (Obrázek 3), *Narcissus* cv. Love Call (Obrázek 4), *Narcissus* cv. Peach and Cream (Obrázek 5), *Narcissus* cv. Sunny Girlfriend (Obrázek 6) a *Narcissus* cv. Yellow Salome (Obrázek 7).

3.3.1 *Narcissus* cv. Daydream

Kultivar je registrovaný od roku 1960. Jedná se o velkokvětý narcis dorůstající výšky 14 - 16 cm. Okvětní lístky zelenožluté barvy jsou široké a na vrcholu zaoblené, okraje mohou být zvlněné [13]. Pakorunka je válcovitá, hladká, zbarvená do žluta, ale postupně bledne a přechází do bílé barvy. Listy jsou úzké, čárkovité ve vzpřímených až rozložených trsech. Kvetे v dubnu, v polovině sezóny [14].



Obrázek 1. *Narcissus* cv. Daydream [14]

3.3.2 *Narcissus* cv. Gay kybo

Tento nápadný kultivar byl zaregistrován společností du Plessis Bros. v roce 1980 a pojmenován po slavném irském dostihovém koni [13, 15]. Šířka květu je v průměru 10 cm [16]. Vnější až šestičetné okvětní tvoří tupé, ohnuté a překrývající se okvětní lístky krémově-bílé barvy. Lístky pakorunky jsou proložené, ty nejbliže středu mají zprohýbaný okraj a jsou sytě oranžové barvy [13]. Díky centrálnímu shluku okvětních lístků s téměř růžicovým tvarem, je řazen mezi tzv. „dvojitě narcisy“. Dorůstá výšky 16 - 20 cm. Kvetе mezi dubnem a květnem [15].



Obrázek 2. *Narcissus* cv. Gay Kybo [15]

3.3.3 *Narcissus* cv. High Society

Za šlechtitele tohoto kultivaru je považován Brian S. Duncan ze Severního Irsku a je registrován od roku 1979 [13]. Okvětní lístky jasně bílé barvy jsou vejčité, hladké, někdy vroubkované, pravidelné, překrývající se do poloviny. Pakorunka je citronově žlutá, na bázi zelená a na okraji sytě růžová. Meruňkové ústí pakorunky je rozšířené a vroubkované [17]. Dorůstá do výšky v rozmezí 30 - 60 cm [18]. Kvete v polovině až na konci sezóny (březen až květen) [19]. Svým vzhledem je podobný kultivaru Bridesmaid [13].



Obrázek 3. *Narcissus* cv. High Society [18]

3.3.4 *Narcissus* cv. Love Call

Tento kultivar byl zaregistrován v roce 1962. Hybridizátorem tohoto kultivaru je J. Garritson a syn z Nizozemska. Vnější vejčité okvětní lístky bílé barvy se překrývají do poloviny. Vnitřní lístky jsou lopatkovitěho tvaru s vroubkovanými okraji. Až k bázi rozdělená pakorunka se skládá ze šesti nařasených, sytě oranžových lístků poloviční délky než lístky okvětní, se kterými se překrývají [13]. Dorůstá do výšky 30 - 60 cm, kvete na začátku až uprostřed sezóny [18].

Tento typ kultivaru je řazen mezi narcisy s dělenou pakorunkou může být označován také jako motýlokvětý narcis, pro který je charakteristické střídání pakorunních a okvětních lístků v šestiúhelníku [20, 21].



Obrázek 4. *Narcissus* cv. Love Call [22]

3.3.5 *Narcissus* cv. Peach and Cream

Jak již název napovídá, tento kultivar je tvořen krémově bílými zašpičatělými okvětními lístky s malou pakorunkou broskvové barvy, u které je patrný nařasený okraj [23]. Modrozelené čárkovité listy si zachovávají svou barvu po celou dobu sezóny [24]. Byl registrován před rokem 1950 cibulovou farmou v Oregonu v USA. Dorůstá do výšky 30 - 60 cm, kvete uprostřed až na konci sezóny [13].



Obrázek 5. *Narcissus* cv. Peach and Cream [22]

3.3.6 *Narcissus* cv. Sunny Girlfriend

Sladce vonící květ tohoto kultivaru je tvořen rozprostřenými, široce vejčitými okvětními lístky bílé barvy dosahující délky 4 cm. Lístky pakorunky o velikosti dvou třetin lístků okvětních jsou dvoulaločné, k bázi dělené, se silně zvlněnými okraji [13]. Lístky jsou na bázi žlutě zbarveny a k sytě meruňkovým okrajům přecházejí přes bílou barvu [25]. Dorůstá do výšky 40 cm [26]. Kultivar je registrovaný od roku 2009. Stejně jako u kultivaru Love Call je i zde hybridizátorem J. Garritson a syn z Nizozemska. Dalším společným znakem je zařazení mezi motýlokvěte narcisy [25].



Obrázek 6. *Narcissus* cv. Sunny Girlfriend [27]

3.3.7 *Narcissus* cv. **Yellow Salome**

Hybridizátorem tohoto kultivaru je Paul van Bentem z Nizozemska a je registrovaný od roku 2005. Průměr květu je 10,6 cm. Vnější krémově žluté okvětní lístky jsou vejčité, rozložené a rovné, kultivar je dále zdoben sytě žlutou pakorunkou s nařaseným ústím [13]. Dorůstá do výšky od 30 - 65 cm a kvete na konci sezóny [18]. Příbuzným kultivarem je Pink Salome [28].



Obrázek 7. *Narcissus* cv. **Yellow Salome** [18]

4 Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae

Jak již bylo zmíněno, čeleď Amaryllidaceae, tudíž i rod *Narcissus* obsahuje specifické metabolity s charakteristickým výskytem. Tvoří stále se rozšiřující skupinu látek rozmanité struktury i biologické aktivity [29].

Existence těchto specializovaných metabolitů, které jsou charakteristické přítomností minimálně jednoho dusíku v heterocyklu, je považována za ochranou adaptaci před napadením predátory a mimo jiné zprostředkovávají také intra- a inter-specifické signály uvnitř rostlin [30]. Ačkoliv jsou alkaloidy přítomny ve všech částech rostliny, jejich největší koncentrace se nachází v cibulích a obsah kolísá během vegetace [31].

Prvním izolovaným alkaloidem byl lykorin z *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877. Od té doby došlo k izolaci více než 300 alkaloidů, z toho téměř 100 se nachází v rodu *Narcissus*. Na základě struktury se rozdělují do devíti základních typů skeletů, přičemž jednotlivými zástupci jsou norbelladin, lykorin, homolykorin, krinin, haemanthamin, narciklasin, tazettin, montanin a galanthamin [29]. Ačkoliv se alkaloidy mezi sebou liší svojí strukturou, všechny mají společnou biosyntetickou cestu vycházející z norbelladinu [5]. Díky jejich strukturální rozmanitosti je možné u této skupiny látek nalézt celou řadu biologicko-farmakologických aktivit. Mezi nejvýznamnější patří cytotoxické, protinádorové, antimalarické, antimykotické, antibakteriální, antivirotické, emetické analgetické a AChE/BuChE inhibiční účinky. Díky tomuto širokému spektru vlastností jsou vhodnými adepty na léčbu neurodegenerativních, nádorových nebo infekčních onemocnění [11].

Více než tisíce let se rostliny z čeledi Amaryllidaceae využívají jako zdroj léčebných prostředků. Přes velké množství tradičních rostlinných zdrojů, patří cibulové rostliny z této čeledi mezi 20 nejpoužívanějších čeledí [32]. Jsou předmětem aktivního výzkumu již téměř 200 let [29]. Významnou nevýhodou je dostupnost alkaloidů, jelikož se v rostlinách vyskytují pouze v malé koncentraci a pro získání přeměřeného množství alkaloidů je třeba pěstovat rostliny ve velkém objemu. Takováto spotřeba je pak obecně neekologická. Chemická syntéza by dokázala zmírnit nároky na omezené množství alkaloidů, nicméně i ta čelí několika výzvám, protože výroba těchto složitých sloučenin je náročná a nákladná. Všechny tyto skutečnosti tak dávají silný důvod pro nalezení buď přiměřeně krátké a finančně dostupné syntézy nebo dalších rostlinných zdrojů těchto alkaloidů [30].

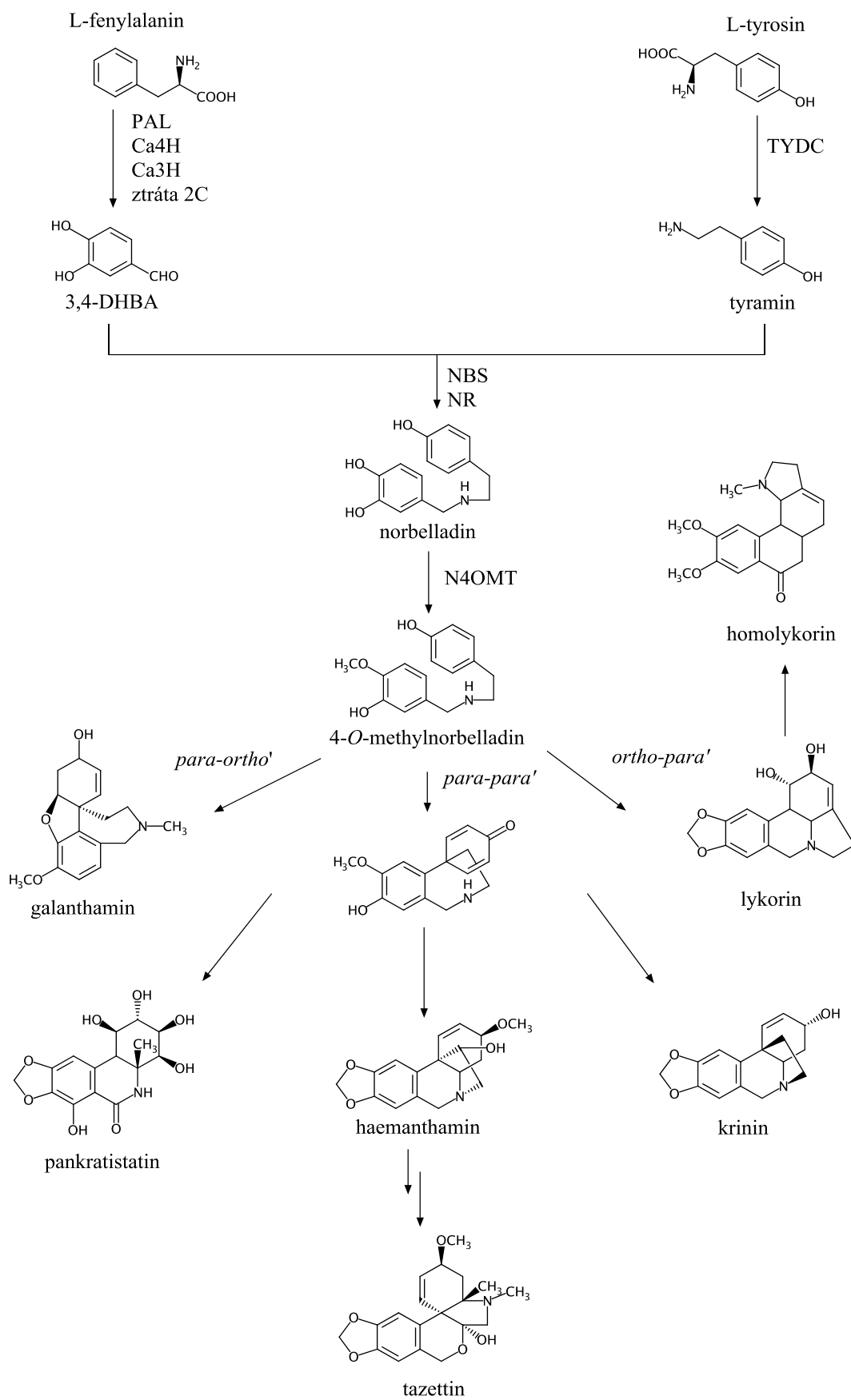
4.1 Biosyntéza alkaloidů

Navzdory intenzivním výzkumům nebyla biosyntéza alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae doposud zcela objasněna. Enzymy zodpovědné za produkci alkaloidů nejsou zcela známy, ani geny kódující tyto enzymy nebyly plně charakterizovány [30]. Tento nedostatek informací o biosyntetických cestách, regulaci a transportu alkaloidů komplikuje nalezení přiměřeně krátké syntetické cesty, která by umožňovala výrobu sloučenin ve větším množství a v ekonomicky udržitelném měřítku [32].

I přes velkou strukturní rozmanitost se na alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae pohlíží jako na deriváty společného skeletu norbelladinu [29]. Biosyntéza probíhá tzv. norbelladinovou cestou, která vychází ze dvou prekurzorů, aminokyseliny L-fenylalaninu a L-tyrosinu [30]. Oba substráty pocházejí z primárních metabolických drah, a ačkoliv jsou si aminokyseliny chemicky blízké, nejsou v rostlinách zaměnitelné [29]. Počáteční krok zahrnuje přeměnu L-fenylalaninu na meziprodukt 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA) a přeměnu L-tyrosinu na tyramin. Přeměna L-fenylalaninu probíhá tzv. fenylpropanoidní cestou, která je mimo jiné součástí metabolismu fenylpropanoidů. Tak je možné zpozorovat propojení dvou biosyntetických cest alkaloidní a fenylpropanoidní [32].

V prvním kroku, za působení fenylalanin-amoniak lyasy (PAL), dochází k eliminaci amoniaku za vzniku kyseliny trans-cinnamové, následuje hydroxylační reakce katalyzovaná dvěma cytochromy P450, a to cinnamát-4-hydroxylásou (Ca4H) a kumarát-3-hydroxylásou (Ca3H) a vzniká kyselina p-kumarová. Fenylpropanoidní cesta je zakončena ztrátou dvou uhlíků za vzniku meziproduktu 3,4-DHBA jako prekurzoru fragmentu C6-C1. Na druhé straně je L-tyrosin dekarboxylován pomocí tyrosin dekarboxylasy (TYDC). TYDC vystupuje v mnoha rostlinách produkujících alkaloidy jako klíčový regulační enzym. Podílí se na řízení přechodu od primárního ke specializovanému metabolismu, další funkcí je i zajištění dostatečného množství tyraminu pro syntézu různých isochinolinových alkaloidů [33]. Kondenzací 3,4-DHBA a tyraminu vzniká nejprve produkt schiffovy báze, který po redukcí poskytuje klíčový meziprodukt norbelladin. Enzymy katalyzující tuto reakci nejsou zcela objasněny, ale předpokládá se účast norbelladin syntetasy (NBS) a/nebo noroxomaritidin reduktasy (NR). Norbelladin je následně methylován prostřednictvím norbelladin 4'-O-methyltransferasy (N4OMT) za vzniku ústředního produktu 4'-O-methylnorbelladinu, od něhož vedou početné biosyntetické dráhy k různým strukturním typům alkaloidů. Tato reakce představuje zlom, kdy dochází k přechodu primárních metabolitů do sekundární metabolické dráhy [32].

Po syntéze ústředního produktu následuje jeho cyklizace intramolekulární, oxidativní fenolovou vazbou, která může probíhat ortho-para, para-ortho nebo para-para [29]. Para-ortho vazba vede k alkaloidům galanthaminového typu, naproti tomu vazba ortho-para vytváří strukturu lykorinového a homolykorinového typu. Spojovací reakcí para-para mohou vznikat alkaloidy krininového, narciklasinového, tazettinového a montaninového typu [32]. Cyklizací tedy vznikají tři páteřní struktury, které dále poskytují oporu stovkám doposud známým alkaloidům z čeledi Amaryllidaceae [33].



Obrázek 8. Biosyntéza alkaloidů [30, 32]

4.2 Strukturní typy alkaloidů

4.2.1 Lykorinový strukturní typ

Alkaloidy lykorinového typu se řadí mezi nejběžnější alkaloidy v čeledi Amaryllidaceae. Jsou charakterizované pyrrolo[d,e]fenanthridinovým skeletem a téměř všechny alkaloidy tohoto typu mají transsjednocení kruhů B a C, které je velmi citlivé vůči oxidačnímu působení [34, 29].

Hlavním alkaloidem této skupiny je lykorin, jehož struktura byla poprvé popsána Nagakawam a spol. v roce 1956. Vykazuje široké spektrum farmakologických účinků počínaje protinádorovými, antiangiogenními, protivirovými, antibakteriálními, antimalarickými, hepatoprotektivními, analgetickými a dalšími. Díky tomuto obrovskému biologickému potenciálu přitahuje zájem celé řady výzkumníků [35].

Lykorin byl první identifikovanou cytostatickou sloučeninou z čeledi Amaryllidaceae a obecně je uznáván jako antiproliferativní látka proti široké škále multirezistentních a apoptóze odolávajících nádorových buněk. Vykazuje selektivní cytotoxickou aktivitu prostřednictvím mitochondriální dráhy a indukce apoptózy. Má schopnost snižovat regulaci MCL-1 (mantle cell lymphoma) u lidských leukemických buněk a indukovat apoptózu prostřednictvím regulace buněčných liniích HL60 a KM3 uvolněním cytochromu-c a aktivace kaspas. Další zajímavou vlastností je antiangiogenní aktivita. Lykorin má schopnost zastavit vaskulogenní stimulaci metastatických melanomových buněk a zabraňuje tvorbě nádorových cév *in vivo*. Tyto účinky jsou spojovány s inhibicí aktivity promotoru VE-kadherinu (Vascular endothelial-cadherin), exprimovaného na spojích normálních a nádorových cév, sehrávající klíčovou roli v jejich sestavování a endoteliální permeabilitě [35].

Při hodnocení antibakteriální aktivity nevykazoval lykorin žádné významné inhibiční účinky vůči *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Flavobacterium columnare*. Naproti tomu jeho disubstituované *O*-analogy (*O*-acetyllykorin) se ukázaly být účinnější. Výsledky studií vedly k závěru, že substituce na C1 a C2 je pro antibakteriální účinnost klíčová [35].

Antivirová aktivita lykorinu a jeho derivátů byla hodnocena proti dvěma čeledím *Flaviridae*, *Bunvaviridae* a japonské encefalitidě. Lykorin má schopnost inhibovat flaviviry potlačením syntézy virové RNA, současně také slabě inhibuje translaci virových proteinů. Prokázána byla i schopnost potlačovat cytopatický účinek vyvolaný koronavirem, který je spojený s těžkým akutním respiračním syndromem s hodnotou EC₅₀ (poloviční efektivní koncentrace) 15,7 ± 1,2 nM [35].

Během hodnocení účinnosti proti *Plasmodium falciparum* projevoval lykorin na dávce závislou antimalarickou aktivitu. Silnější aktivitu však vykazovaly jeho syntetické deriváty jako 1,2-di-*O*-butanoyllykorin, 1-*O*-propanoyllykorin, 1-*O*-(3'*R*)-hydroxybutanoyllykorin a 1-*O*-(3'*S*)-hydroxybutanoyllykorin, které byly účinné i proti rezistentním kmenům. Z výsledků bylo možné odvodit, že nejlepší antimalarické aktivity dosahují deriváty s volnými hydroxylovanými skupinami na C-1 a C-2, popřípadě esterifikované jako acetáty nebo isobutyráty [35].

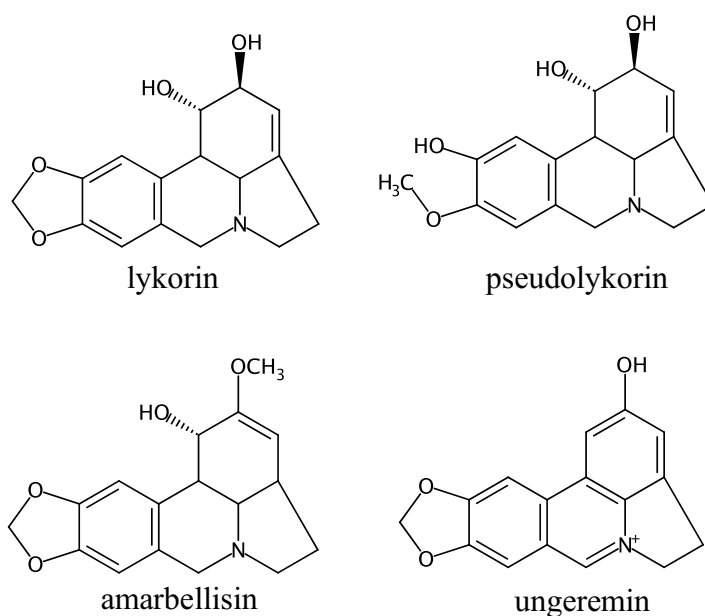
Dobrý antiartritický potenciál projevoval lykorin na zvířecích modelech. Úspěšně blokuje edém a snižuje cytotoxicitu kalprotektinu, který přispívá k rozvoji zánětu a vede k destrukci tkání. Dále snižuje produkci oxidu dusnatého (NO), prostoglandin E2, tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF-alfa), mitogenem aktivované kaspasy P38 a buněčnou signalizační cestu. Tato široká protizánětlivá aktivita může poskytnout nový náhled na léčbu celé řady artritických a zánětlivých onemocnění [35].

Součástí biologického potenciálu lykorinu je i schopnost potlačovat biosyntézu kyseliny askorbové *in vitro* a *in vivo*, a to prostřednictvím inhibice aktivity L-galaktonu-gama-lakton dehydrogenasy lokalizované v mitochondriální membráně rostlin [29]. Kyselina askorbová je syntetizována z glukózy a působí jako antioxidant v různých buněčných procesech, má také schopnost významně inhibovat peroxidázy *in vitro*. Bylo prokázáno, že lykorin v dávce 50 μ M inhibuje biosyntézu kyseliny askorbové a jeho účinek přetrvává i po odstranění alkaloidu z inkubačního media [35]. Tyto účinky je možné využít při inhibici buněčného růstu, tedy jako herbicidní prostředek [29].

Mimo výše zmíněné biologické aktivity má lykorin větší analgetickou účinnost než indometacin a aspirin, prokázány byly i antikonvulzivní účinky. U řady alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae včetně lykorinu, bylo zjištěno vazorelaxační působení na hladké svalstvo, které se připisuje podobnosti s isochinolinovými alkaloidy jako je papaverin [29]. Díky své antioxidační povaze měl lykorin schopnost ochránit erytrocyty před působením 2-amidinopropanem. Potvrzeny byly i hepatoprotektivní a choleretické účinky [35]. Naproti tomu, že alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae jsou známé inhibitory AChE a BuChE, tak lykorin tyto účinky nevykazuje nebo jen velmi slabě. Byly však vyvinuty strukturně bioaktivní deriváty lykorinu, u kterých se docílilo zesílení inhibičních účinků vůči cholinesterasám. 2-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-1-*O*-(methylthio)methyllykorin působí jako duální inhibitor lidské AChE a BuChE. Acylované nebo esterifikované deriváty oproti předchozímu derivátu vykazují vyšší aktivitu k BuChE než AChE [35]. U 1-*O*-acetyllykorinu byla naměřena silná inhibice vůči

AChE, dokonce byl dvakrát účinnější než galanthamin s hodnotou $IC_{50} 0,96 \pm 0,04 \mu M$, nicméně ve studii byl použit enzym z úhoře elektrického [36].

U dalších zástupců této skupiny jako je pseudolykorin, amarbellisin a ungeremin byla také zaznamenána aktivita proti nádorovým buňkám. Ve srovnání se standartními léky jako je vinkristin prokázal pseudolykorin schopnost prodloužit život leukemických myši infikovaných Rauscherovým virem, a navíc nebyl zjištěn žádný negativní vliv na tvorbu humorálních protilátek. Silný cytotoxický účinek proti řadě nádorových buněk, mezi které patří A549 (adenokarcinom plic), OE21 (skvamózní karcinom jícnu), HS683, U373 buněčná linie gliomu lidského mozku), SKMEL-28 a B16F10 (maligní melanom) byl zaznamenán u amarbellisinu. Alkaloid byl také podroben antibakteriálnímu a antimykotickému screeningu, při kterém byla zaznamenána silná aktivita proti *Escherichia coli* a *Candida albicans*. Ungeremin, známý také jako lykobetain, vykazuje inhibiční účinky vůči Ehrlichovu ascites karcinomu, ascites hepatomu, Lewisovu karcinomu plic a Yoshidovu ascites sarkomu. Má také schopnost interferovat s aktivitou topoizomeráz I a II, které jsou zodpovědné za správné rozřetězení DNA. Inhibice těchto enzymů vede ke vzniku jedno vláknových a dvouvláknových zlomů a ke kovalentnímu připojení enzymu k DNA [37].



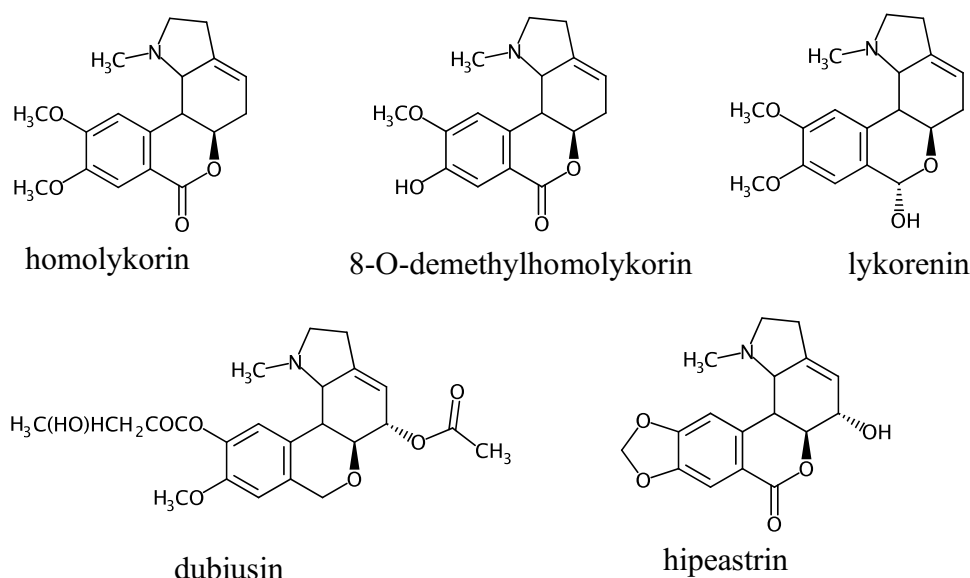
Obrázek 9. Lykorinové strukturní typy [37]

4.2.2 Homolykorinový strukturní typ

Zástupci homolykorinového strukturního typu vznikají biogeneticky přestavbou alkaloidů lykorinové skupiny a jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Během hodnocení cytotoxické aktivity homolykorinu bylo využito pěti lidských nádorových buněčných linií, které zahrnovaly buňky karcinomu prsu (MCF-7), myelogenní leukemie (K562), lymfoblastické leukemie (CEM) a maligního melanomu (G-361). Homolykorin vykazoval účinnost proti nádorovým buňkám, došlo však i k poškození lidských BJ fibroblastů. Podobnost vyazuje i 8-*O*-demethylhomolykorin, lykorenin a hipeastrin [38].

U hipeastrinu byla dále potvrzena aktivita proti viru *Herpes Simplex* a jeho antimykotický účinek proti *Candida albicans* [5].

Hypotenzní účinek na arteriální krevní tlak u normotenzních potkanů vykazoval dubiusin, homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin a lykorenin [29].



Obrázek 10. Homolykorinové strukturní typy [38]

4.2.3 Haemathaminový a krininový strukturní typ

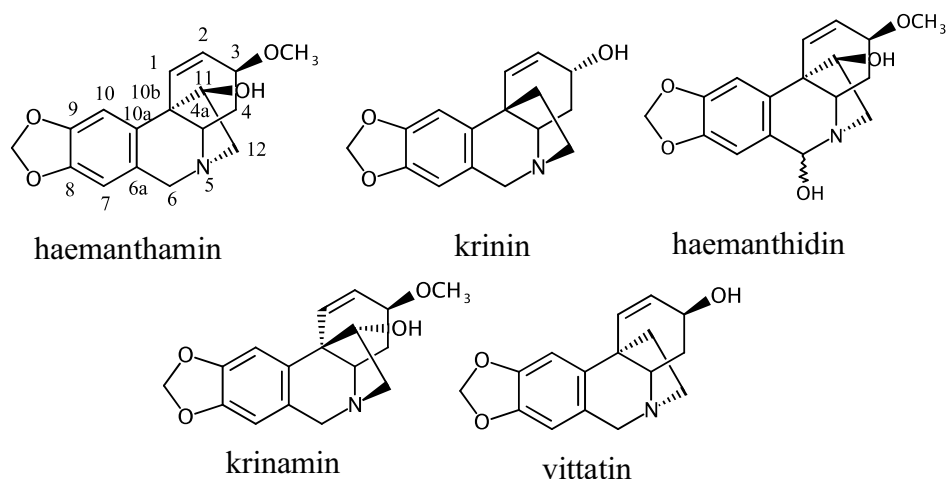
Základ těchto strukturních typů tvoří ethanofenantridinový skelet a podle orientace ethanového můstku umístěného v poloze N-5 a C-10 je možné oba typy odlišit. Pro krininový typ je charakteristický β -orientovaný ethanový můstek, zatímco u alkaloidů haemanthaminového typu je ethanový můstek orientovaný do polohy α [34]. Cytotoxická aktivita na nádorové buňky byla potvrzena u haemanthaminu, haemanthidinu a krinaminu, které se řadí k nejúčinnějším. Dále byly prokázány i apoptotické účinky u alkaloidních struktur na

bázi krinanu. V této souvislosti byla hodnocena aktivita přírodních i polosyntetických derivátů na buňky potkaního hepatomu. Svou účinností vynikaly haemanthamin a krinamin s apoptotickým indexem 95 % po 48hodinovém působení 25 μ M. Pozoruhodné je i zaznamenání zanedbatelných apoptotických účinků na normální buňky lidských embryonálních ledvin, což poukazuje na jejich určitou selektivitu. Slabší účinek vykazoval 6-hydroxyundulatin s 25 % apoptotickým indexem při stejné koncentraci i době působení [39].

Antimalarická aktivita proti *P. falciparum* byla zpozorována u haemanthaminu a haemanthidinu, mírnější aktivitu vykazoval i krinamin. Za účinek je pravděpodobně zodpovědná methylenedioxybenzenová část a terciální dusík bez methylu [29].

Při hodnocení antiprotozoálních účinků in vitro proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* se haemanthidin ukázal jako slibný. Slibná je i jeho analgetická a protizánětlivá aktivita, která je ve srovnání s kyselinou acetylsalicylovou vyšší, podobně jako u lykorinu [5]. U dalšího zástupce vittatinu se potvrdila antibakteriální aktivita proti gramnegativní *E. coli* a grampozitivnímu *Staphylococcus aureus*, zjištěna byla i schopnost potencovat účinek morfinu [29].

Za zmínku stojí i silná antibakteriální aktivita krinanu proti *S. aureus* a *Bacillus subtilis*. U haemanthaminu se dále potvrdily hypotenzní účinky a silná antiretrovirová aktivita [29].



Obrázek 11. Haemanthaminové a krininové strukturní typy [39]

4.2.4 Narciklasinový strukturní typ

Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od molekuly fenanthridinu. Narciklasin byl poprvé izolován v roce 1967 v rámci výzkumného projektu při hledání protirůstových faktorů. O rok později byl izolován i alkaloid lykorcidinol, jehož struktura, jak se později ukázalo, je naprosto

identická s narciklasinem [40]. Další zajímavostí je, že na rozdíl od většiny alkaloidů nemá narciklasin bazický charakter. Tato skutečnost je dána přítomností amidického dusíku [41].

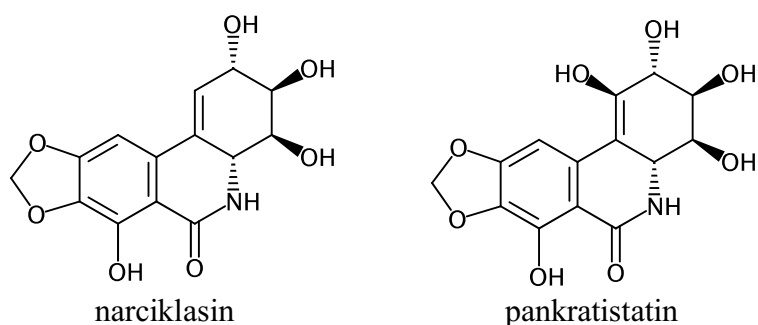
V roce 1967, kdy byl poprvé izolován, došlo také k prvnímu hodnocení jeho biologické, resp. protinádorové aktivity. Narciklasin vykazoval silnou blokádu mitózy u buněk myšího karcinomu a účinně inhiboval i růst radikulí pšeničného zrna. Později byly poznatky rozšířeny o další studie, ve kterých narciklasin inhiboval růst buněk lidského karcinomu děložního čípku (HeLA). Během hodnocení byla zaznamenána snížená syntéza DNA bez ovlivnění RNA, přímá interakce s DNA byla ale vyloučena [40]. Narciklasin má schopnost vázat se na ribozomální podjednotku 60S a inhibovat peptidyltransferasu, výsledkem je zamezení vzniku vazby v nově vznikající řetězci proteinu [5].

Apoptotické účinky byly prokázány při vysoké koncentraci 1 μ M narciklasinu, a to prostřednictvím aktivace komplexu DISC (Death-Inducing complex), Fas, receptoru smrti 4 (DR4) a následné aktivace kaspas -8 a -9. Vysoká koncentrace však není podmínkou apoptotického působení. V lidských promyeloidních buňkách HL-60 a v buňkách skvamózního karcinomu dutiny ústní došlo k redukci buněk i při nízkých koncentracích (18 a 50 nM) [40].

U narciklasinu byla prokázána i jeho protizánětlivá aktivita. Účinně zabraňuje otokům na modelu potkaní artritidy a současně potlačuje produkci TNF- α . V různých typech leukocytů také snížil produkci prozánětlivých cytokinů [40].

Informace o antivirové aktivitě byly zveřejněny v roce 1992. Byla prokázána *in vitro* účinnost proti japonské encefalitidě, žluté zimnici a horečce dengue. Aktivita byla patrná až při vyšších koncentracích, které s sebou nesly riziko cytotoxických účinků [40]. Za zmínku stojí i antibakteriální aktivita proti *Corynebacterium fascians* a antifungální aktivita proti *Candida albicans* [5].

Neméně významným zástupcem tohoto strukturního typu je pankratistatin. Jeho cytotoxická aktivita byla hodnocena na šedesáti buněčných liniích, zahrnujících nádorově transformované buňky z tkání plic, střeva, ovarií, ledvin, mozku, melanomu a buněk akutní myeloidní leukemie. Pankratistatin prokazatelně inhiboval HeLA buňky, patrná byla i vysoká cytotoxická aktivita na leukemické buňky. Protinádorová účinnost byla hodnocena i na buněčných liniích karcinomu prostaty DU145 a LNCaP. Při koncentraci 1 μ M bylo prokázáno, že selektivně snižuje životaschopnost rakovinných buněk prostaty a současně nezvyšuje buněčnou smrt u nenádorových buněk. Má schopnost selektivně indukovat apoptózu buněk karcinomu prostaty, snižuje jejich migraci, indukuje produkci kyslíkových radikálů a iniciuje apoptotickou smrt zprostředkovanou mitochondriemi [5].

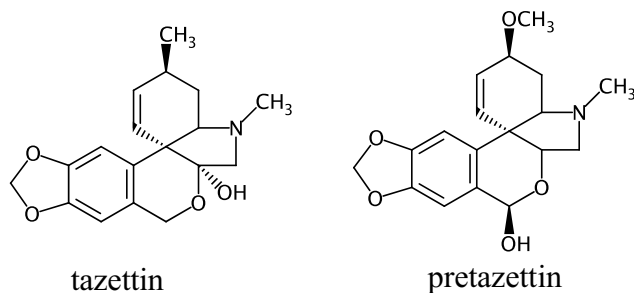


Obrázek 12. Narciklasinové strukturní typy [40]

4.2.5 Tazettinový strukturní typ

Zástupci tazettinového strukturního typu představují minoritní skupinu alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae. Jejich struktura je odvozena od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu [5]. Pretazettin izolovaný z *Narcissus Tazetta* byl jako první zkoumán na antiproliferativní účinky v roce 1971. Hodnocení probíhalo na myších s modelovou Rauscherovou leukémií, maximální netoxická dávka (MNTD) byla stanovena na 50 mg/kg jako dávka, kterou myši tolerovaly během 14 dnů podávání, aniž by došlo ke zjevné intoxikaci. Pretazettin vykazoval vysokou účinnost s prodloužením mediánu doby přežití (PMST) 132 % oproti kontrolním dávkám cyklofosfamidu, vinkristinu a purinetholu s hodnotami 57 %, 53 % a 78 %. Navíc bylo zjištěno, že i při dlouhodobé terapii byly myši schopny plně udržet imunitní odpověď. Studie byla prováděná také s tazettinem, který vykazoval výrazně nižší účinnost s hodnotami MNTD 25 mg/kg a PMST 35 %. Podobně tomu bylo i při hodnocení antiproliferativní aktivity proti buňkám HeLA, během kterého se pretazettin ukázal jako mnohonásobně účinnější než tazettin. Pozoruhodné bylo i zjištění, že pretazettin byl účinnější než lykorin nebo haemanthamin. Ve formě soli hydrochloridu byla zkoumána jeho antileukemická účinnost u myší. Dlouhodobé podávání pretazettinu myším vedlo v tomto případě k významnému prodloužení délky jejich života ve srovnání s neléčenými jedinci. Patří také k nejaktivnějším alkaloidům proti T-lymfocytickým buňkám MOLT-4 [42].

Ačkoliv se tazettin a pretazettin liší pouze v poloze hydroxylové skupiny, která je u tazettinu v poloze C-11 a u jeho protějšku v poloze C-6, se pretazettin v řadě studií jevil jako mnohem účinnější [42]. Bylo prokázáno, že pretazettin je schopen inhibovat syntézu buněčných proteinů bez ovlivnění syntézy DNA a RNA v buňkách lidského orálního epidermálního karcinomu. V závislosti na dávce také inhibuje tvorbu peptidových vazeb v ribosomech S-30 [42]. Kromě antiproliferativní aktivity vykazuje účinnost i proti virům *Herpes simplex* a flavivirům [5].



Obrázek 13. Tazettinové strukturní typy [42]

4.2.6 Montaninový strukturní typ

Biosyntéza vedoucí k alkaloidům montaninového strukturního typu nebyla doposud spolehlivě vysvětlena. Jedna z možných teorií je přestavba 11-hydroxyvittatinu na pankracin a jeho následná 2-*O*-methylace za vzniku montaninu podle studie z roku 1976. Jiná teorie byla popsána v roce 2007 Jinem, který vycházel z biosyntézy cherilinového typu alkaloidů. Ty pravděpodobně vznikají intramolekulární adicí na *p*'-pozici aromatického kruhu do benzylové polohy oxidované chinoidní formy. Alkaloid montaninového typu pak vzniká následnou adicí sekundárního aminu na dienom [43].

První čtyři alkaloidy byly izolovány v roce 1995 Wildmannem a spol., jmenovitě se jednalo o kokcinin, manthidin, manthin a montanin, další izolace probíhaly v následujících letech do celkového počtu čtrnácti doposud izolovaných alkaloidů tohoto typu. Většina se liší pouze konfigurací a substitucí na stereoizomerech C-2 a C-3 v kruhu E [43].

První zmínky o určité protinádorové aktivitě byly podány pro montanin v roce 2008. Aktivita montaninu byla hodnocena proti pěti různým lidským buněčným liniím, a to adenokarcinomu tlustého střeva, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu ledvin, prsu a epitelálního karcinomu vaječníků ve srovnání s vittatinem. Podle studie snížil montanin výrazně růst 7 různých adherentních linií. Také byl schopen inhibovat růst nádorových leukemických buněk MOLT-4 při jednorázové dávce 10 μ M. Antiproliferativní a cytotoxický účinek montaninu byl dále potvrzen i v jiných studiích např., Masi a spol., kde se hodnotila účinnost na panelu šesti nádorových buněčných liniích. Protinádorová aktivita byla prokázána i u kokcininu a pankracinu [43].

Antibakteriální aktivita montaninu byla testována vůči *Mycrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* a *Escherichia coli* spolu s antimykotickou aktivitou proti *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Dávované množství montaninu při koncentraci 1 mg/ml probíhalo po 5, 10, 15, 20 a 50 μ l.

Jako referenční látky byly použity chlormfenikol a ketokonazol o stejné koncentraci jako montanin. *Mycrococcus luteus* a *Candida albicans* se ukázaly být rezistentní vůči jeho účinkům, u ostatních byla stanovena MIC (minimální inhibiční koncentrace) o hodnotách 20, 5, 15, 5, a 10 μg [44].

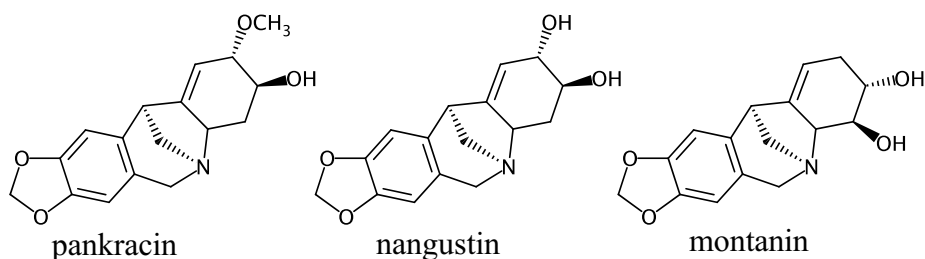
Při hodnocení *in vitro* antiprotozomální aktivity u nangustinu a pankracinu proti *T. brucei rhodesiensis*, *T. cruzi* a *P. falciparum* vykazoval pankrastin vyšší účinnost ve srovnání s nangustinem, ale i přesto je jeho antimalarická aktivita slabá [43].

Hodnocená byla i antirevmatická účinnost montaninu. Významně tlumil rozvoj artritidy v akutních i chronických modelech, a to v závislosti na dávkách, přičemž nižší dávka byla účinnější. Důvodem je vyšší dostupnost montaninu, vedoucí k desenzibilizaci receptoru a následně k jeho nižší aktivaci a snížení biologického účinku. U montaninu se dále potvrdily i sedativní, anxiolytické, antikonvulzivní a antidepresivní účinky [43].

Cytotoxická účinnost pankracinu byla hodnocena proti devíti nádorovým buněčným liniím zahrnující Jurkat (akurní T-buněčná leukémie), MOLT-4, A549, HT-29 (karcinom tlustého střeva), PANC-1 (karcinom slinivky břišní), He-La, MCF-7, A2780 (ovariální karcinom) a SAOS-2 (osteogenní sarkom) s 1 μM doxorubicinem jako pozitivní kontrolou. V této souvislosti byla hodnocena i aktivita proti nenádorovým buňkám plicních fibroblastů MRC-5. V dávce 10 μM byl pankracin schopen inhibovat růst všech liniích kromě PANC-1. Hodnoty IC_{50} se pohybovaly v rozmezí 2,20-5,15 μM [45].

Při studii vlivu pankracinu na buněčný cyklus u nádorových buněk A549 byl zaznamenán procentuální nárůst a kumulace buněk v G1 a G2-fázi s poklesem růstu v S fázi při koncentraci 5 μM . Jinak tomu bylo při použití 20 μM , kde došlo k nárůstu buněk v G2-fázi se snížením buněk ve fázi S a G1. Výsledky naznačují, že blokáda buněčného dělení ve fázi G1 vede k inhibici proliferace nádorových buněk. U buněčné linie MOLT-4 byla použita nižší koncentrace pankracinu (2,5 μM) vzhledem k vyšší citlivosti buněk. V intervalu 24 hodin došlo k nárůstu buněk v G1-fázi s poklesem buněk ve fázi S [46].

Hodnoceny byly i apoptotické účinky pankracinu na základě aktivace kaspáz-3, -7, -8 a -9 po 24hodinovém působení. V případě nádorových buněk A549 nebyla detekována žádná aktivace. Odlišná situace byla zpozorována u buněk MOLT-4, kde při použití pankracinu v koncentracích 10 a 20 μM , došlo k aktivaci všech typů kaspas [46].



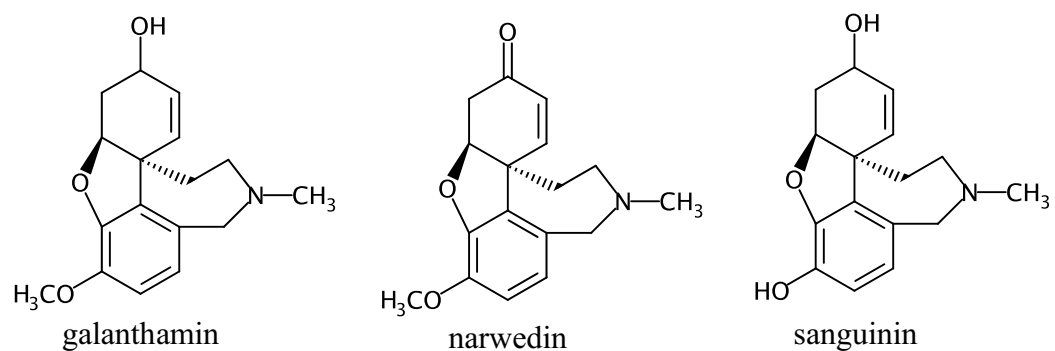
Obrázek 14. Montaninové strukturní typy [43]

4.2.7 Galanthaminový strukturní typ

Alkaloidy galanthaminového typu vznikají štěpením vazby v poloze C-4 a N-5 na skeletu krininového typu a na atomech C-1, C-15 a O. Vzniká dibenzofuranové jádro s různými substituenty, které tvoří základní skelet alkaloidů tohoto strukturního typu. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je galanthamin, původně izolovaný ve 40. letech 20. století z *Galanthus nivalis*. Je znám především ve spojení s léčbou Alzheimerovy choroby. Základem léčby je použití sloučenin, které jsou schopné zvýšit postsynaptickou dostupnost acetylcholinu a vyrovnat deficit nikotinergní aktivity způsobený zánikem neuronů. V této souvislosti působí galanthamin jako reversibilní a kompetitivní inhibitor AChE, navíc má charakter alostericky potencujícího ligandu na nikotinových receptorech. Umožňuje otevření iontově řízených nikotinových kanálů již při poměrně nízké koncentraci acetylcholinu. Tento mechanismus je zvláště výhodný, jelikož nedochází k desenzibilizaci receptoru vlivem vysoké koncentrace ligandu. Ve spojení s terapií AD je galanthamin dobře snášen a většina nežádoucích účinků, které jsou převážně cholinergní povahy, je mírná nebo střední. Nemá žádné klinicky relevantní účinky na vitální funkce, ani na hematologické nebo biochemické laboratorní parametry [47]. Mezi další vlastnosti galanthaminu patří schopnost zesilovat nervosvalový přenos, snižovat traumatický šok, zmírňovat únavový syndrom, snižovat závislost na alkoholu. Při léčbě závislosti na nikotinu bylo jeho použití dokonce i patentováno. Mimo jiné působí tento alkaloid jako mírné analeptikum a antimalarikum, kompenzuje účinky opiátů na dýchání a jeho analgetická účinnost je srovnatelná s morfiem [29].

Sanguinin, který se od galanthaminu liší pouze hydroxylovou skupinou na C-14, je nejméně třikrát silnějším inhibitorem a desetkrát selektivnějším vůči AChE než galanthamin. Nicméně jeho použití v terapii AD je omezeno díky přítomnosti fenolové skupiny, kvůli které vykazuje nižší biologickou dostupnost v mozku a předpokládá se, že je okamžitě inaktivován glukuronidací v jaterních buňkách [48]. U biogenetického prekurzoru galanthaminu, narwedinu

byla prokázána schopnost zvyšovat frekvenci a amplitudu dýchacích svalů. Dále snižuje frekvenci srdečních stahů, inhibuje účinek hypnotik a zvyšuje analgetický účinek morfinu [49].



Obrázek 15. Galanthaminové strukturní typy [47]

5 Nové izolované alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae jsou v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu především díky své rozmanité biologické aktivitě. Navzdory velkému počtu alkaloidů, které byly již objeveny, izolovány a zkoumány, jsou stále nacházeny nové strukturní typy [32].

S prodlužující se průměrnou délkou života roste i incidence civilizačních chorob, mezi které řadíme mimo jiné AD nebo nádorová onemocnění. V současné době se odhaduje, že na celém světě trpí AD přibližně 46 mil. lidí a předpokládá se, že toto číslo dosáhne do roku 2050 hranici 131,5 mil [32]. Nádorová onemocnění jsou dle WHO nejčastější příčinou úmrtí, přičemž první místa zauímají nádory prsu a plic. Na základě těchto skutečností je velmi důležité hledat nová potencionální léčiva, která by našla uplatnění v terapii nejen civilizačních chorob, ale i řady dalších [50].

Od roku 2016 byly objeveny desítky nových alkaloidů této čeledi. Následující část je věnována těm, které mají z hlediska struktury nebo biologické aktivity potenciál pro budoucí využití.

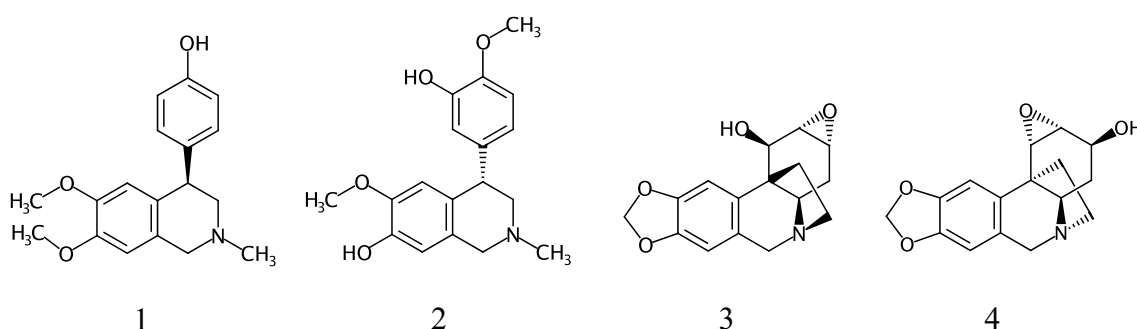
5.1 Giganteliin, Gigantellinin a Gigankrinin

Tyto tři nové alkaloidy byly spolu s dalšími již známými alkaloidy izolovány z *Crinum jagus* rostoucího v Senegal. Chemická struktura byla charakterizována na základě chemických a spektroskopických metod jako je jedno a dvou dimenzionální nukleární magnetická rezonance (1D a 2D), protonová nukleární magnetická rezonance (1H), uhlíková nukleární magnetická rezonance (13C NMR) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem s vysokým rozlišením (HRESIMS), během níž se roztok vzorku převádí v elektrickém poli na jemnou mlhu a přesná hmotnost se určí z poměru náboje a hmotnosti při analýze iontů [51, 52].

Gigantellin spolu s gigantellininem byly indentifikovány jako 4-(6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-4-yl)-fenol a jeho 7-*O*-demethyl-5'-hydroxy-4'-methoxy derivát. Látky se navzájem liší v poloze dvou methoxy skupin a polohou hydroxy skupiny na C-7 a C-5'. Absolutní konfigurace byla určena porovnáním jejich ECD (electronic circular dichroism) spekter s cherillinem na základě shodných chromoforů a skeletů. Téměř dokonalé překrytí bylo zaznamenáno u gigantellininu, zatímco gigantellin se k němu jevil jako zrcadlově obrácený díky S konfiguraci na C-4 a C-5. Gigankrinin se strukturním vzorcem 5,6a,7,7a,8a,9-hexyhydro-6,9a-ethano[1,3]dioxolo[4,5-j]oxyrenol[2,3-b]fenathridin-9-ol je blízce příbuzný krininu a také vystupuje jako konstituční

izomer alkaloidu flexininu, který vzniká posunem polohy hydroxy skupiny a epoxidového kruhu na kruhu C [51].

Všechny tři sloučeniny byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE s použitím galanthamin hydrobromidu jako srovnávací láky. Jediný alkaloid gigantellin inhiboval enzym s hodnotou IC_{50} $174 \pm 2,30 \mu\text{M}$. Ve srovnání s hodnotou referenční látky s IC_{50} $7,50 \pm 0,02 \mu\text{M}$ je jeho aktivita nízká. Cytotoxická aktivita byla hodnocena na buněčné linii MCF-7. Ze všech tří testovaných sloučenin vykazovaly gigantellin a gigantellinin při koncentraci $400 \mu\text{M}$ vysokou cytotoxickou účinnost, ale při hodnotě $100 \mu\text{M}$ se antiproliferativní potenciál ztratil [51].



Obrázek 16. Gigantelin (1), gigantellinin (2), gigakrinin (3), flexinin (4) [51]

5.2 4, 8-dimethoxy-kripovelin C a D, 9-methoxy-kripovelin B, a 4-methoxy-8-hydroxy-kripovelin B

Z rostliny *Crinum latifolium* byly izolovány čtyři nové, vysoce bioaktivní alkaloidy. Po objasnění struktury pomocí spektroskopických metod byly látky testovány z hlediska cytotoxického, antimikrobiálního a protizánětlivého potenciálu [53].

Všechny jsou svojí strukturou blízké již známému alkaloidu kripovelinu C. V případě první látky je rozdíl patrný v nahrazení methyldioxy substituentu v poloze mezi C-4 a C-8 u kripovelinu C dvěma ethoxy skupinami. 4,8-dimethoxy-cripowellin D se liší přítomností dvou methoxy skupin a nepřítomností kruhové části 1,3,5-trioxepanu u 4,8-dimethoxy-cripowellinu C. Druhá a třetí sloučenina jsou strukturně blízké analogy lišící se přítomností methyldioxy substituentu u látky 3 na místo dvou methoxy skupin u sloučeniny 2. Poslední látka je strukturně blízká už dříve izolovanému kripovelinu B, rozdílem je nahrazení methyldioxy skupiny v poloze C-4 a C-8 u kripovelinu B methoxy skupiny v poloze C-4 a hydroxylem na C-8 [53].

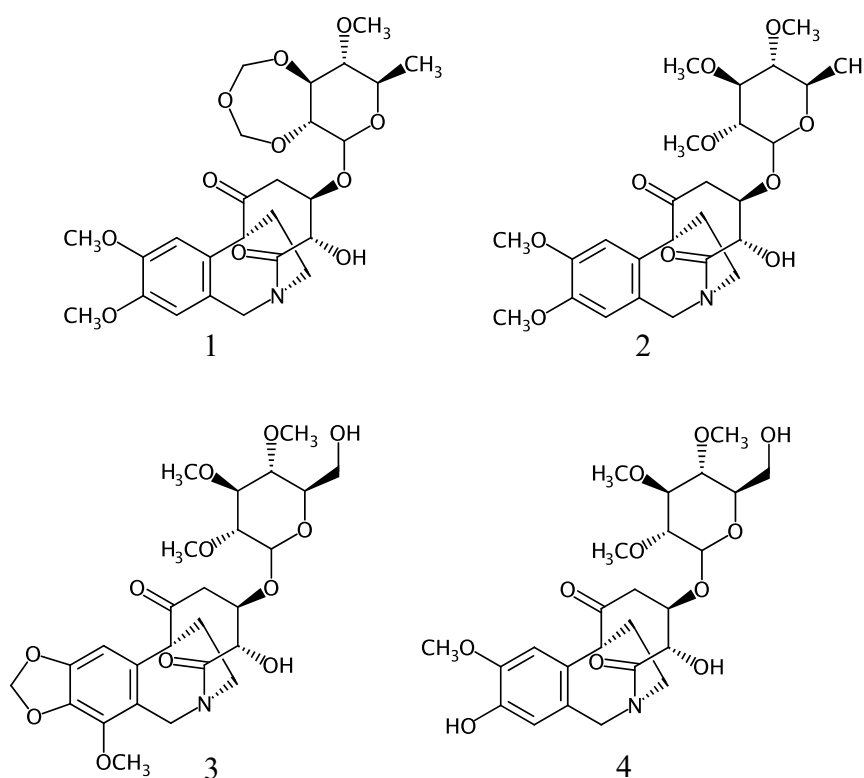
Cytotoxická aktivita byla hodnocena na sedmi buněčných liniích karcinomu plic s použitím doxorubicinu jako pozitivní kontroly. Vysokou cytotoxickou účinnost vykazovaly všechny

látky kromě první s hodnotami IC_{50} 14,5-17,3; 7,1-9,6 a 7,4-10,1 nM. První látka vykazovala cytotoxicitu s hodnotou $IC_{50} < 30$ nM [53].

Při testování antimikrobiální účinnosti bylo použito celkem 8 mikroorganismů, z toho 3 grampozitivní (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*) a 5 gramnegativních (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter cloacae* a *Shigella dysenteriae*). Nejvyšší antimikrobiální potenciál byl naměřen u třetí a čtvrté sloučeniny s hodnotou MIC $< 0,50$ mM [53].

Protizánětlivá aktivita byla hodnocena proti cyklooxygenase 1 (COX-1) a cyklooxygenase 2 (COX-2). Všechny látky vykazovaly srovnatelnou inhibici COX-1 s hodnotami 69,7, 66,8, 70,2 a 67,9 % ve srovnání s pozitivní kontrolou SC-560 (63,5 %) a COX-2 s hodnotami 93,6, 92,7, 91,1 a 95,2 % v porovnání NS-398 (97 %) [53].

SC-560 je selektivní inhibitor COX-1 patřící do skupiny diarylheterocyklů inhibitorů COX [54]. NS-398 [*N*-(2-cyklohexyloxy-4-nitrofenyl)methansulfonamid] byl navržen tak, aby přednostně inhiboval COX-2, a přitom byly sníženy nežádoucí účinky v gastrointestinální oblasti, které jsou typické pro látky ze skupiny nesteroidních antiflogistik [55].

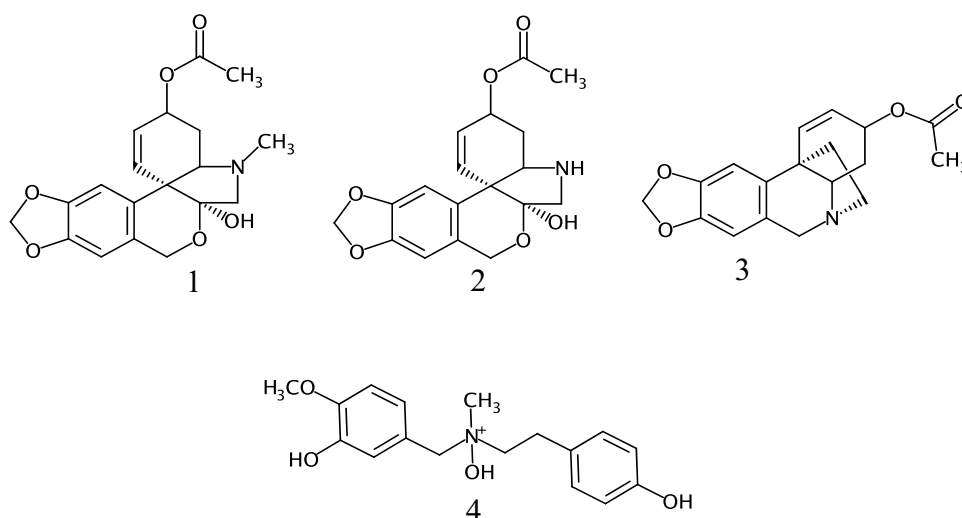


Obrázek 17. 4,8-dimethoxy-kripovelin C (1), 4,8-dimethoxy-kripovelin D (2), 9-methoxy-kripovelin C (3), 4-methoxy-8-hydroxy-kripovelin B (4) [53]

5.3 Scillitazettin, Scilli-*N*-desmethylpretazettin, 3-*O*-acetylvitattin a 4'-*O,N*-dimethylnorbelladin *N*-oxid

Další čtyři nové alkaloidy byly izolovány z dosud neprobádané rostliny *Crinum scillifolium*. Struktury byly charakterizovány za použití HRESIMS a 1D a 2D NMR dat s porovnáním s literárními údaji. Scillitazettin byl definován jako acylderivát 3-*O*-demethyltazettinu. Druhý alkaloid se od něj liší ztrátou *N*-methylové skupiny a hydroxyly v poloze C-11. Další zajímavostí je i α -orientace vodíku v poloze C-11, která byla poprvé popsána u řady pretazettinů/tazettinů. 3-*O*-acetylvitattin byl zařazen mezi alkaloidy krivanového/haemanthaminového typu, poslední alkaloid do norbelladinového [56].

První dvě látky byly testovány na antiplasmodiální aktivitu proti *Plazmodium falciparum* rezistentní vůči chlorochinu. Nejvýznamnější aktivitu projevil scilli-*N*-desmethylpretazettin s hodnotou IC_{50} $46,5 \pm 2,0$ μ M, scillitazettin vykazoval pouze mírnou účinnost s IC_{50} $77 \pm 2,0$ μ M. Hodnocena byla i cytotoxická aktivita proti buněčné linii karcinomu tlustého střeva. V tomto případě všechny látky vykazovaly jen slabou aktivitu [56].



Obrázek 18. Scillitazettin (1), scilli-*N*-desmethylpretazettin (2), 3-*O*-acetylvitattin (3) a 4'-*O,N*-dimethylnorbelladin *N*-oxid (4) [56]

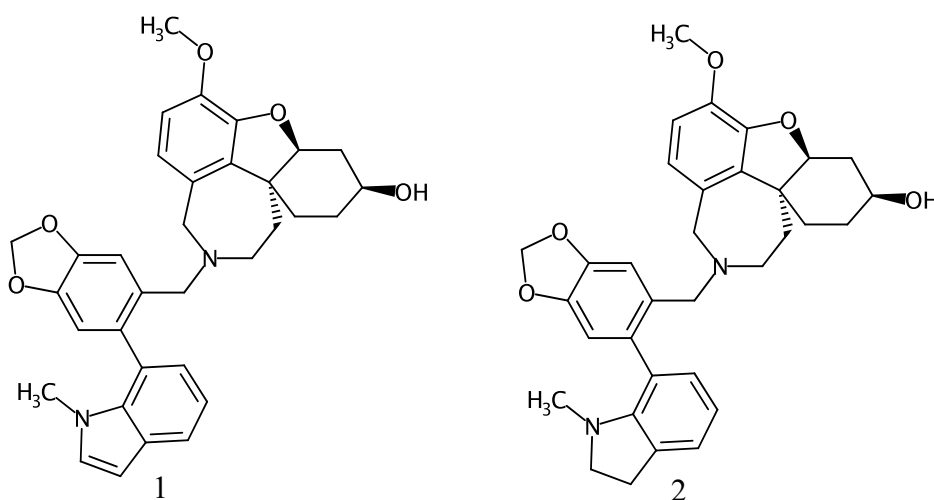
5.4 Narcipavlin a Narcikachnin

Narcipavlin a narcikachnin byly izolovány jako dva nové strukturní typy z čerstvých cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Charakterizace struktury byla objasněna pomocí MS a 1D a 2D NMR. V jejich skeletu se kombinují dva základní strukturní typy alkaloidů,

galanthamin a galanthamidol a dají se tak nazvat dimerními sloučeninami. Podle výsledků gHMBC (heteronuclear multiple bond coherence) experimentů byly identifikovány tři základní fragmenty tvořící strukturu těchto nových alkaloidů [57].

Mezi ně patří 4a,5,7,8,9,10,11,12-oktahydro-6H-benzo[2,3]benzofuro[4,3-cd]azepin (fragment A), benzo[d][1,3]dioxol (fragment B) a *N*-methylindol v případě narcipavlinu nebo *N*-methyl-2,3-dihydroindol u narcikachninu. Fragmenty A a B jsou spojeny methylenovou skupinou v poloze C-10 a C-2'. *N*-methylindol nebo *N*-methyl-2,3-dihydroindol jsou navázány na polohu C-8' fragmentu B [57].

Narcipavlin byl spolu s dalšími již známými alkaloidy testován na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE za použití galanthamin hydrobromidu a Huperzinu A jako pozitivní kontroly. Z celkového počtu 14 alkaloidů vykazoval narcipavlin nejsilnější inhibici BuChE s hodnotou $IC_{50} 24,4 \pm 1,2 \mu M$. Narcikachnin nemohl být testován z důvodu nízkého množství, které bylo při izolaci získáno [57].



Obrázek 19. Narcipavlin (1) a narcikachnin (2) [57]

5.5 Karltonin A, B a C

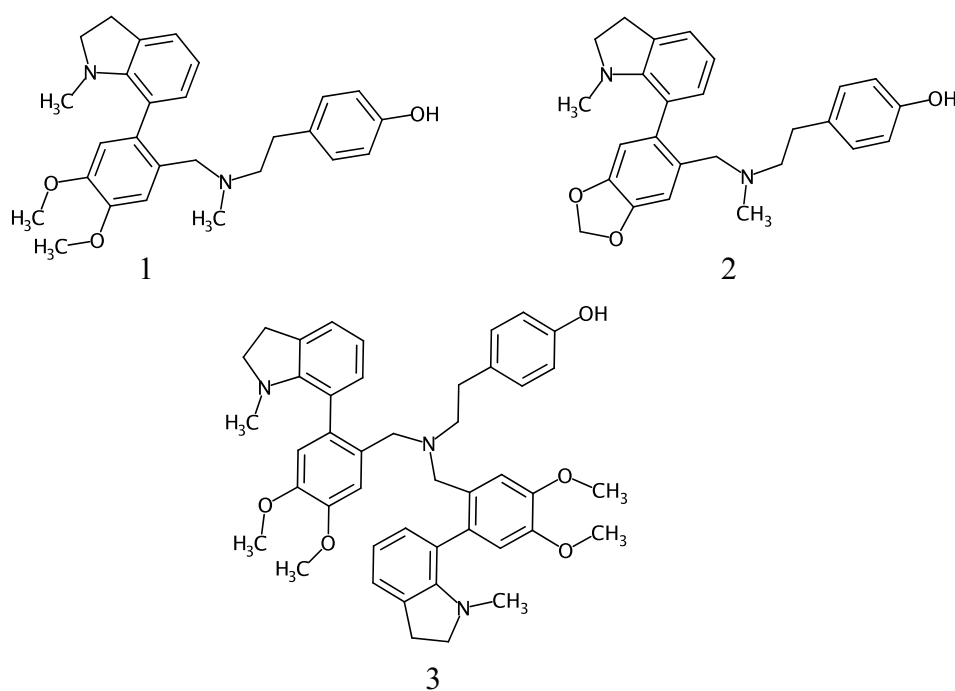
Z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton byly izolovány tři nové alkaloidy belladinového strukturního typu. Alkaloidy izolované v dostatečném množství byly následně hodnoceny na in vitro inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE a na inhibici enzymu prolyl oligopeptidasy (POP). Sloučeniny byly identifikovány pomocí spektroskopických metod s využitím MS, HRESIMS, 1D a 2D NMR [58].

Karltonin A a B mají stejnou jádrovou strukturu, která se skládá ze dvou fragmentů, belladinového a lykosinového. Látky se liší substitucí v polohách C-5'a C-6'. V případě karltoninu A jsou v polohách navázány dvě methoxy skupiny, u druhé sloučeniny se v těchto

místech nachází 1,3-dioxolan. Karltonin C, se od předešlých látek odlišuje dalším lykosinovým fragmentem [59].

Během hodnocení inhibiční aktivity vůči esterasám byly jako pozitivní kontrola, zvoleny galanthamin a eserin. První dvě látky vykazovaly silnou inhibiční aktivitu vůči BuChE s hodnotami IC_{50} 910 nM pro karltonin A a 31 nM pro karltonin B a s indexem selektivity vyšším než 100 %. Na základě dokovacích studií je za mimořádnou účinnost karltoninu A pravděpodobně zodpovědná přítomnost 2H-1,3-benzodioxolová část, která rozšiřuje rozsah hydrofobních reakcí mezi ligandem a enzymem [58].

Berberin byl použit jako pozitivní kontrola při stanovení inhibice enzymu POP, což je cytosolová, serinová proteasa, exprimována v několika oblastech mozku, která s vysokou specifitou katalyzuje štěpení krátkých peptidů obsahujících prolin. POP je zodpovědný za degradaci neurotransmiterů, jako je substance P, arginin-vasopresin-oxytocin a neurotensin. Degradace vede následně ke snížení možnosti vzniku toxických peptidů a β -amyloidu. Vzhledem k nízkému množství, které bylo izolováno, proběhlo měření pouze u karltoninu A, který prokázal inhibici srovnatelnou s berberinem s hodnotami POP IC_{50} $143 \pm 12 \mu\text{M}$ pro karltonin A a $142 \pm 21 \mu\text{M}$ pro berberin [58].



Obrázek 20. Karltonin A (1), B (2) a C (3) [58]

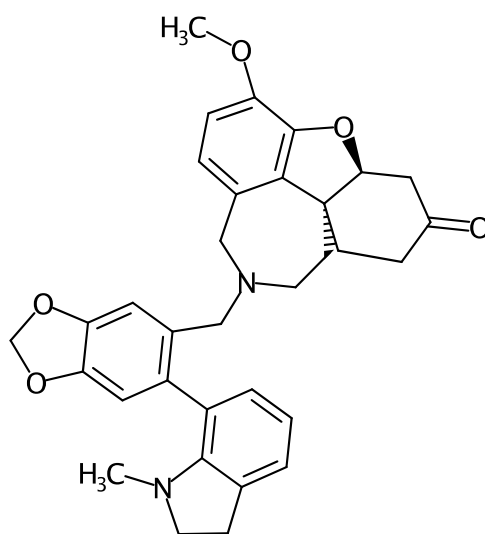
5.6 Narcimutalin

Narcimutalin je nový alkaloid izolovaný z *Narcissus pseudonarcissus*. cv. Dutsch Master. Struktura byla objasněna kombinací MS, vysoko účinnou hmotností spektrometrií (HRMS) 1D a 2D NMR a porovnáním s literárními údaji. Ve své struktuře kombinuje dva základní skelety galanthaminu a galanthidolu. Pomocí 2D experimentů jako je gHMBC a gCOSY (gradient correlation spektroskopie) došlo k jednoznačnému určení jeho struktury, která zahrnuje kombinaci tří fragmentů. Fragmenty A a B jsou navzájem spojeny methylenovou skupinou v poloze N fragmentu A a C-2' fragmentu B. Fragmenty B a C jsou spojeny vazbou mezi uhlíky C-8'a C-9' *N*-methylindolinu. Od narciplavinu a narcikachninu se odlišuje substitucí v poloze 3 fragmentu A, kde je místo hydroxyly navázána oxo skupina [60].

U zmiňovaného alkaloidu byla testována také inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE v porovnání s hydrobromidem galanthaminu a Huperzinem A. Narcimutalin vykazoval vysokou inhibiční účinnost vůči BuChE s hodnotou IC_{50} $5,90 \pm 0,23 \mu\text{M}$ [60].

Hodnocena byla též jeho inhibice vůči enzymu POP s pozitivní kontrolou prostřednictvím *Z*-Pro-linalu a berberinu, i v tomto případě byl narcimutalin vysoce účinný. Dosáhl sedminásobného zvýšení inhibiční účinnosti ve srovnání s berberinem s hodnotou IC_{50} $29,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ [60].

Poslední inhibiční aktivita byla provedena vůči GSK-3 β (glykogen syntasa kinasa-3 β), kde se narcimutalin opět prokázal jako účinný s hodnotou $20,8 \pm 2,4 \mu\text{M}$. Inhibice byla studována luminiscenční metodou s použitím syntetického derivátu arylindolemaleimidu SB-415286 s hodnotou 70 nM [60].

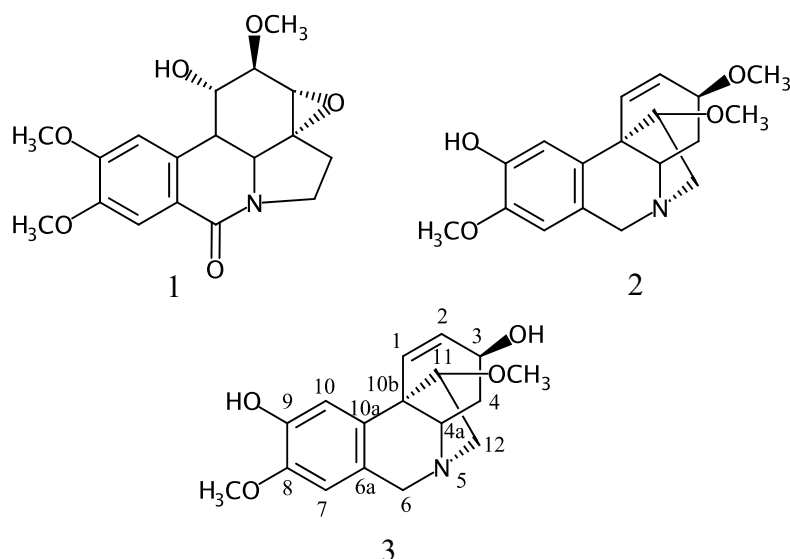


Obrázek 21. Narcimutalin [60]

5.7 Oxinkartin, 3,11-*O*-diacetyl-9-*O*-demethylmaritidin a

11-*O*-acetyl-9-*O*-demethylmaritidin

Tři nové alkaloidy byly izolovány z *Galanthus fosteri*. Pro charakterizace jejich struktury byly použité spektroskopické analýzy jako UV, IR, ECD a 1D, 2D NMR. Na jejich základě byl oxinkartin zařazen mezi alkaloidy lykorinového strukturního typu, další dvě látky nesly strukturní podobnost s alkaloidy haemanthaminového typu. Následně byl stanoven jejich inhibiční potenciál vůči AChE a BuChE s použitím galanthaminu jako standardu. Ve výsledcích byl 11-*O*-acetyl-9-*O*-demethylmaritidin účinnější než 3,11-*O*-diacetyl-9-*O*-demethylmaritidin s hodnotami IC₅₀ 6,04 μM a 67,04 μM. Aktivita zřejmě souvisí s hydroxy skupinami v poloze 3 a 11 v některých alkaloidech haemanthinového typu. Oxinkartin se projevil jako neaktivní [61].



Obrázek 22. Oxinkartin (1), 3,11-*O*-diacetyl-9-*O*-demethylmaritidin (2) a 11-*O*-acetyl-9-*O*-demethylmaritidin (3) [61]

5.8 Sarniensin, Krinsarnin a Sarniensinol

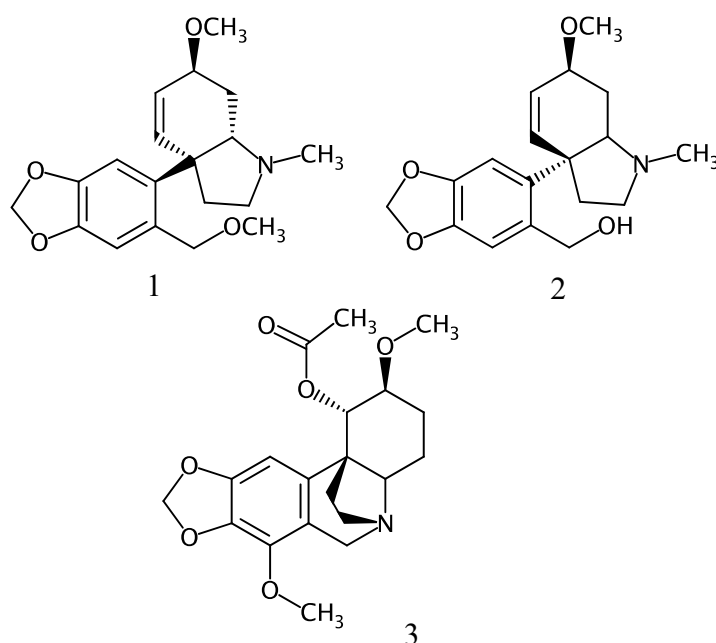
Z *Nerine sarniensis* byly izolovány tři nové alkaloidy patřící k mesembrinovému (sarniensin a sarniensinol) a krininovému typu (krinsarnin). Na základě spektroskopických metod byla objasněna jejich struktura. Sarniensin byl charakterizován jako (3aR, 4Z, 6S, 7aS)-6-methoxy-3a-(2'-methoxymethyl-benzo[1,3]dioxol-1'-yl)-1methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexyhydro-1H-indol. Sarniensinol je svojí strukturou blízce příbuzný sarniensinu s jediným rozdílem substituentu v poloze 2', kde se místo methoxymethyl skupiny nachází

hydroxymethyl substituent. Poslední alkaloid byl definován jako (1S,2S,4aR)-2,7-dimethoxy-1,2,3,4,4a,6-hexahydro-5,11b-etheno [1,3]dioxolo[4,5-j]fenantridin-1-yl-acetát [62].

Všechny tři alkaloidy byly hodnoceny proti referenčnímu kmeni *Aedes aegypti* (komár tropický). Tento hmyz je významným přenašečem horečky dengue, žluté zimnice a viru Zika, způsobující mikrocefalii a další závažné anomálie během těhotenství. Rozsáhlé používání chemických insekticidů k jeho regulaci vede mimo jiné ke vzniku rezistence a k nežádoucím účinkům vůči životnímu prostředí, proto se sekundární metabolity na rostlinné bázi těší značnému zájmu jako insekticidy a repelenty [62].

Sarniensinol a krinsarnin byly hodnoceny při testovací dávce 5 $\mu\text{g}/\text{komár}$ ve třech opakovaných pokusech, přičemž $97\% \pm 6\%$ mortalita byla zaznamenána u krinsarninu, který byl dále testován a měl hodnotu LD_{50} (50% latentní dávka) 2,3 $\mu\text{g}/\text{komár}$. Za jeho vysokou účinnost je zřejmě zodpovědná substituce na C-2. Sarniensinol vykazoval pouze 33% mortalitu [62].

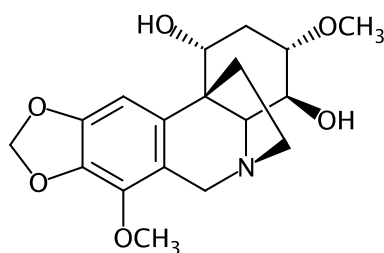
Podobným podmínkám byl vystaven i sarniensin v jiné studii. Při koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{komár}$ vykazoval 93,3% mortalitu a LD_{50} 1,38 $\mu\text{g}/\text{komár}$. Obě látky tak mají potenciál být použity jako insekticid na přírodní bázi proti *Ae. Aegypti* [63].



Obrázek 23. Sarniensin (1), sarniensinol (2) a krinsarnin (3) [63]

5.9 1,4-dihydroxy-3-methoxy povellan

Tento nový alkaloid byl izolován z *Amaryllis belladonna*. Struktura byla objasněna kombinací spektroskopických metod HRESIMS, CD a 2D-NMR na jejichž základě byl zařazen mezi alkaloidy krinanového typu. Následně byl hodnocen na antiplazmodiální aktivitu proti kmenu *Plasmodium falciparum* rezistentnímu na chlorochin. Ve výsledku vykazoval slabou inhibiční aktivitu s hodnotou $IC_{50} 37 \pm 3 \mu M$. U alkaloidu byla také testována antiproliferativní účinnost proti buněčné linii A2780, bohužel byla patrná jen velmi slabá inhibiční aktivita s hodnotou $IC_{50} > 60 \mu M$ [64].



Obrázek 24. 1,4-dihydroxy-3-methoxy povellan [64]

5.10 Zephykandidin I, II a III

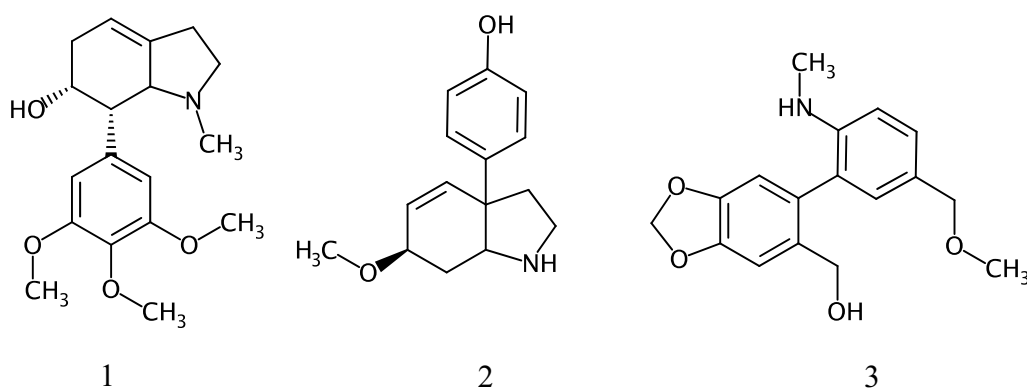
Ze *Zephyranthes candida* byly izolovány tři nové alkaloidy. Jejich struktury byly odvozeny pomocí spektroskopických analýz zahrnujících HRESIMS, 1H NMR, ^{13}C NMR, 1H - 1H COSY, HMBC a ECD [65].

Zephynokandidiny I a III představují nové typy skeletů a jako první sloučeniny byly zařazeny mezi strukturní typy 7-fenyl-hexahydroindolových a 5,2'-dimethyl-bifenyl-2-ylaminových alkaloidů. Druhý alkaloid, jehož strukturu tvoří C3a-fenyl-hexahydroindol, je vůbec první látkou tohoto typu, která byla izolována z rodu *Zephyranthes* [65].

Biosyntéza zephynokandidinu I vychází pravděpodobně z alkaloidů mesembrinového typu. Tyramin a kyselina 4-hydroxyskořicová jsou kondenzovány za vzniku důležitého intremediátového bis-fenylaminového alkaloidu. Po oxidaci fenolů, dvojných vazeb a rearomatizace vzniká klíčový meziprodukt 5-(2-aminoethyl)-4'-hydroxy-[1,1'-bifenyl]-2(5H)-on. Za katalýzy kyselinou vzniká 7-fenyl-tetrahydroindolový alkaloid, který následnou oxidací, methylací a konečnou redukcí dává vznik 7-fenyl-hexahydroindolovému alkaloidu. V případě zephynokandidinu III je pravděpodobný biosyntetický prekurzor 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (známý jako isovanilin), který reaguje s tyraminem za vzniku schiffovy báze. Po redukcii, oxidaci fenolů,

radikálové vazbě, rearomatizaci a intramolekulární nukleofilní adici vzniká důležitý meziprodukt, alkaloid haemanthaminového typu. Konečnou methylocí, oxidací a redukcí alkaloidu 5-formyl-bifenyl-2-ylaminového typu vzniká 5,2'-dimethyl-bifenyl-2-ylaminový alkaloid [65].

Všechny tři alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE za použití galanthaminu jako pozitivní kontroly. Výsledky ukázaly, že zephynokandidin III vykazuje silnou inhibiční aktivitu s hodnotou IC_{50} 8,82 μ M ve srovnání s IC_{50} 1,02 μ M galanthaminu, zbývající dva alkaloidy nevykazovaly významnou inhibici [65].



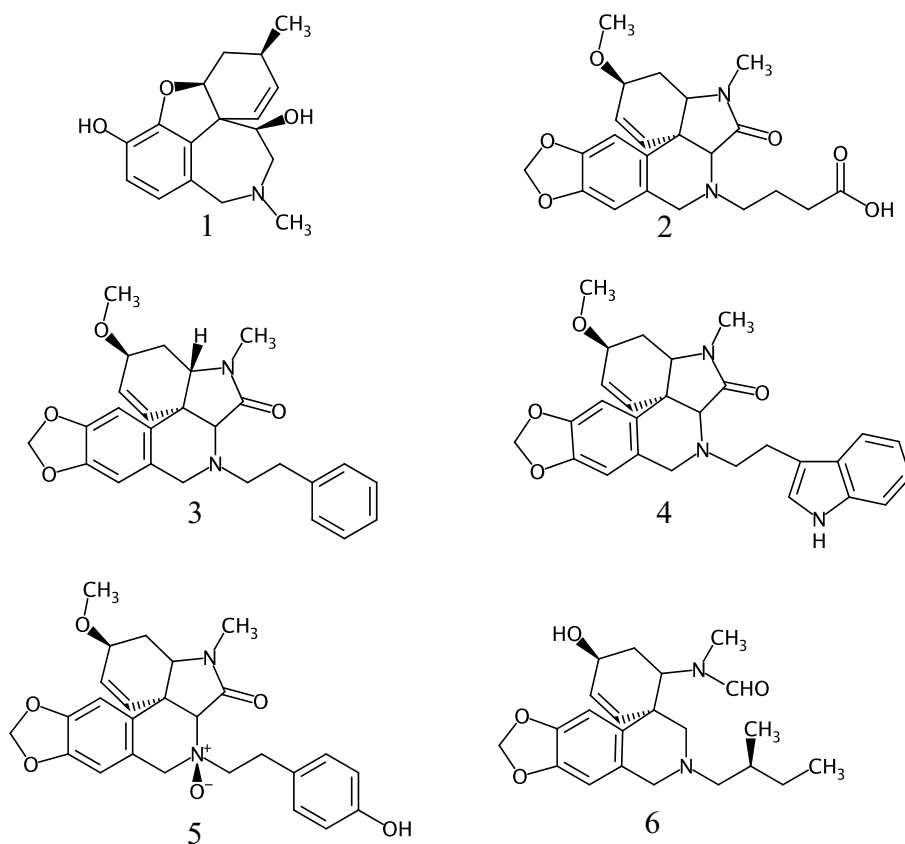
Obrázek 25. Zephykandidin I (1), II (2) a III (3) [65]

5.11 9-*O*-demethyl-11 β -hydroxygalanthamin, *N*-hydroxykarbonylpropyl-5,6-dihydroplikan, *N*-fenethyl-5,6 dihydroplikan, *N*-3-indolyethyl-5,6-dihydroplikan, Biliquin *N*-oxid a *N*-isopentyl-11,12-seco-5,6-dihydroplikan

Ze stejné rostliny (*Zephyrantes candida*) bylo izolováno celkem šestnáct nových alkaloidů. Pouze šest výše zmíněných alkaloidů ale vykazovalo biologickou aktivitu. Jejich struktury byly určeny rozsáhlou spektroskopickou analýzou a následně byly zařazeny mezi alkaloidy galanthaminového (9-*O*-demethyl-11 β -hydroxygalanthamin) a plikaminového typu. Alkaloidy plikaminového typu jsou v přírodě vzácné, doposud byly známé pouze čtyři sloučeniny (plikamin, plikam, obliquin a secoplikamin) [66].

Látky byly testovány z hlediska inhibiční aktivity vůči AChE. Aktivitu vykazoval pouze 9-*O*-demethyl-11 β -hydroxygalanthamin s hodnotou IC_{50} 168,7 μ M, u alkaloidů plikaminového typu byla zaznamenána pouze slabá účinnost. Zkoumána byla i protizánětlivá aktivita spočívající ve snížení produkce NO vyvolané lipopolysacharidy v myších makrofázích RAW 264,7 za použití dexamethasonu jako pozitivní kontroly. Látky plikaminového typu vykazovaly významnou inhibiční aktivitu s hodnotami IC_{50} 18,77; 10,21; 18,01; 7,50 a 23,55 μ M. Díky

těmto výsledků byla hodnocena i jejich celková cytotoxicita vůči buňkám RAW 264,7, žádná ze sloučenin ale nejevila celkovou cytotoxicitu [65].



Obrázek 26. 9-*O*-demethyl-11β-hydroxygalanthamin (1),
N-hydroxykarbonylpropyl-5,6-dihydroplikan (2), *N*-fenethyl-5,6-dihydroplikan (3),
N-3-indolyethyl-5,6-dihydroplikan (4), Biliquin *N*-oxid (5)
a *N*-isopentyl-11,12-seco-5,6-dihydroplikan (6) [66]

5.12 Zephygraniditin A, B, C, D, E a F

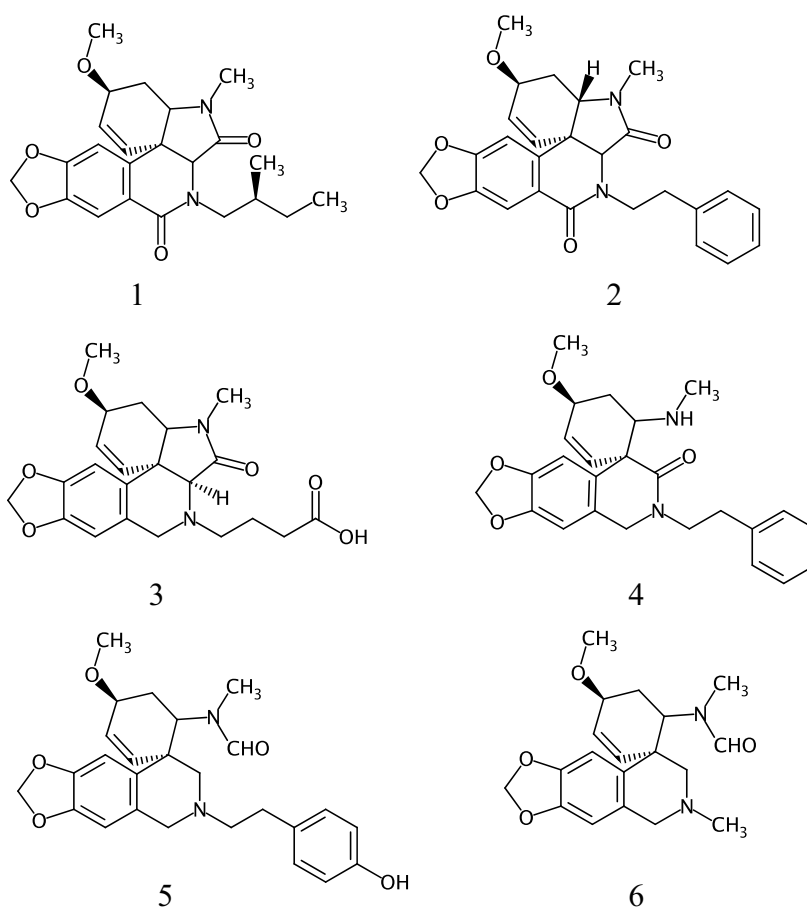
Šest nových alkaloidů bylo izolováno z rostliny *Zephyrantes grandiflora*. Struktury izolovaných sloučenin byly stanoveny na základě 1D, 2D (¹H-¹H COSY a HMBC) NMR spektroskopie. Tyto alkaloidy 4a-epi-plikaminového typu byly následně testovány *in vitro* na cytotoxický potenciál a na inhibiční aktivitu vůči produkci NO a COX-1 a COX-2 [67].

Cytotoxická aktivita byla hodnocena proti sedmi buněčným liniím maligního melanomu (A375, HS-4, SK-MEL-1, SK-MEL-2, WM278, 451Lu a MeWO) s použitím doxycyklinu jako pozitivní kontroly. Silnější cytotoxickou aktivitu s hodnotami IC₅₀ od 9,2 do 10,6 a od 12,4 do 13,9 μM vykazovaly zephygranidiny A a B. Slabší účinnost

s hodnotou IC_{50} v rozmezí 15,8 - 19,7 μ M byla naměřena u zephygranidinu C. Alkaloidy D, E a F nevykazovaly žádnou cytotoxickou aktivitu [67].

Během testování inhibiční aktivity vůči COX-1,2 byly pro srovnání použity SC-560 a NS-398, které poskytly inhibici COX-1 s 63,3 % a COX-2 s 96,7 %. Nejvyšší protizánětlivá aktivita v obou testech byla zaznamenána u zephygraniditinů A a B s hodnotami IC_{50} $17,3 \pm 0,4$ a $20,1 \pm 1,3$ μ M v inhibici NO, v případě cyklooxygenas byly naměřeny hodnoty 50,2 a 48,3 % pro COX-1 a 88,7 a 85,1 % pro COX-2 [67].

Výsledky naznačují, že přítomnost ketonu na C-6 ve struktuře zephygraniditinu A a B zvyšuje bioaktivitu těchto alkaloidů [67].



Obrázek 27. Zephygranditin A (1), B (2), C (3), D (4), E (5) a F (6) [67]

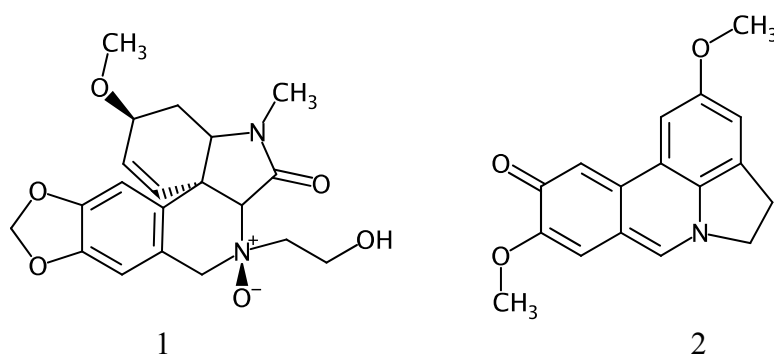
5.13 Zephykarinatin F a I

Z celé rostliny *Zephyranthes carinata* bylo izolováno celkem 11 nových alkaloidů, ale pouze dva vykazovaly během hodnocení biologickou aktivitu. Jejich struktura byla stanovena rozsáhlou interpretací spektroskopických dat, po které byly následně zařazeny mezi

alkaloidy plikaminového (zephykarinatin F) a lykorinového (zephykarinatin I) typu, přičemž zephyrakarinati F je teprve čtvrtým představitelem plikaminových alkaloidů N-oxidovaného typu [68].

Alkaloidy byly testovány z hlediska inhibiční aktivity vůči AChE s použitím galanthaminu jako pozitivní kontroly. Mírnou aktivitu vykazoval alkaloid zephykarinatin F s hodnotou IC_{50} $126,16 \pm 2,72 \mu\text{M}$, podobně na tom byl i zephykarinatin I s hodnotou IC_{50} $35,61 \pm 1,90 \mu\text{M}$, který ve své struktuře obsahuje aromatický kruh C, pravděpodobně zodpovědný za zvýšení inhibiční aktivity [68].

Za zmínku stojí i izolované alkaloidy zephykarinatinu A, B a G, které představují první příklady 12-acetylplikaminových, N-deformyl-seco-plikaminových a 4a-epi-plikaminových alkaloidů [68].



Obrázek 28. Zephykarinatin F (1) a I (2) [68]

5.14 6 α -ethoxyhippeastidin, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin, narcieliin, zephyjanin, zephycitrin I, 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol a zephycitrin II

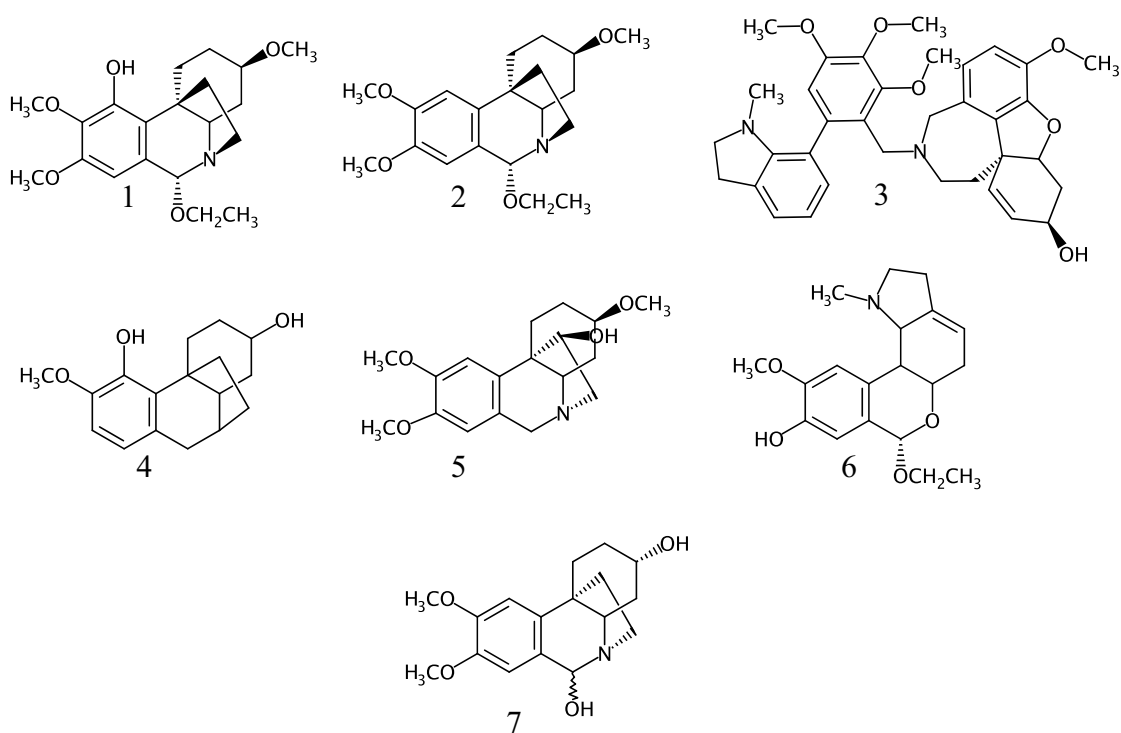
Sedm nových alkaloidů bylo izolováno z rostliny *Zephyranthes citrina*. Jejich struktury byly identifikovány za použití MS, NMR, optické otáčivosti a porovnáním s literárními údaji a byly zařazeny mezi alkaloidy krininového (6 α -ethoxyhippeastidin, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin), narcikachninového (narcieliin), krininového/haemanthaminového (zephyjanin), haemanthaminového (zephycitrin I), homolykorinového (7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol) a krinanového (zephycitrin II) typu [69].

Všechny látky byly izolovány v dostatečném množství pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE v porovnání s galanthaminem a Huperzinem A. Pozoruhodnou aktivitu projevil narcieliin s hodnotami IC_{50} $18,66 \pm 2,28$ a $1,34 \pm 0,31 \mu\text{M}$. Jeho účinnost vůči AChE

pravděpodobně souvisí s přítomností galanthaminové části molekuly, naopak galanthindolová část je zodpovědná za inhibici BuChE [69].

Testována byla i inhibiční aktivita vůči enzymu POP za použití berberinu jako referenční látky. I zde narceliin vykázal zajímavou aktivitu s hodnotou IC_{50} $163 \pm 13 \mu M$, podobná účinnost byla naměřena i u zephycitrinu II s IC_{50} $160 \pm 10 \mu M$ [68].

V rámci studie byly látky hodnoceny i z hlediska cytotoxické aktivity vůči devíti buněčným nádorovým liniím (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2) při koncentraci $10 \mu M$. Doxorubicin byl použit jako standard. Bohužel žádná z nově objevených látek nevykazovala významnější aktivitu [69].



Obrázek 29. 6α-ethoxyhippeastidin (1), 10-deoxy-6α-ethoxyhippeastidin (2), narceliin (3), zephyjanin (4), zephycitrin I (5), 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol (6) a zephycitrin II (7) [69]

6 Experimentální část

6.1 Všeobecné postupy

6.1.1 Destilace

Veškerá rozpouštědla používaná v experimentální části, byla před samostatným využitím predestilována. Destilační předek zachycený v prvním kroku činil přibližně 5 % celkového objemu. Ve druhém kroku byla zachycena hlavní frakce, při které bylo predestilováno maximálně 90 % původního objemu rozpouštědla. Predestilovaná rozpouštědla byla uchovávána v hnědých širokhrdlých lahvích, adekvátně označena a chráněna před světlem.

6.2 Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení pro izolaci alkaloidů

6.2.1 Chemikálie, rozpouštědla a pomocný materiál

- Ethanol 90%, denaturovaný methanolem (EtOH), (Penta a.s.)
- Destilovaná voda (H₂O)
- Chloroform p.a., (CHCl₃) (Penta a.s.)
- Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru, (Et₂O) (Penta a.s.)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w), (Na₂CO₃), (Lachema)
- 2% kyselina chlorovodíková (HCL) (Penta a.s.)
- Síran sodný bezvodý čistý, (Na₂SO₄), (Penta a.s.)
- Mayerovo činidlo

6.2.2 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Heidolph – Hei-VAP Advatage G1
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 90 A s hmotnostním detektorem 5975 C inert MSD, EI mód 70 eV, kolona HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

6.2.3 Databáze použité k vyhodnocení výsledků

- Knihovna EI-MS spekter NIST Virtual Library 2011 (NIST Gaithersburg, Maryland, USA)

6.3 Příprava sumárních extraktů

6.3.1 Použitý rostlinný materiál

Rostlinným materiálem byly cibule rodu *Narcissus* sp. o různé hmotnosti zakoupené od firmy LUKON GLANDS, která má své sídlo v Lysé nad Labem.

Po dodání byly jednotlivé kultivary zmrazeny a uchovávány v mrazícím boxu. Před samotným použitím byly ponechány při pokojové teplotě do rozmrznutí, následně zváženy a dále zpracovávány.

6.3.2 Průběh extrakce cibulí

Rozmrznuté cibule byly nejprve zváženy a poté na hrubo rozřezány kuchyňským nožem. Nakrájené cibule byly vloženy do odměrné nádoby a zality přiměřeným množstvím ethanolu 96% tak, aby byly ponořeny. Cibule byly následně rozmixovány tyčovým mixérem pro snadnější extrakci obsahových látek. Takto vytvořená masa byla přelita do 2000 ml Erlenmayerovy baňky a doplněna ethanolom 96% do objemu 1 l. Obsah Erlenmayerovy baňky ve vodní lázni na vařiči byl poté přiveden k varu po dobu 30 minut. Poté byl obsah zfiltrován. Zbytky cibulí byly následně opětovně vyvařeny v čerstvém ethanolu (96%) celkem 3x. Po ukončení extrakce se ponechala varná baňka s obsahem všech tří filtrátů ochladit ve studené vodní lázni. Část filtrátu se převedla do destilační baňky pro následné odpaření. Odpaření extraktu probíhalo na vakuové odparce Heidolph – Hei-VAP Advatage G1 při teplotě, 40 °C a otáčkách 80 za minutu. Postupně se takto odpařil veškerý extrakt do sucha. Destilační baňka s odpařeným extraktem se uchovávala do dalšího zpracování v lednici při teplotě 2-8 °C.

6.3.3 Zpracování extraktu

Dalším krokem pro získání sumárního alkaloidního extraktu bylo vytřepávání odpařeného extraktu. Destilační baňka, o známé hmotnosti, se suchým extraktem se nejprve zvážíla a následně se obsah baňky rozpustil 2% kyselinou chlorovodíkovou. Okyselením vznikla ve vodě rozpustná alkaloidní sůl. Pro snazší a rychlejší rozpuštění extraktu se baňka vložila do ultrazvukové lázně. Jakmile se celý obsah rozpustil byl následně zfiltrován přes vlizelín. V průběhu filtrace byl vlizelín několikrát promyt destilovanou vodou. Takto získaný filtrát se pak převedl do dělicí nálevky. Naměřená hodnota pH filtrátu byla cca 2. V dalším kroku byl extrakt vytřepáván etherem o objemu 150 ml. Do etheru, jako nepolárního rozpouštědla, přecházejí balastní, neutrální látky, jako např. tuky nebo silice. Vytřepávání se provádělo 3x. Spojené vodné, kyselé výtřepky se následně zalkalizovali 10% roztokem

uhlíčitanu sodného o objemu přibližně 150 ml na pH cca 10. Zalkalizováním se sůl alkaloidu převedla opět na původní lipofilní alkaloidní bázi. Alkaloidní vrstva byla poté 3x vytřepána 200 ml chloroformu za průběžného oddělování dolní chloroformové vrstvy do kádinky. Pro ověření, zdali do chloroformové vrstvy přešly všechny alkaloidy, se provedla zkouška za použití Mayerova činidla, které je schopno zachytit i stopy alkaloidů. Vzorek vodné alkaloidní frakce se okyselil na hodnotu pH přibližně 3 a poté se přidalo několik kapek Mayerova činidla. V případě přítomnosti alkaloidů by se vyloučila bílá sraženina. Po prokázání, že se již ve vodné vrstvě žádné alkaloidy nenachází, se do chloroformové vrstvy přidalo potřebné množství síranu sodného bezvodého pro odstranění zbytkové vody. Následovala filtrace přes filtrační papír do destilační baňky a opětovné odpaření do sucha na vakuové odparce. Po odstranění chloroformu se extrakt dosušil v exikátoru a následně zvažil. Vzniklý sumární alkaloidní extrakt byl uchován v dobře uzavřené vialce v lednici při teplotě 4 - 6 °C.

6.4 GC-MS analýza a identifikace alkaloidů

Pro zjištění obsahu alkaloidů v jednotlivých kultivarech rodu *Narcissus* byl použit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C, který pracoval při elektronové ionizaci 70 eV. Separace probíhala s využitím kolony HP-5MS, 30 m x 0,250 mm s teplotním programem v rozmezí 100-180 °C (15 °C/min), 180 (1 min) a 180-300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min). Helium s rychlostí průtoku 0,8 ml/min bylo použito jako mobilní fáze. Nástřik 1 µl analyzovaného methanolického vzorku o koncentraci 1 mg/ml byl proveden za teploty 180 °C při splitu 1:10. Naměřené hodnoty byly v rozsahu 40-600 m/z.

Následná identifikace jednotlivých alkaloidů byla provedena porovnáním získaných spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s látkami, které byly již izolovány v laboratoři.

6.5 Stanovení inhibiční aktivity vůči humánní AChE a BuChE

6.5.1 Chemikálie

- Acetyltiocholin jodid (ATChI), (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Butyrylcholin jodid (BuTChI), (Sigma-aldrich s.r.o.)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB), (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO), (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)

- Hupezin A 95% (TAZHONGHUI-Tai'an an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- Eserin (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (Lachema)
- Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (Lachema)
- Chlorid sodný p.a. (NaCl) (Lachema)

6.5.2 Tlumivý roztok

- 100mM fosfátový pufr o pH 7,4

6.5.3 Činidla

- 5mM roztok DTNB
- 10mM roztok ATChI
- 10mM roztok BuTChI

6.5.4 Přístrojové vybavení a použité programy

- Reagery Synergy™ HT Multi. Detection microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka VWR standart analog shaker 1000 (vWR, Radnor, Pensilvania, USA)
- Program na vyhodnocování statistických dat GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

6.5.5 Rekombinantních enzymy

Použité enzymy byly připraveny rekombinantní technologií na katedře chemie Přírodovědecké fakulty, Univerzity v Hradci Králové. Médium obsahující enzymy se v čase potřeby naředilo 100mM fosfátovým pufrem o pH 7,4. Hodnota absorbance pro AChE musela být v rozmezí 0,08-0,15 a pro BuChE v rozmezí 0,15-0,20. Medium bylo rozpipetováno na základě spočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření do mikrozkušavek. Zmražené enzymy byly uchovávány v mrazáku při teplotě -22 °C do doby použití.

6.5.6 Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Inhibiční aktivita IC_{50} byla stanovena Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s využitím DTNB.

Pro stanovení inhibiční aktivity enzymů bylo do šesti mikrotitračních destiček napipetováno 8,3 µl připraveného media, 283 µl 5mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Směs byla promíchávána na mikrotřepačce po dobu 1 minuty a následně inkubována 5 minut v komoře readeru při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 33,3 µl roztoku substrátu, přičemž se jednalo buď o 10mM ATChI nebo 10mM BuTChI. Následně byla změřena absorbance za příslušné vlnové délky, která byla v případě obou rekombinantních enzymů 412 nm. Procenta inhibice (%I) se směrodatnou odchylkou byla spočítána pomocí uvedeného vzorce

$$\%I = 100 - \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \times 100$$

ΔABL – nárůst absorbance slepého vzorku během jedné minuty

ΔASA – nárůst absorbance měřeného vzorku během jedné minuty

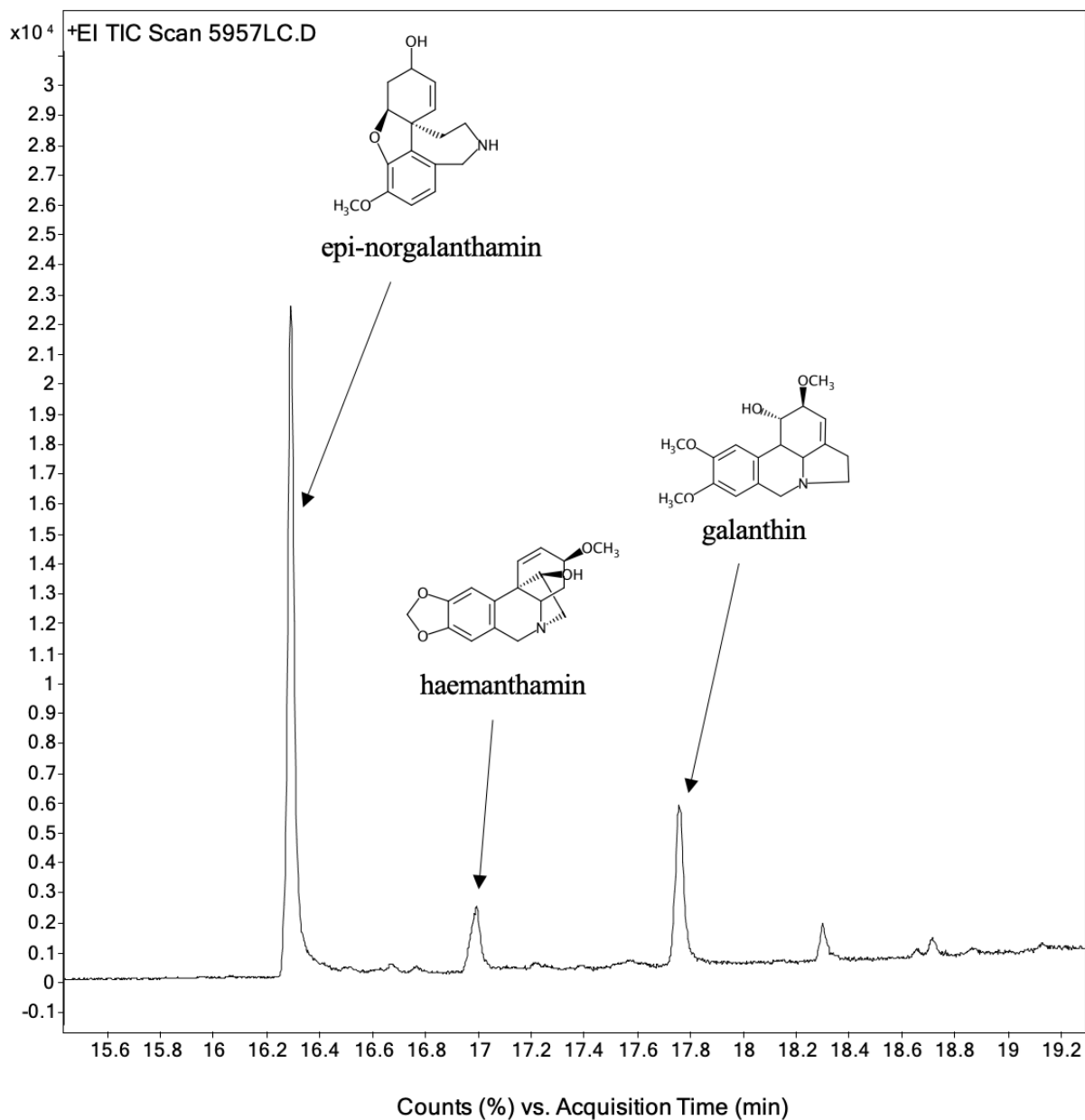
Stejným způsobem probíhalo měření inhibiční aktivity u získaných alkaloidních extraktů. Do mikrotitračních destiček byly napipetovány stejné objemy činidel a roztoku substrátu. Místo 8,3 µl DMSO byl použit roztok extraktu v příslušné koncentraci – 50 µg/ml. Poslední jamka obsahovala čistý DMSO jako slepý vzorek. U extraktů, které vykazovaly procenta inhibice vyšší než 60 % byla stanovena hodnota IC_{50} .

Hodnoty IC_{50} byly určeny nelineární regresí poklesu aktivity AChE a BuChE s využitím programu GraphPaD Prism. Extrakty byly měřeny v koncentrační řadě 500; 50; 5; 0,5; 0,05 µg/ml. Získané hodnoty byly porovnány s IC_{50} referenčních látek - galanthaminu, eserinu a Huperzinu A.

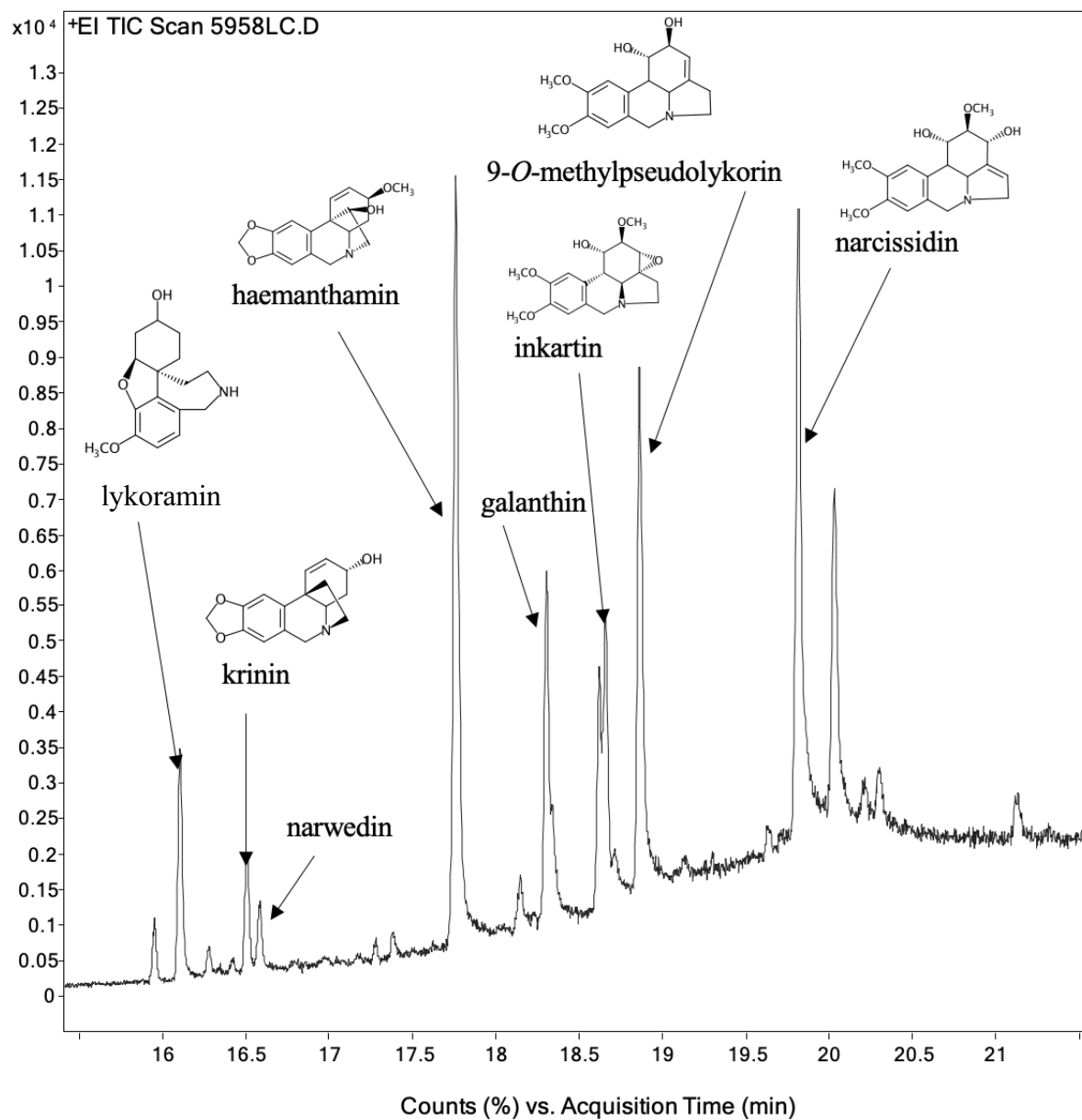
7 Výsledky

7.1 Chromatogramy jednotlivých sumárních extraktů

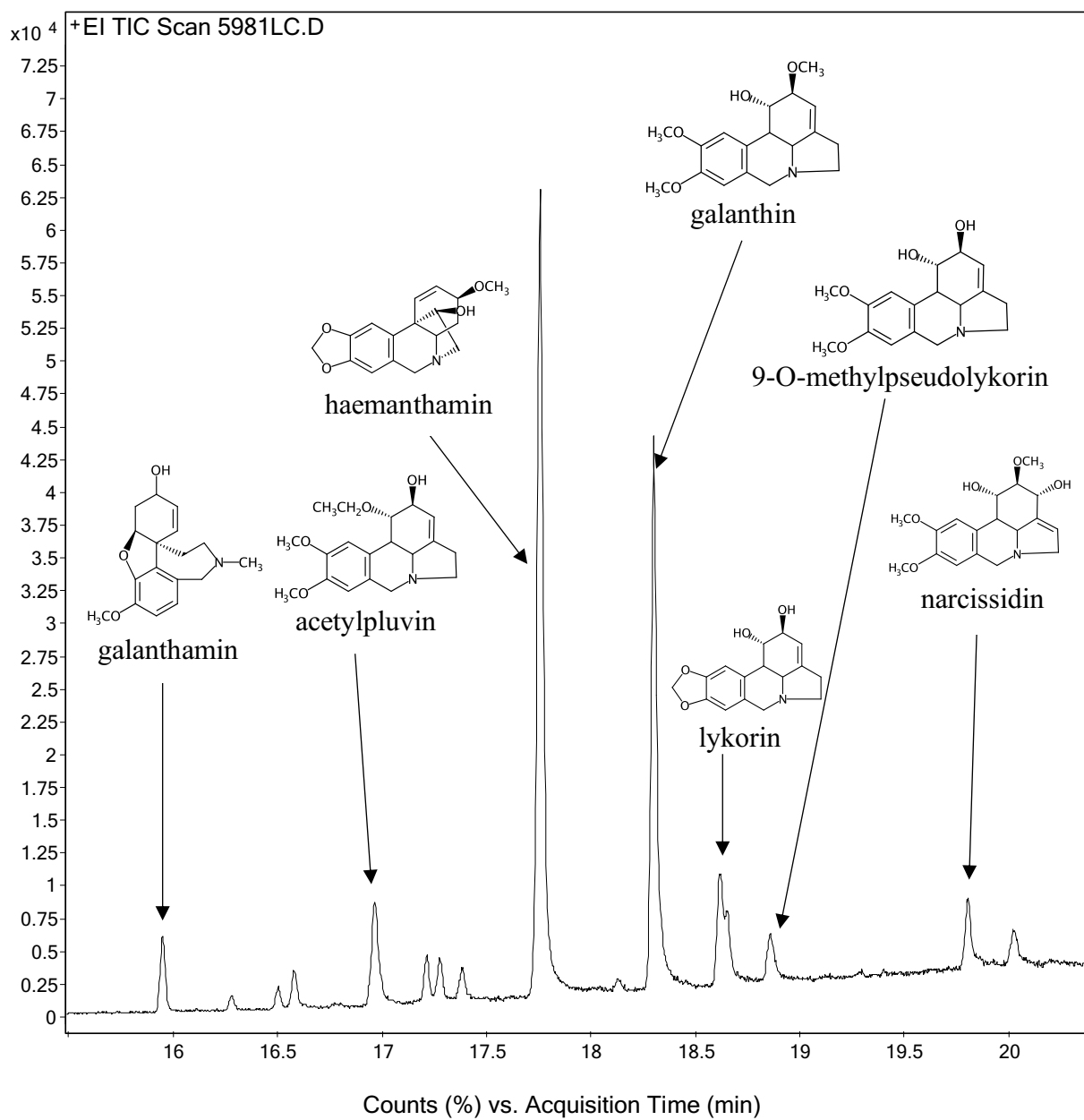
V následující kapitole jsou uvedeny chromatogramy příslušných alkaloidních extraktů.



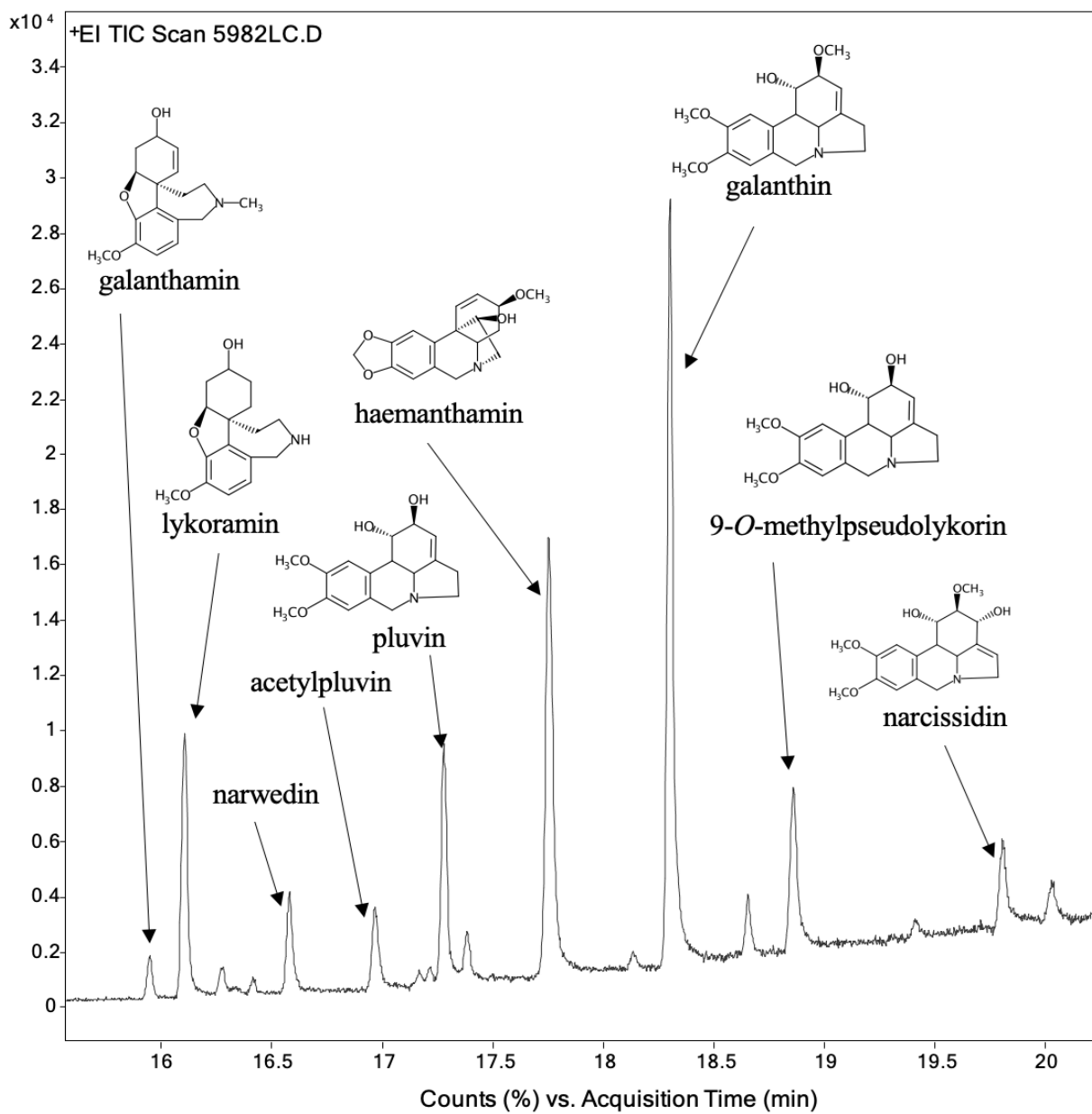
Obrázek 30. chromatogram sumárního extraktu AL-725



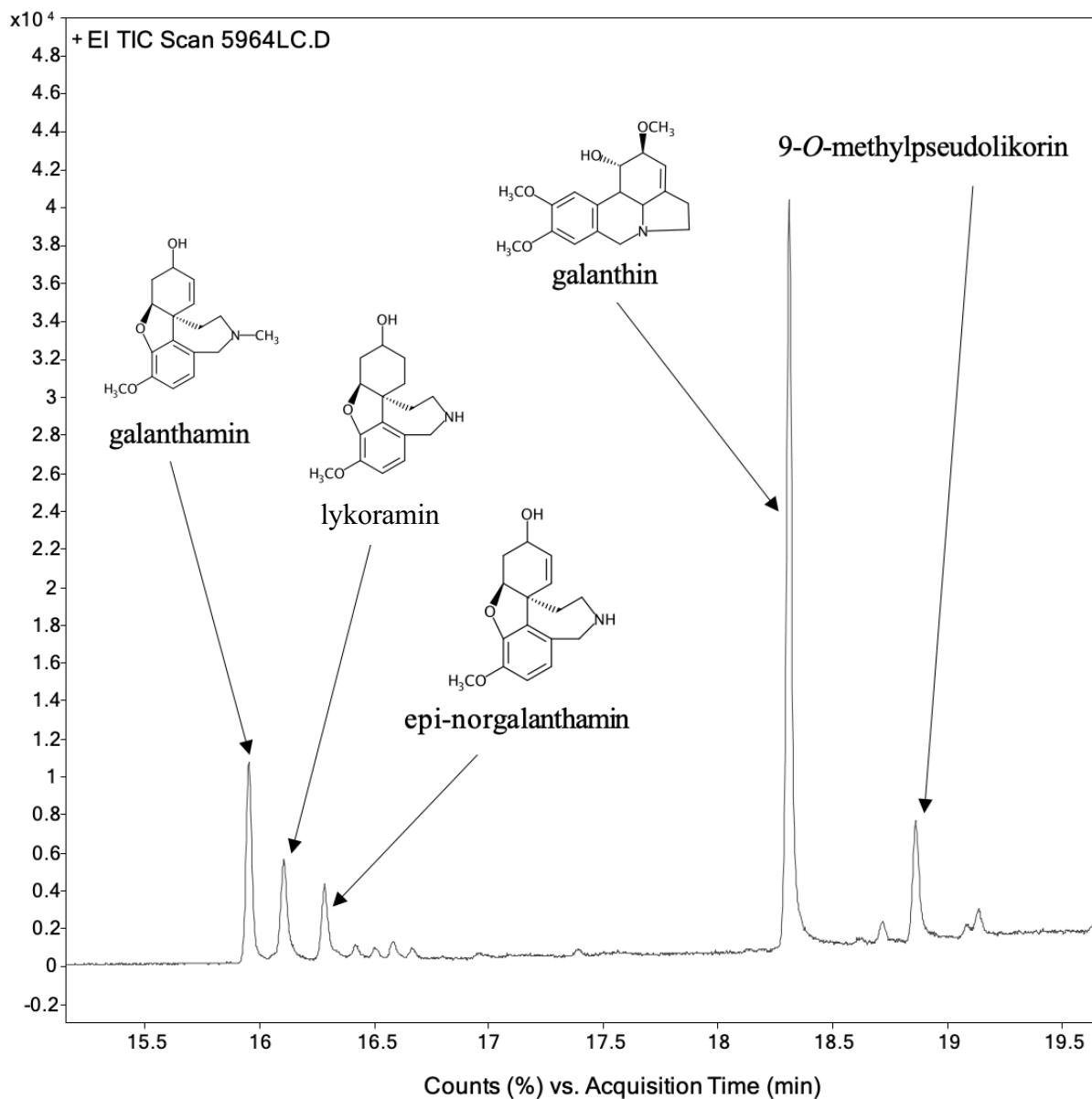
Obrázek 31. chromatogram sumárního extraktu AL-728



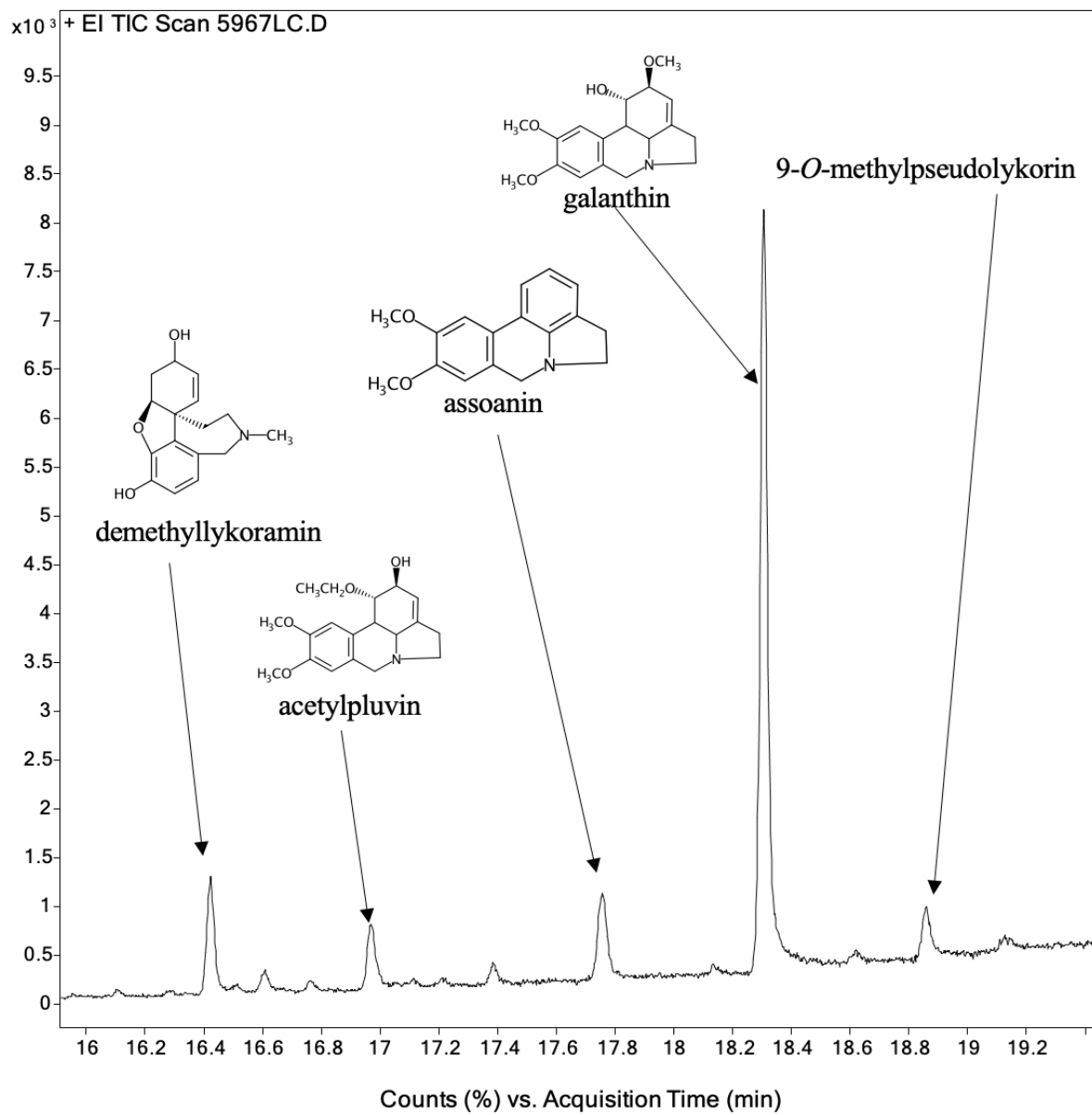
Obrázek 32. chromatogram sumárního extraktu AL-734



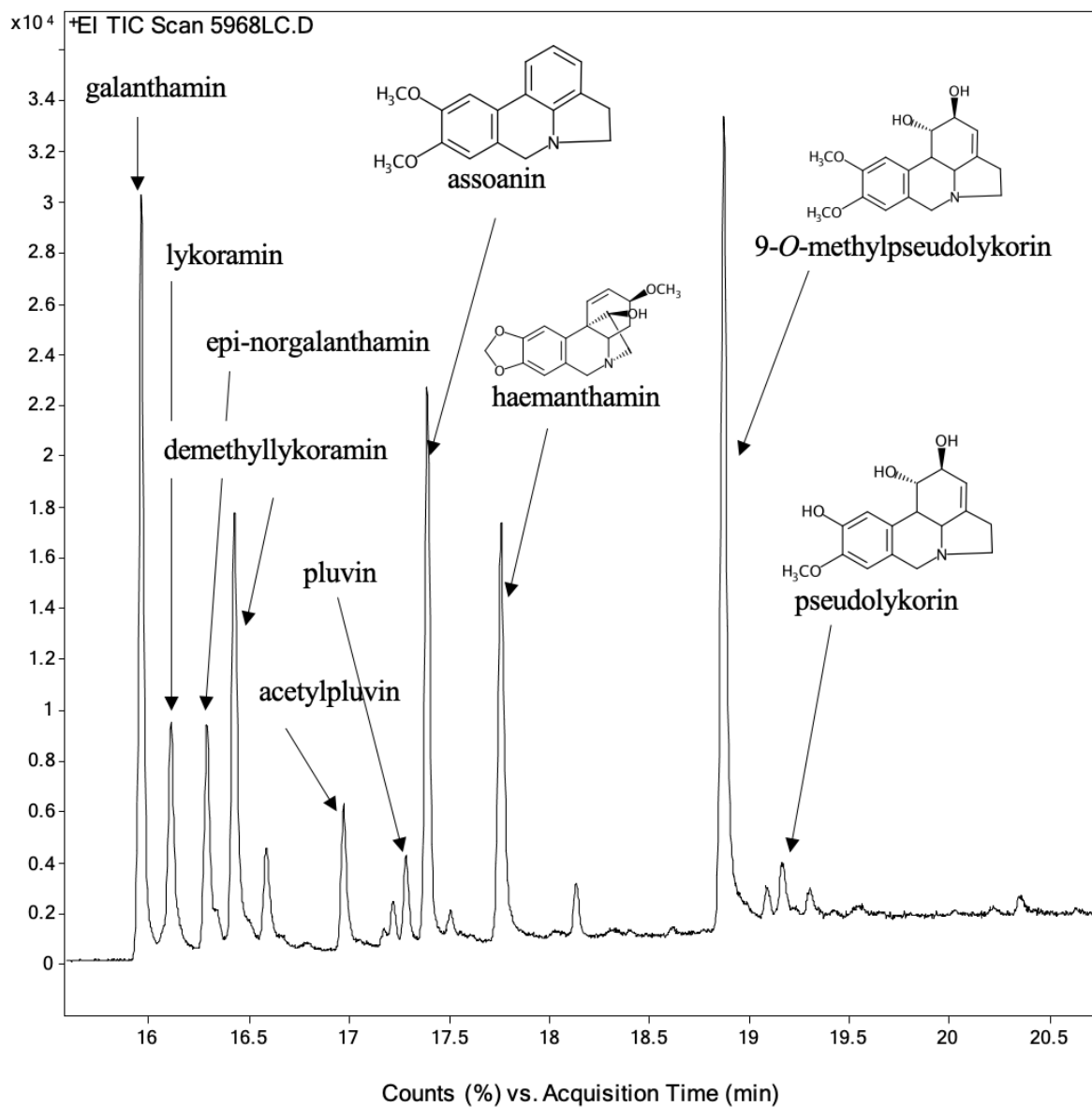
Obrázek 33. chromatogram sumárního extraktu AL-739



Obrázek 34. chromatogram sumárního extraktu AL-743



Obrázek 35. chromatogram sumárního extraktu AL-745



7.2 Zastoupené alkaloidy v jednotlivých kultivarech

Tabulka 1. Přehled obsažených alkaloidů v kultivarech

Strukturní typ	Alkaloid	AL-723	AL-725	AL-728	AL-734	AL-739	AL-743	AL-745
Galanthaminový	galanthamin	-	+	+	+	+	-	+
	lykoramin	-	+	-	+	+	-	+
	demethyllykoramin	-	-	-	-	-	+	+
	epi-norgalanthamin	+	-	-	-	+	-	+
	narwedín	-	+	-	+	-	-	-
lykorinový	lykorin	-	-	+	-	-	-	-
	pseudolykorin	-	-	-	-	-	-	+
	9-O-methylpseudolykorin	-	+	+	+	+	+	+
	pluvin	-	-	-	+	-	-	+
	acetylpluvin	-	-	+	+	-	+	+
	galanthin	+	-	+	+	+	+	-
	inkartin	-	+	-	-	-	-	-
	assoanin	-	-	-	-	-	+	+
narcissidin	-	+	+	+	-	-	-	
krininový	krinin	-	+	-	-	-	-	-
haemanthaminový	haemanthamin	+	+	+	+	-	-	+

7.3 Výtěžky ethanolových a alkaloidních extraktů

Tabulka 2. Výtěžky ethanolových a alkaloidních extraktů

Kód vzorku	Název kultivaru	Množství cibulí (g)	EtOH extrakt (g)	Alkaloidní extrakt (g)	Výtěžek alkaloidů [%]
AL-723	<i>Narcissus</i> cv. Daydream	371,6	21,9	1,038	0,279
AL-725	<i>Narcissus</i> cv. Gay Kybo	274,3	16,7	0,613	0,223
AL-728	<i>Narcissus</i> cv. High Society	254,9	15,0	0,471	0,185
AL-734	<i>Narcissus</i> cv. Love Call	520,2	37,5	0,205	0,039
AL-739	<i>Narcissus</i> cv. Peach and Cream	296,6	18,9	0,341	0,115
AL-743	<i>Narcissus</i> cv. Sunny Girlfriend	413,4	25,3	0,641	0,155
AL-745	<i>Narcissus</i> cv. Yellow Salome	324,6	48,8	0,364	0,112

7.4 Inhibiční aktivita sumárních alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám. U extraktů, které během screeningu při koncentraci 50 µg/ml vykazovaly aktivitu více než 60 %, byla změřena hodnota IC₅₀.

Tabulka 3. Přehled inhibičních aktivit testovaných extraktů vůči AChE/BuChE

Kód vzorku	<i>i</i>AChE % [50 µg/ml]	IC₅₀ AChE [µg/ml]	<i>i</i>BuChE % [50 µg/ml]	IC₅₀ BuChE [µg/ml]
AL-723	86,99 ± 1,13	3,42 ± 0,13	53,86 ± 1,45	>20
AL-725	21,60 ± 2,101	>20	27,25 ± 1,11	>20
AL-728	63,48 ± 1,06	17,34 ± 0,40	21,80 ± 2,14	>20
AL-734	25,71 ± 1,88	>20	12,88 ± 1,16	>20
AL-739	83,69 ± 0,80	3,54 ± 0,36	44,79 ± 1,44	>20
AL- 743	0	>20	45,59 ± 1,39	>20
AL-745	81,40 ± 1,04	5,19 ± 0,21	32,54 ± 0,55	>20
galanthamin	100	0,74 ± 0,05	100	12,41 ± 0,98
eserin	100	0,06 ± 0,00	100	0,08 ± 0,03
Huperzin A	100	0,01 ± 0,00	-	-

8 Diskuze a závěr

Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae jsou předmětem aktivního výzkumu již řadu let. Jedním z důvodů je hledání nových účinných látek především v terapii civilizačních chorob, jako jsou nádorová nebo neurodegenerativní onemocnění, jejichž incidence stále stoupá. Dalším důvodem je i hledání nových potencionálních zdrojů pro jejich izolaci, jelikož některé látky jako například galanthamin, se v současnosti získávají převážně izolací z druhů rodu *Narcissus*. Rostliny z této čeledi disponují celou řadou rozmanitých biologických aktivit, které je možné potencionálně využít v terapii nejen civilizačních chorob, ale také například k léčbě malárie nebo virových onemocnění.

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce byl screening biologické aktivity sedmi kultivarů rodu *Narcissus*. Jmenovitě se jednalo o *Narcissus* cv. Daydream (AL-723) *Narcissus* cv. Gay Kybo (AL-725), *Narcissus* cv. High Society (AL-728), *Narcissus* cv. Love Call (AL-734), *Narcissus* cv. Peach and Cream (AL-739), *Narcissus* cv. Sunny Girlfriend (AL-743) a *Narcissus* cv. Yellow Salome (AL-745).

Kultivary byly zpracovány na sumární alkaloidní extrakty, který byly následně podrobeny GS-MS analýze za účelem identifikace obsažených alkaloidů. Získané chromatogramy byly porovnány s knihovnou spekter NIST a s látkami, které byly již v laboratoři izolovány. Celkem byla zjištěna přítomnost 16 alkaloidů, které je možné zařadit do galanthaminového (galanthamin, lykoramin, demethyllykoramin, epi-norgalanthamin a narwedín), lykorinového (lykorin, pseudolykorin, 9-*O*-methylpseudolykorin, pluvín, acetylpluvín, galanthin, inkartin, assoanin a narcissidín), krininového (krinin) a haemanthaminového (haemanthamin) strukturního typu. Je třeba říci, že přítomnost těchto alkaloidů je pouze orientační, pro jejich potvrzení by bylo nutno provést konkrétní izolaci alkaloidů. Zastoupení jednotlivých alkaloidů v kultivarech je možné nalézt v tabulce 1.

V dalším kroku byla testována biologická aktivita získaných alkaloidních extraktů. Prostřednictvím Ellmanovy spektrofotometrické metody byla stanovena procentuální inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE měřená při koncentraci 50 µg/ml. U extraktů, které vykazovaly inhibiční aktivitu přes 60 % byla následně stanovena hodnota IC₅₀. Tato podmínka byla splněna u čtyř kultivarů – Daydream (AL-723), High Society (AL-728), Peach and Cream (AL-739) a Yellow Salome (AL-745). Látky byly porovnány s naměřenými hodnotami standardů – galanthaminem, eserinem a Huperzinem A v µg/ml. Nejslibnější aktivitu vykazoval kultivar Daydream (AL-723) s hodnotou IC₅₀ (AChE) 3,42 ± 0,13 µg/ml. Tato účinnost zřejmě souvisí s vyšším obsahem epi-norgalanthaminu. Bohužel, žádný z kultivarů nevykazoval uspokojivou

aktivitu vůči BuChE. Nízká schopnost inhibovat AChE a BuChE ostatních kultivarů pravděpodobně souvisí s menším zastoupením látek, které inhibují oba enzymy, jako jsou zejména zástupci galanthaminového typu. Dalším možným důvodem může být překrytí aktivity jinými alkaloidy, které byly v extraktu přítomny. Přehled jednotlivých aktivit lze nalézt v tabulce 3.

Největší zastoupení galanthaminu bylo zpozorováno u kultivaru Yellow Salome (AL-745), který by mohl být využit jako jeho případný zdroj. U kultivarů Gay Kybo (AL-725), a High Society (AL-728) bylo zaznamenáno poměrně velké zastoupení haemanthaminu, který je znám svojí cytotoxickou aktivitou a pro jeho izolaci by mohly být využity i tyto kultivary.

Z haemanthaminu byla také vyvinuta řada semisyntetických derivátů, obměny spočívají především v modifikaci OH skupiny v poloze C-11 a dvojně vazby v kruhu D [70]. Příkladem může být 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthamin, který ve srovnání s cytotoxickou aktivitou haemanthaminu vykazoval nejen vyšší účinnost, ale byl aktivní i proti rezistentním buněčným liniím (A549 - plicní karcinom a PANC1 - epiteloidní karcinom pankreatu) vůči doxorubicinu [71].

Rod *Narcissus* představuje vydatný a bohatý zdroj látek s pozoruhodnou biologickou aktivitou, která nabízí na poli současných civilizačních chorob, obtížně léčitelných chorob nebo doposud nevléčitelných nemocí (AD), naději do budoucna, kdy by i tato onemocnění přestala být fatální.

Zkoumání rodu *Narcissus* bylo velice zajímavé, už jen z toho pohledu, že většina laické veřejnosti pohlíží na zástupce tohoto rodu, jen jako na krásné jarní květiny, aniž by si uvědomovala, jaké nepřehledné množství jejich alkaloidy nabízejí v oblasti farmacie a medicíny.

9 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra Farmakognozie a farmaceutické botaniky

Řešitel: Saaková Franciska

Školitel: PharmDr. Daniela Hulcová Ph.D.

Název práce: Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus* sp. II

Klíčová slova: *Narcissus*, Daydream (AL-723), Gay Kybo (AL-725), High Society (AL728), Love Call (AL-734), Peach and Cream (AL-739), Sunny Girlfriend (AL-743) a Yellow Salome (AL-745), inhibice AChE a BuChE

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae se po tisíce let používají jako zdroj léčivých prostředků. Již ve 4. století př. n. l. používal Hippokrates z Kósu olej z narcisu *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy. Kromě již zmíněné protinádorové aktivity má tato čeleď řadu dalších významných biologických účinků, jako jsou antimalarické, antimykotické, antibakteriální, antivirové, emetické, analgetické, acetylcholinesterázové (AChE) a butyrylcholinesterázové (BuChE) inhibiční účinky [11]. Toto široké spektrum vlastností z nich činí vhodné kandidáty pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, rakoviny nebo malárie, jejichž výskyt v populaci stoupá. Z tohoto důvodu je velmi důležité hledat nová potenciální léčiva, která by mohla najít uplatnění v terapii nejen civilizačních, ale i mnoha dalších chorob [32].

Cílem této práce byl screening biologické aktivity alkaloidních extraktů získaných ze sedmi kultivarů rodu *Narcissus* – Daydream (AL-723), Gay Kybo (AL-725), High Society (AL728), Love Call (AL-734), Peach and Cream (AL-739), Sunny Girlfriend (AL-743) a Yellow Salome (AL-745). Čerstvé cibule byly rozemlety a extrahovány ethanolem (96 %). Souhrnný extrakt alkaloidů byl přečištěn extrakcí kapalina-kapalina. Vzorky extraktů z každého kultivaru byly analyzovány pomocí GS-MS a podrobeny screeningu na schopnost inhibovat lidské cholinesterasy při koncentraci 50 µg/ml.

Čtyři extrakty vykazovaly inhibiční aktivitu vyšší než 60 % (AL-723, AL-728, AL-739 a AL-745). U těchto extraktů byla stanovena hodnota IC₅₀. Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ AChE/BuChE referenčních látek – galanthaminem (0,74 ± 0,05 a 12,41 ± 0,98 µg/ml), eserinem (0,06 ± 0,00 a 0,08 ± 0,03 µg/ml) a Huperzinem A (0,01 ± 0,00 µg/ml).

10 Abstract

Charles Univerzity, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany

Author: Franciska Saaková

Supervisor: PharmDr. Daniela Hulcová Ph.D.

Title of thesis: Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. II

Key words: Narcissus, Daydream (AL-723), Gay Kybo (AL-725), High Society (AL728), Love Call (AL-734), Peach and Cream (AL-739), Sunny Girlfriend (AL-743) a Yellow Salome (AL-745), inhibition of the AChE and BuChE

For thousands of years, plants in the Amaryllidaceae family have been used as a source of medicinal remedies. Already in the fourth century B.C., Hippocrates of Cos used oil from the daffodil *Narcissus poeticus*, for the treatment of uterine tumors. In addition to the already mentioned antitumor activity, this family has a number of other important biological effects such as antimalarial, antifungal, antibacterial, antiviral, emetic, analgesic, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory effects [11]. This broad spectrum of properties makes them suitable candidates for the treatment of neurodegenerative diseases, cancer or malaria, whose incidence in the population is increasing. For this reason, it is very important to search for new potential drugs that could find application in the therapy of not only civilization diseases but also many others [32].

The purpose of this work was to screen the biological activity of alkaloid extracts obtained from seven cultivars of the genus *Narcissus* - Daydream (AL-723), Gay Kybo (AL-725), High Society (AL728), Love Call (AL-734), Peach and Cream (AL-739), Sunny Girlfriend (AL-743) and Yellow Salome (AL-745). Fresh bulbs were ground and extracted by ethanol (96%). Summary alkaloid extract was purified by liquid-liquid extraction. Samples of extracts from each cultivar were analyzed by GS-MS and screened for the ability to inhibit human cholinesterases at a concentration of 50 µg/ml.

Four extracts showed inhibitory activity greater than 60% (AL-723, AL-728, AL-739 and AL-745). An IC₅₀ value was determined for these extracts. The results were compared with the IC₅₀ values of the AChE/BuChE reference compounds, galanthamine (0.74 ± 0.05 and 12.41 ± 0.98 µg/ml), eserine (0.06 ± 0.00 and 0.08 ± 0.03 µg/ml) and Huperzine A (0.01 ± 0.00 µg/ml).

11 Zdroje

1. Jamshidi-Kia F., Lorigooini Z., Amini-Khoei H.: Medicinal plants: past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*. 1-7 (2018).
2. Wink M.: A short history of alkaloids. Springer Nature. 1-34 (1998)
3. Jahodář I.: *Farmakobotanika – Semenné rostliny*, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství karolinum 2011
4. <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>. staženo 10. listopadu 2021
5. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potencionální léčiva v terapii nádorových onemocnění. 701-708 (2013)
6. Nair J. J., Van Staden J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and chemical toxicology*. 262-275 (2013)
7. Hanks R. G.: *Narcissus and Daffodil. The genus Narcissus*. 1-452 (2002)
8. Diplomová práce. Tkáčová B.: *Alkaloidy kultivarů rodu Narcissus a ich biologická aktivita I.*, Univerzita karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. (2021)
9. <https://www.britannica.com/plant/narcissus-plant>. Staženo 12. listopadu 2021
10. <https://botany.cz/cs/narcissus-bulbocodium/>. Staženo 12. listopadu 2021
11. Berkov S., Martínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S.: Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 95-106 (2014)
12. Hulcová D., Maříková j., Korábečný J., Hošťálová A., Jun D., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's diseases. *Phytochemistry*. 1-9 (2019)
13. <https://daffseek.org/>. Staženo 20. listopadu 2021
14. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=251056&isprofile=0&>. Staženo 20. listopadu 2021
15. <https://www.whiteflowerfarm.com/narcissus-gay-kybo>. Staženo 25. listopadu 2021
16. [https://www.rhs.org.uk/plants/43067/narcissus-gay-kybo-\(4\)/details](https://www.rhs.org.uk/plants/43067/narcissus-gay-kybo-(4)/details). Staženo 25. listopadu 2021
17. https://www.crocus.co.uk/plants/_/narcissus-high-society/classid.2000025397/. Staženo 26. listopadu 2021
18. <https://www.tesselaar.net.au/>. Staženo 26. listopadu 2021
19. <https://www.plantsmap.com/plants/37701>. Staženo 28. listopadu 2021
20. <https://www.johnscheepers.com/flower-bulbs-index/narcissi/split-cup/narcissus-love-call.html>. Staženo 28. listopadu 2021

21. <https://www.gardenexpress.com.au/product/daffodil-love-call/>. Staženo 28. listopadu 2021
22. <https://hirts.com/love-call-butterfly-daffodil-5-bulbs-14-16-cm-bulbs/>. Staženo 28. listopadu 2021
23. <http://www.digthedirt.com/plants/13756-daffodils-and-narcissus-narcissus-peaches-and-cream>. Staženo 1. prosince 2021
24. http://plants.homesteadgardens.com/12170008/Plant/19968/Peaches_And_Cream_Daffodil/. Staženo 1. prosince 2021
25. <https://www.naturehills.com/sunny-girlfriend-daffodil>. Staženo 8. prosince 2021
26. <https://www.gardenersdream.co.uk/daffodil-sunny-girlfriend-p2965>. Staženo 8. prosince 2021
27. <https://www.dutchgrown.eu/products/daffodil-sunny-girlfriend>. Staženo 8. prosince 2021
28. <https://www.dutchbulbs.co.uk/plant-0013150-n-1/daffodil-yellow-salome-1214cm/>. Staženo 10. prosince 2021
29. Bastida J., Lavilla R., Viladomat F.: Chapter 3 Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The alkaloids: Chemistry and Biology*. 87-179 (2006)
30. Hotchandani T. Desgagne-Penix I.: Heterocyclic Amaryllidaceae Alkaloids: Biosynthesis and pharmacological applications. 418-427 (2017)
31. Spilková J. a kolektiv.: *Farmakognozie*, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 1, 1-346 (2016)
32. Ka S., Koirala m., Méridol N., Desgagné-Penix I.: Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids. *molecules*. 1-27 (2020)
33. Singh A., Desgagné-Penix I.: Biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*. 114-120 (2014)
34. Ding. Y., Qu D., Zhang K-M., Cang X-X., Kou Z-N., Xiao W., et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of Asian Natural Products*. 53-100 (2016)
35. Khalifa F. M., Attia Z. E., Fahim R. J., Kamel S. M.: An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of advanced biomedical and pharmaceutical sciences*. 41-49 (2018)
36. Elgirashi E. E., Stafford I. G., Van Staden J.: Acetylcholinesterase enzym inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta medica*. 3, 260-262 (2004)
37. Habartová K., Cahlíková L., Řezáčková M., Havelek R.: The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: From cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural product communications*. 1587-1594 (2016)

38. Nair J. J., Van Staden J.: The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South African journal of botany*. 157-174 (2021)
39. Nair J. J., Bastida J., Viladomat F., Van Staden J.: Cytotoxic agents of crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural product communications*. 1677-1688 (2012)
40. Fürst R.: Narciclasine an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta medica*. 1389-1394 (2016)
41. Kornienko A., Evidente A.: Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical reviews*. 1982-2014 (2008)
42. Nair J. J., Van Staden J.: Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *South African journal of botany*. 147-156 (2021)
43. Koutová D., Maafi N., Havelek R., Opletal L., Blunde G., et al.: Chemical and biological aspects of montanine-Type alkaloids isolated from plants of the Amaryllidaceae family. *Molecules*. 1-19 (2020)
44. Castilhos S. T., Giordani B. R., Henriques T. A., Menezes S. F., Zuanazzi S. A. J.: Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista brasileira de farmacognosia*. 17, 209-214 (2007)
45. Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., et al.: Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Profesor Einstein and Their cytotoxic activity. *Plants*. 1-12 (2020)
46. Koutová D., Havelek R., Peterová E., Muthná D., Královec K., et al.: Pancracine, a montanine-Type Amaryllidaceae alkaloid, inhibits proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells and induces apoptotic cell death in MOLT-4 leukemic cells. *Int. J. Molecular Sciences*. 1-18 (2021)
47. Jassen B., Schäfer B.: Galantamine. *Chemtexts*. 1-21 (2017)
48. Scott J. L., Goa L. K.: Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. 1095-1122 (2012)
49. Fennel C. W., Van Staden J., *Crinum* species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 15-26 (2001)
50. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Staženo 3. ledna 2022
51. Ka S., Masi M., Merindol N., Di Lecce R., Plourde B. M., et al.: Gigantelline, gigantellinine and gigancrinine, cherylline- and crinine-type alkaloids isolated from *Crinum jagus* with anti-acetylcholinesterase activity. *Phytochemistry*. 1-9 (2020)
52. <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0000485>. Staženo 5. ledna 2022

53. Chen M-x., Huo J-M., Hu J., Xu Z-P., Zhang X.: Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and antiinflammatory activities. *Fitoterapia*. 48-53 (2018)
54. <https://www.caymanchem.com/product/70340/sc-560>. Staženo 10. ledna 2022
55. Vecchio J. A., Malkowski G. M.: The structure of NS-398 bound to cyclooxygenase-2. *Journal of structural biology*. 176, 254-258 (2011)
56. N'Tamon D. A., Okpekon T. A., Bony F. N., Bernadat G., Gallard J-F., et al.: Streamlined targeting of Amaryllidaceae alkaloids from bulbs of *Crinum scillifolium* using spectrometric and taxonomically-informed scoring metabolite annotations. *Phytochemistry*. 1-8 (2020)
57. Šafratová M., Hošťálová A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., et al.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of pharmacel research*. 208-218 (2018)
58. Mamun A. A., Maříková J., Hulcová D., Janoušek J., Šafratová M., et al.: Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*. 1-17 (2020)
59. Cahlíková L., Vrabec R., Pidaný F., Peřinová R., Maafi N., et al.: Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules*. 1-28 (2021)
60. Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Hošťálová A., Jun D., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 1-9 (2019)
61. Emir A., Emir C., Bozkut B., Onur A. M., Bastida J., et al.: Alkaloids from *Galanthus fosteri*. *Phytochemistry letters*. 167-172 (2016)
62. Masi M., Van der Westhuyzen E. A., Tabanca N., Evidente M., Cimmino A., et al.: Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvotoxic and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 34-38 (2017)
63. Masi M., Cala A., Tabanca N., Cimmino A., Green R. I., et al.: Alkaloids with activity against the Zika Virus vector *Aedes aegypti* (L.)-crinsarnine and sarniensinol, two new krinine and mesembrine type alkaloids isolated from the South African plant *Nerine sarniensis*. *Molecules*. 1-11 (2016)
64. Cho N., Du Y., Valenciano L. A., Fernández-Murga L. M., Goetz M., et al.: Antiplasmodial alkaloids from bulbs of *Amaryllis belladonna* Steud. *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*. 40-42 (2018)

65. Zhan G., Liu J., Zhou J., Sun B., Aisa A. H., et al.: Amaryllidaceae alkaloids with new Framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 771-780 (2017)
66. Zhan G., Zhou J., Liu R., Liu T., Guo G., et al.: Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and their anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities. *Journal of natural products*. 79, 760-766 (2016)
67. Wang H-Y., Qu S-M., Wang Y., Wang H-T.: Cytotoxic and anti-inflammatory active plicamine alkaloids from *Zephyranthes grandiflora*. *Fitoterapia*. 163-168 (2018)
68. Zhan G., Zhou J., Liu J., Huang J., Zhang H., et al.: Acetylcholinesterase Inhibitory Alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes carinata*. *Journal of natural products*. 2462-2471 (2017)
69. Dizertační práce. Kohelová E.: Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. (2021)
70. Cahlíková L., Kawano I., Řezáčová M., Blunden G., Hulcová D., et al.: The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. 303-323 (2020)
71. Uher M., Hroch M., Peřinová R., Havelek R., Křoustová J., et al.: Semisynthetic derivatives of haemathamine and their in vitro antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. 1-13 (2022)