

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

***Alkaloidy Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae) a jejich biologická aktivita**

***Alkaloids from Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae) and their biological
activity**

Konzultant: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Mgr. Lada Krejčová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování rigorózní práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Děkuji prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za věnovaný čas, vstřícný přístup a odborné rady při zpracování této rigorózní práce. Mé poděkování patří též PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za odborné vedení při praktickém zpracování rigorózní práce. Dále děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změřením strukturních charakteristik izolovaných látek, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc., Ing. Ivu Doskočilovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabinové za stanovení biologických aktivit izolovaných látek a celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Velké dík patří také mým rodičům.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biosyntéza	9
3.1.1. Biosyntéza a strukturní rozdělení amarylkovitých alkaloidů	9
3.2. Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	14
3.2.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich deriváty jako potenciální léčiva v terapii Alzheimerovy choroby	14
3.2.1.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich deriváty jako inhibitory cholinesteras	16
3.2.1.2. Inhibice prolyl oligopeptidasy	26
3.2.2. Cytotoxická aktivita	27
3.2.3. Antimikrobiální aktivita	31
3.2.4. Antiprotozoální aktivita	32
3.3. Rostliny rodu <i>Nerine</i>	33
3.3.1. <i>Nerine bowdenii</i>	34
3.3.2. Další rostliny rodu <i>Nerine</i>	37
4.1. Materiál a vybavení použité při izolaci a identifikaci alkaloidů z <i>Nerine bowdenii</i>	41
4.1.1. Rozpouštědla	41
4.1.2. Chemikálie	41
4.1.3. Chromatografické adsorbenty	42
4.1.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	42
4.1.5. Detekční činidla	42
4.1.6. Pomocný materiál	42
4.1.7. Přístroje	43
4.2. Materiál a vybavení použité ke stanovení biologických aktivit	43
4.2.1. Chemikálie	43
4.2.2. Pufry	44
4.2.3. Přístroje	45
4.3. Všeobecné postupy	45
4.3.1. Destilace a odpařování	45
4.3.2. Sušení a skladování	45
4.3.3. Sloupcová chromatografie	45
4.3.4. Tenkovrstvá chromatografie	46
4.3.5. Detekce alkaloidů	46
4.4. Extrakce a izolace alkaloidů z <i>Nerine bowdenii</i>	46
4.4.1. Původ drogy	46
4.4.2. Zpracování alkaloidního extraktu	46
4.4.3. Zpracování frakce 9	47
4.4.4. Zpracování frakce 16	47
4.4.5. Zpracování frakce 41	48
4.4.5.1. Zpracování podfrakce 41C	48

4.5. Strukturní identifikace izolovaných látek	49
4.5.1. EI-MS analýza (hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací)	49
4.5.2. NMR analýza	49
4.5.3. Optická otáčivost	50
4.6. Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů	50
4.7. Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyl oligopeptidase	50
4.8. Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů	51
5. VÝSLEDKY	52
5.1. Strukturní studie undulatinu	52
5.2. Strukturní studie buphanidrinu	53
5.3. Strukturní studie 1- <i>O</i> -acetylbulbisinu	54
5.4. Inhibiční aktivita vůči HuAChE, HuBuChE, POP	55
5.5. Cytotoxická aktivita vůči dvěma buněčným liniím kolorektálního karcinomu tlustého střeva a buněčné linii normálních střevních buněk	55
6. DISKUZE A ZÁVĚR	57
7. LITERATURA	60
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69

1. ÚVOD

S celkovým rozvojem a pokrokem lidstva úzce souvisí i vývoj onemocnění, kterými se zabývá současná medicína a věda. Infekční choroby představovaly obrovskou hrozbu až do začátku 20. století, kdy se do popředí dostala onemocnění kardiovaskulární a onkologická. Předpokladem pro 21. století je, že tuto éru nejvíce postihnou nemoci neurodegenerativní, které úzce souvisí se stárnutím a blahobytem populace a v dřívějších dobách se vzhledem k nižšímu věku dožití nestačily projevit^{1,2}. Mezi závažná neurodegenerativní onemocnění patří mj. Alzheimerova choroba (AD), projevující se klinicky demencí, která degraduje člověka natolik, že se není schopen postarat sám o sebe a je odkázán na pomoc druhých³. Etiopatogeneze této choroby není do dnešního dne dostatečně objasněna, proto ji dosud nelze léčit kauzálně, ale pouze symptomaticky. Nejvýrazněji se v patofyziologii AD projevuje úbytek cholinergních neuronů, jelikož deficit acetylcholinu se podílí na hlavních symptomech AD (zhoršení až ztráta paměti, časová a prostorová dezorientace, poruchy úsudku a chování a další)⁴. Dostupnost acetylcholinu v neuronální štěrbině dokážou zvýšit inhibitory cholinesteras. Mezi ně řadíme látky přírodní i syntetické. Aktuálně představují nejvýznamnější a nejvyužívanější léčiva v terapii AD. V Evropě a v USA se prakticky používají pouze donepezil, rivastigmin a galanthamin⁵.

V souvislosti se schválením galanthaminu v roce 2001 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration; FDA) pro klinické využití ke zvládnutí mírné až středně závažné fáze AD se zvýšil zájem o obsahové látky rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich strukturně jedinečné sekundární metabolity, amaryllkovité alkaloidy, jako další potenciální inhibitory cholinesteras⁶. Celosvětově se oblasti výzkumu nových perspektivních inhibitorů cholinesteras věnuje několik desítek pracovních skupin, které se zabývají studiem jak látek syntetických, tak i přírodního původu. U nás se problematice přírodních látek začala v roce 2005 věnovat pracovní skupina ADINACO Research Group⁷ na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením prof. RNDr. Lubomíra Opletala, CSc. V současnosti tuto výzkumnou skupinu vede prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Rostliny čeledi Amaryllidaceae se vyznačují širokým spektrem biologických účinků. Mezi nejvíce sledované biologické aktivity patří schopnost inhibice činnosti enzymů cholinesteras^{8,9} a dále jejich cytotoxická aktivita indukci apoptózy^{10,11,12}. Do dnešního dne bylo zkoumáno velké množství alkaloidních extraktů různých rostlin čeledi Amaryllidaceae. Dle zjištěných výsledků se následně pozornost upíná na izolaci jednotlivých čistých látek,

nebo přípravu polosyntetických derivátů a jejich testování na různé biologické účinky². Tímto způsobem byly podrobeny bližšímu zkoumání také alkaloidní extrakty rostlin rodu *Nerine* a na základě získaných dat byl jako nejvhodnější vybrán druh *Nerine bowdenii* pro detailní fytochemickou studii^{13,14}.

Jelikož postupným výzkumem jsou zjišťovány nové podrobnější informace ohledně patogeneze chorob, včetně AD, nezůstává studium izolovaných alkaloidů pouze u aktivity lidských mozkových cholinesteras. Kromě testování inhibiční aktivity získaných alkaloidů vůči cholinesterasám (AChE, BuChE) se spektrum biologických testů rozšířilo také o studium jejich inhibičního potenciálu vůči dalším cílům, které se uplatňují v patogenezi AD. Mezi takové cíle patří například prolyl oligopeptidasa (POP)^{15,16}, glykogen syntasa kinasa-3 β ¹⁷ nebo β -sekretasa (BACE-1)².

Alkaloidy izolované v rámci této rigorózní práce byly dále ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze podrobeny screeningové studii jejich cytotoxicity na nádorové a zdravé buňky střevního epitelu. Vzhledem k tomu, že kolorektální karcinom je třetím nejčastěji diagnostikovaným typem nádoru a umírá na něj téměř každý druhý pacient¹⁸, zaslouží si tato problematika pozornost.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo:

1. zpracování literární rešerše na téma alkaloidy rodu *Nerine*, jejich izolace, struktura a biologická aktivita,
2. izolace alespoň dvou alkaloidů v čistém stavu z přidělené podfrakce,
3. strukturní identifikace izolovaných látek,
4. příprava látek pro screening jejich biologických aktivit, zpracování výsledků, jejich analýza, sepsání rigorózní práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biosyntéza

Čeď Amaryllidaceae (amarylkovitě) tvoří přibližně 1100 druhů rostlin klasifikovaných do zhruba 85 rodů¹⁹. Jedná se o víceleté, jednoděložné, cibulovité, krytosemenné rostliny. Rozšířeny jsou především v tropických, subtropických a obecně teplých oblastech světa, nejvíce v Jižní Americe, Středozeří a jižní Africe^{19,20}. Jejich zástupce však můžeme nalézt i v naší krajině, jako např. narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženky (*Galanthus*)²¹.

Po staletí se rostliny čeledi Amaryllidaceae pěstují pro jejich okrasné barevné květy. Stejně tak ale byly v mnoha oblastech široce využívány v lidovém léčitelství např. pro účinky protinádorové, antivirové, antibakteriální a protizánětlivé¹⁹.

Terapeutická hodnota rostlin čeledi Amaryllidaceae spočívá v obsahu strukturně unikátních sekundárních metabolitů typických pro tuto čeď, tzv. amarylkovitých alkaloidů. Prvně izolovaným takovým alkaloidem byl lykorin, a to už v roce 1877²². Od té doby bylo izolováno a strukturně popsáno přibližně 600 dalších amarylkovitých alkaloidů, jež se v rostlinách vyskytují napříč celou čeledí a chemicky se dělí do několika strukturních typů²¹.

3.1.1. Biosyntéza a strukturní rozdělení amarylkovitých alkaloidů

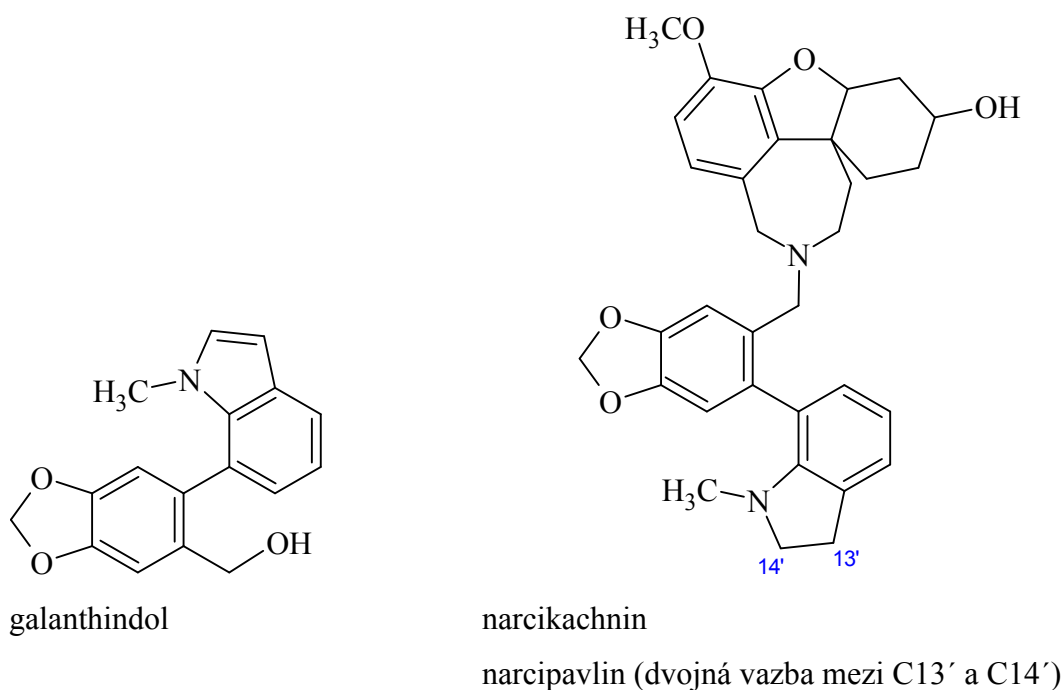
Ačkoli se alkaloidy čeledi Amaryllidaceae vyznačují značnou různorodostí strukturních typů, je jim společné, že jejich biosyntéza vychází z aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu²³. L-Fenylalanin se postupně přeměňuje na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a L-tyrosin na tyramin. Několikastupňovou kondenzací a redukcí těchto prekurzorů vzniká norbelladin a následnou methyloací 4'-*O*-methylnorbelladin²⁴. V souvislosti s tímto klíčovým meziproduktem se tato biosyntetická cesta nazývá norbelladinová²⁵.

4'-*O*-Methylnorbelladin jako společný prekurzor všech hlavních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů dále podléhá intramolekulárnímu oxidativnímu spojení. Podle způsobu tohoto spojení vzniká primárně typ krininový a haemanthaminový (spojení *para-para*'), lykorinový (*ortho-para*') a galanthaminový (*para-ortho*'). Většina dalších amarylkovitých alkaloidů pak biosynteticky vychází z předchozích čtyř skupin. Pankratistatinový a tazettinový typ je odvozen z haemanthaminového, homolykorinový pak

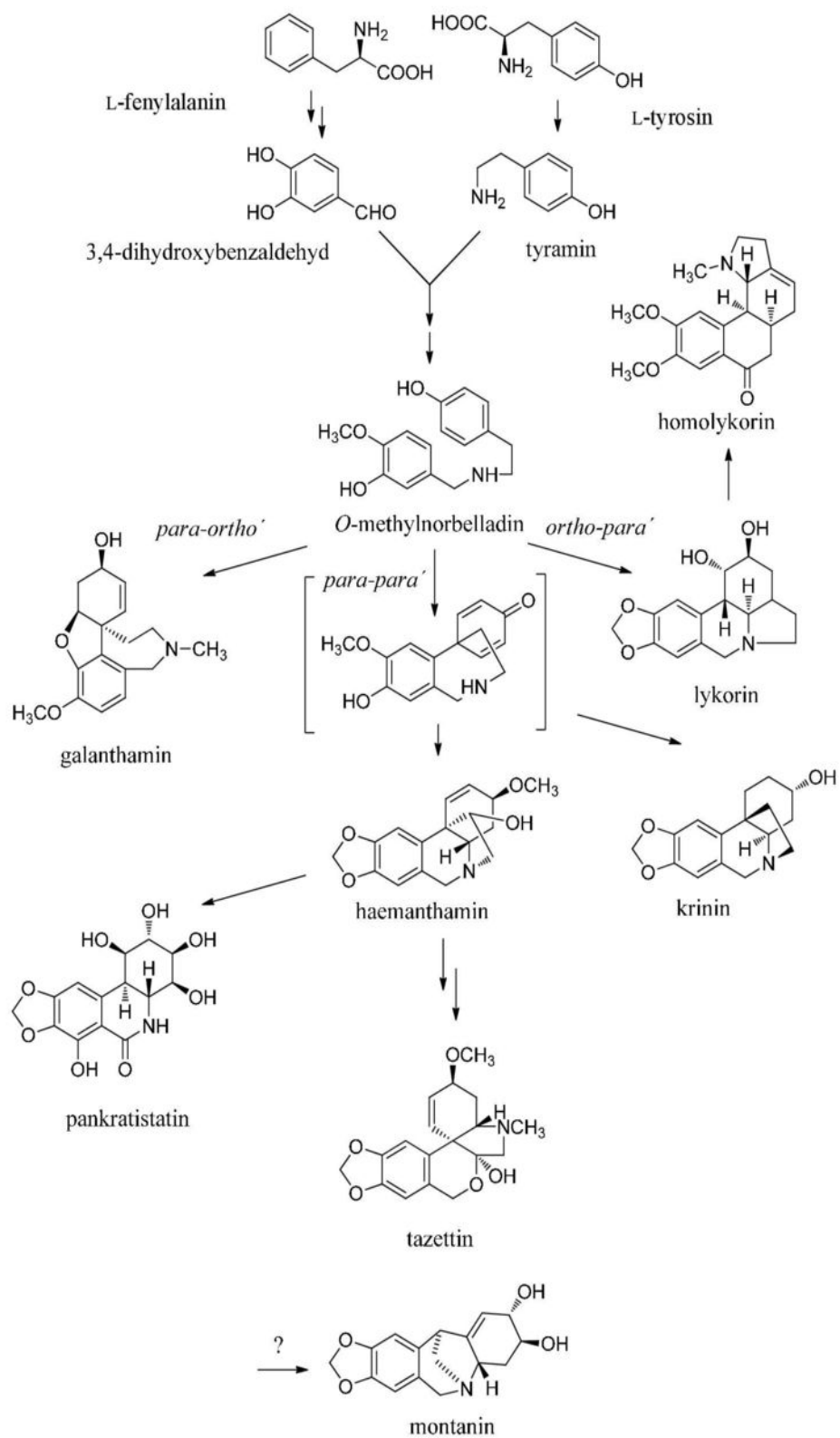
z lykorinového. Belladinový typ alkaloidů vzniká methylací norbelladinu²³. V literatuře se obvykle řadí mezi hlavních devět strukturálních typů amarylkovitých alkaloidů také typ montaninový, u něhož není biosyntetická cesta dosud zcela objasněna (Obr. 2)^{2,26}.

Kromě dosud uvedených strukturálních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae bylo do dnešního dne izolováno a identifikováno mnoho dalších těchto látek. Nachází se však často třeba jen v jediném rostlinném rodu či druhu, nebo jsou zastoupeny pouhou jednou strukturou. Jedná se například o galanthindolový typ (galanthindol) izolovaný z *Galanthus plicatus* spp. *byzantinus*, který obsahuje nekondenzovaný indolový kruh²⁷ (Obr. 1). Zajímavým strukturálním typem je narcikachninový typ, jehož zástupci narcipavlin a narcikachnin byly doposud identifikovány a izolovány pouze na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (Obr. 1). Tyto sloučeniny se navíc vyznačují zajímavým inhibičním potenciálem vůči AChE a BuChE²⁸.

Přehled hlavních strukturálních typů amarylkovitých alkaloidů je uveden v následující tabulce (Tab. 1).

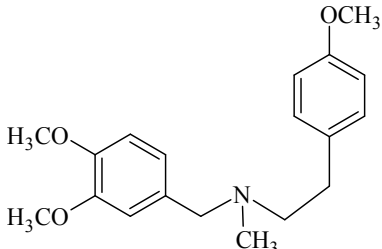
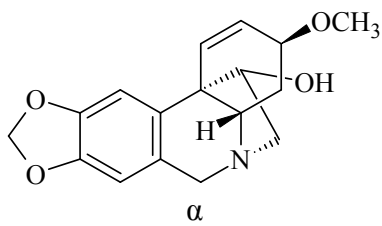
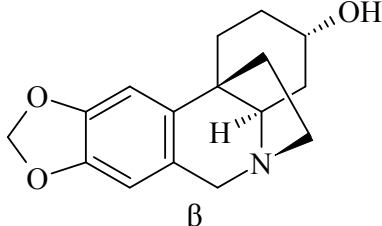
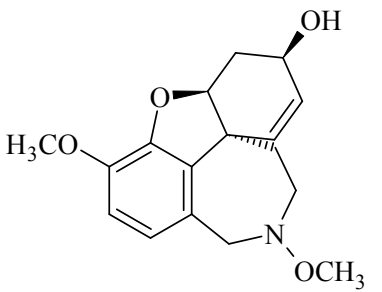
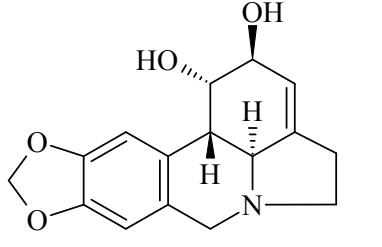
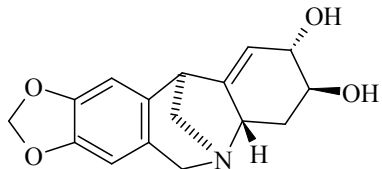


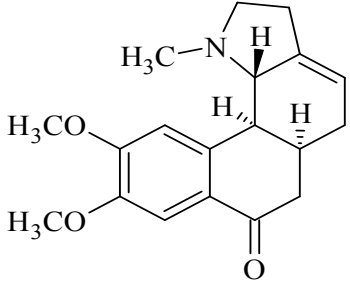
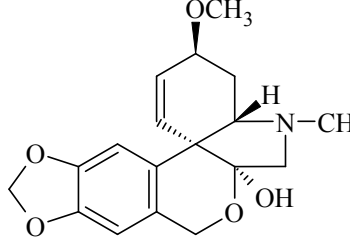
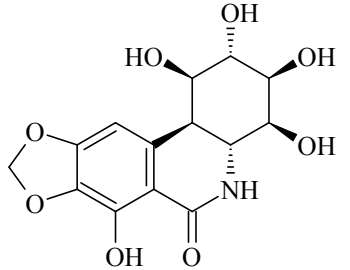
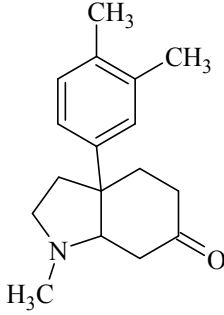
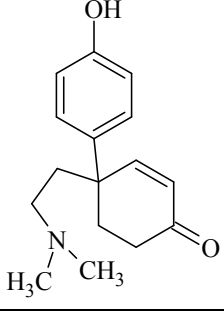
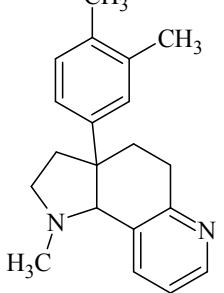
Obrázek 1. Struktury zástupců galanthindolového a narcikachninového strukturálního typu



Obrázek 2. Biosyntetická cesta hlavních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů (převzato z literatury)²⁶

Tabulka 1. Základní strukturální typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, jejich hlavní zástupci a příklady rodů, ze kterých byly izolovány (převzato a zkráceno z literatury)²

Strukturální typ	Hlavní zástupce	Rod	
belladinový		belladin	<i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Nerine</i>
krininový	 α	haemanthamin	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i>
	 β	krinin	<i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyrantes</i>
galanthaminový		galanthamin	<i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyrantes</i>
lykorinový		lykorin	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyrantes</i>
montaninový		montanin	<i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i> <i>Pancreatium</i> <i>Scadoxus</i>

homolykorinový		homolykorin	<i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i>
tazettinový		tazettin	<i>Clivia</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Zephyranthes</i>
pankratistatinový		pankratistatin	<i>Boophane</i> <i>Haemanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratium</i> <i>Zephyranthes</i>
		mesembrin	
mesembranový		joubertiamin	<i>Narcissus</i>
		skeletin A4	

3.2. Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Jak již bylo zmíněno, amaryllkovité alkaloidy se vyznačují širokým spektrem biologických aktivit, přičemž nejvýznamnější je jejich schopnost inhibovat činnost enzymu acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE)^{8,9,15,29}. Dalším velmi významným, a ve velké míře zkoumaným, účinkem alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je cytotoxické působení^{10,11,12,21}. Popsaná je také aktivita antibakteriální, antivirotická, antifungální, antimalarická, antiflogistická nebo antinociceptivní^{20,30}.

Vzhledem k tomu, že některé z těchto alkaloidů se vyskytují v rostlinách ve značném množství a jejich izolace je snadná, slouží jako výchozí látky pro přípravu jejich polosyntetických derivátů³¹.

3.2.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich deriváty jako potenciální léčiva v terapii Alzheimerovy choroby

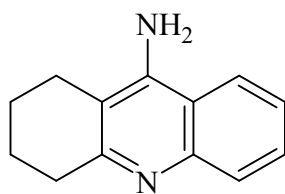
AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění diagnostikované ve většině případů u osob nad 65 let. Klinicky se jedná o nejčastější formu demence. Vzhledem k celosvětovému stárnutí populace je očekáván enormní nárůst nových případů onemocnění. Odhaduje se, že touto chorobou bude v roce 2050 postižen až jeden z 85 lidí³².

Hlavní patologické znaky pacientů s AD jsou tzv. senilní plaky a neurofibrilární klubka. Senilní plaky se nacházejí extracelulárně a vznikají shlukováním β -amyloidu. Ten se tvoří z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) proteolytickým štěpením především β - a γ -sekretasou³³. Neurofibrilární klubka (tangles) vznikají naopak intracelulárně v neuronech vlivem nadměrně fosforylovaného τ -proteinu. Na této hyperfosforylaci se podílí několik typů kinas a fosfatas, jako nejvýznamnější se jeví glykogen syntasa kinasa-3 β (GSK-3 β) a cyklin-dependentní kinasa-5 (CDK-5)^{3,34,35}. Vlivem senilních plaků a neurofibrilárních klubek dochází k neurodegeneraci, a tím atrofií mozku³. Nejvýrazněji se v patofyziologii AD projevuje úbytek cholinergních neuronů, jelikož deficit acetylcholinu se podílí na hlavních symptomech AD – kognitivních poruchách (tj. zhoršení paměti, schopnosti učení a úsudku), poklesu pozornosti a koncentrace, rychlosti zpracování informací a také na poruchách chování⁴. U nemocných s AD jsou zasaženy všechny oddíly cholinergního systému. Nejvíce je porušena presynaptická část acetylcholinergního neuronu zodpovědná za syntézu acetylcholinu z cholinu a acetylkoenzymu A enzymem cholinacetyltransferasou (CAT)³⁶. Acetylcholin uvolněný do synaptické štěrbině je rychle hydrolyzován AChE. Blokáda této katabolické reakce vede ke zvýšené dostupnosti

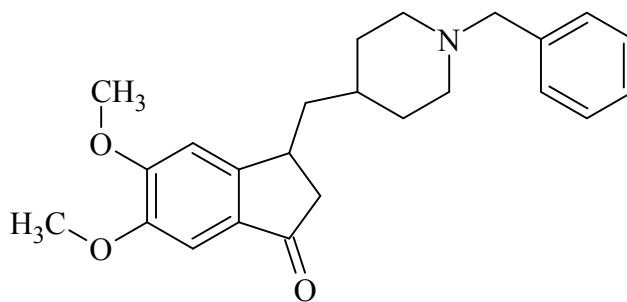
neurotransmiteru, a tím se může částečně kompenzovat cholinergní deficit u AD. V mozku se kromě AChE uplatňuje při cholinergní regulaci také BuChE, která je rovněž schopna hydrolyzovat acetylcholin, stejně jako další estery³⁷. Koncentrace a aktivita BuChE se v mozku přirozeně zvyšuje s věkem, ale významné zvýšení je právě u pacientů s AD, zatímco množství a aktivita AChE klesá. V pozdních fázích AD představuje BuChE predominantní cholinesterasu v mozku a z toho důvodu se jeví perspektivně pro další výzkum tohoto onemocnění^{38,39}.

Přesná patogeneze AD není v dnešní době stále dostatečně objasněna. Jak jsou ale postupně odkrývány nové poznatky o této chorobě, přibývají i nové farmakologické možnosti, jak ovlivnit jednotlivé cíle kaskády nemoci⁴⁰. Aktuálně se výzkumy soustředí na tři hlavní přístupy. První představuje ustálení hladin neurotransmiterů inhibicí cholinesteras a monoaminoxidas. Druhý zahrnuje neuroprotekcí, kdy oxidativní stres je zřejmě důležitým faktorem v rané fázi AD. Využití antioxidantů by tak mohlo potenciálně snížit vliv volných radikálů na nervové buňky. Třetí přístup se zabývá specifickými aspekty spojenými s AD, např. snahou o snížení tvorby či agregace β -amyloidu, nebo inhibicí γ - a β -sekretas^{41,42} apod.

Nejdůležitějšími a nejúčinnějšími léčivými v terapii AD jsou v současné době centrální inhibitory cholinesteras, které se využívají v léčbě mírné až středně pokročilé fáze nemoci³⁶. Prvním takovým léčivem uvedeným do klinické praxe byl takrin (Obr. 3). Jeho závažné gastrointestinální (GIT) vedlejší účinky a hepatotoxicita jej ale vyřadily z běžného užívání⁴³. V České republice i většině zemí Evropy a USA se momentálně využívají tři účinné látky jako inhibitory cholinesteras – donepezil, rivastigmin a galanthamin (Obr. 3), které se oproti takrinu vyznačují mnohem mírnějšími vedlejšími účinky v oblasti GIT a výrazně nepoškozují játra⁵. Tato léčiva ovšem cílí pouze na kognitivní ztráty a nedokážou modifikovat progresi onemocnění. V některých případech působí tyto látky pouze omezený čas a u některých pacientů bohužel neúčinkují vůbec^{44,45}.



takrin



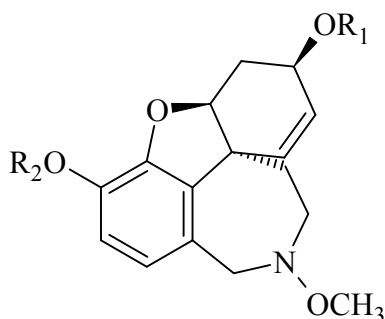
donepezil

a methoxyskupina. Změny na těchto důležitých místech mohou modulovat účinek molekuly ve smyslu snížení či zvýšení účinnosti, případně přechod účinku na jiný⁵¹.

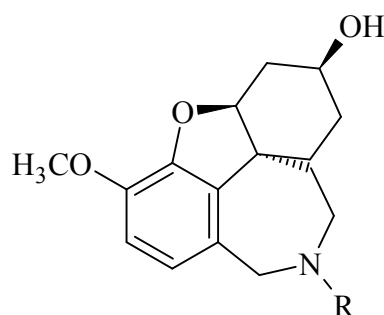
Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny lze získat deriváty s mnohem vyšší inhibiční aktivitou. Ovšem polarita těchto molekul znesnadňuje průnik přes hematoencefalickou bariéru (HEB), tudíž jejich potenciální využití v terapii neurodegenerativních poruch je značně limitováno. Záměna methoxyskupiny hydroxyskupinou je patrná u sanguininu, přírodního 9-hydroxyderivátu galanthaminu. Tato drobná obměna ve struktuře galanthaminu má ovšem za následek desetinasobné zvýšení inhibiční aktivity oproti předloze⁴⁶. Pětkrát vyšší schopnost inhibovat AChE oproti galanthaminu mají některé *N*-allylové deriváty galanthaminu, např. *N*-allylnorgalanthamin či *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin⁵². Tyto dvě molekuly vykazují vzhledem k methoxyskupině na C-9 a *N*-allylu vyšší lipofilitu oproti sanguininu i galanthaminu⁵³, ovšem izolace přírodních *N*-alkyl derivátů alkaloidů galanthaminového typu je velmi vzácná vzhledem k extrémně nízké koncentraci v rostlinném materiálu oproti galanthaminu, což brání jejich širšímu využití⁵².

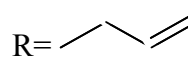
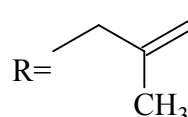
Výrazné snížení inhibiční aktivity způsobuje odstranění methylové skupiny na dusíku (epinorgalanthamin), úplnou ztrátu aktivity vyvolává hydrogenace dvojné vazby v cyklohexenovém kruhu (lykoramin, epinorlykoramin)⁴⁶.

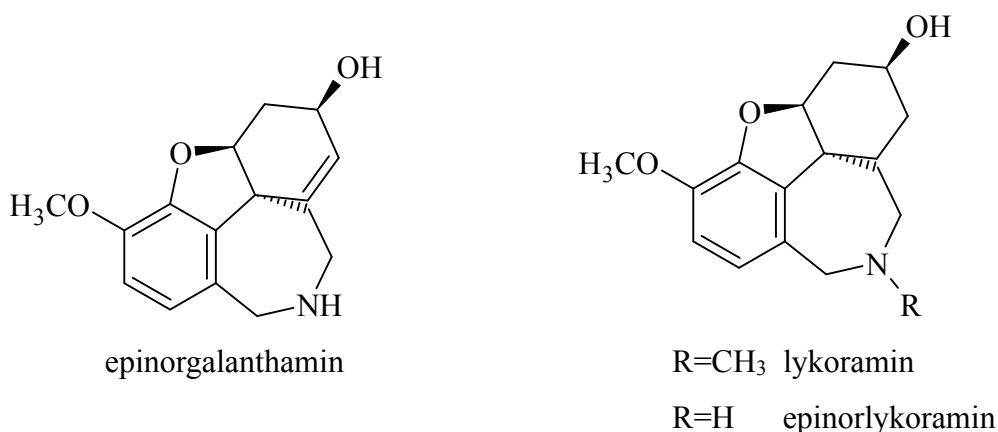
Podle molekulové struktury se perspektivně jevil chlidanthin, polohový izomer galanthaminu, u něhož jsou vzájemně zaměněny pozice hydroxy- a methoxyskupiny. Studie ovšem prokázaly, že inhibiční efekt vůči AChE je oproti galanthaminu podstatně nižší^{15,54}. Toto může být zapříčiněno stereochemií chlidanthinu, kdy nedojde k vytvoření intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxyskupinou na C-3 a atomem kyslíku dihydrofuranového kruhu tak, jak k tomu dochází právě u galanthaminu⁵⁴.



R₁=H, R₂=CH₃ galanthamin
 R₁=H, R₂=H sanguinin
 R₁=CH₃, R₂=H chlidanthin



R=  *N*-allylnorgalanthamin
 R=  *N*-(14-methyl)norgalanthamin



Obrázek 4. Přehled alkaloidů galanthaminového strukturního typu jako inhibitorů cholinesteras

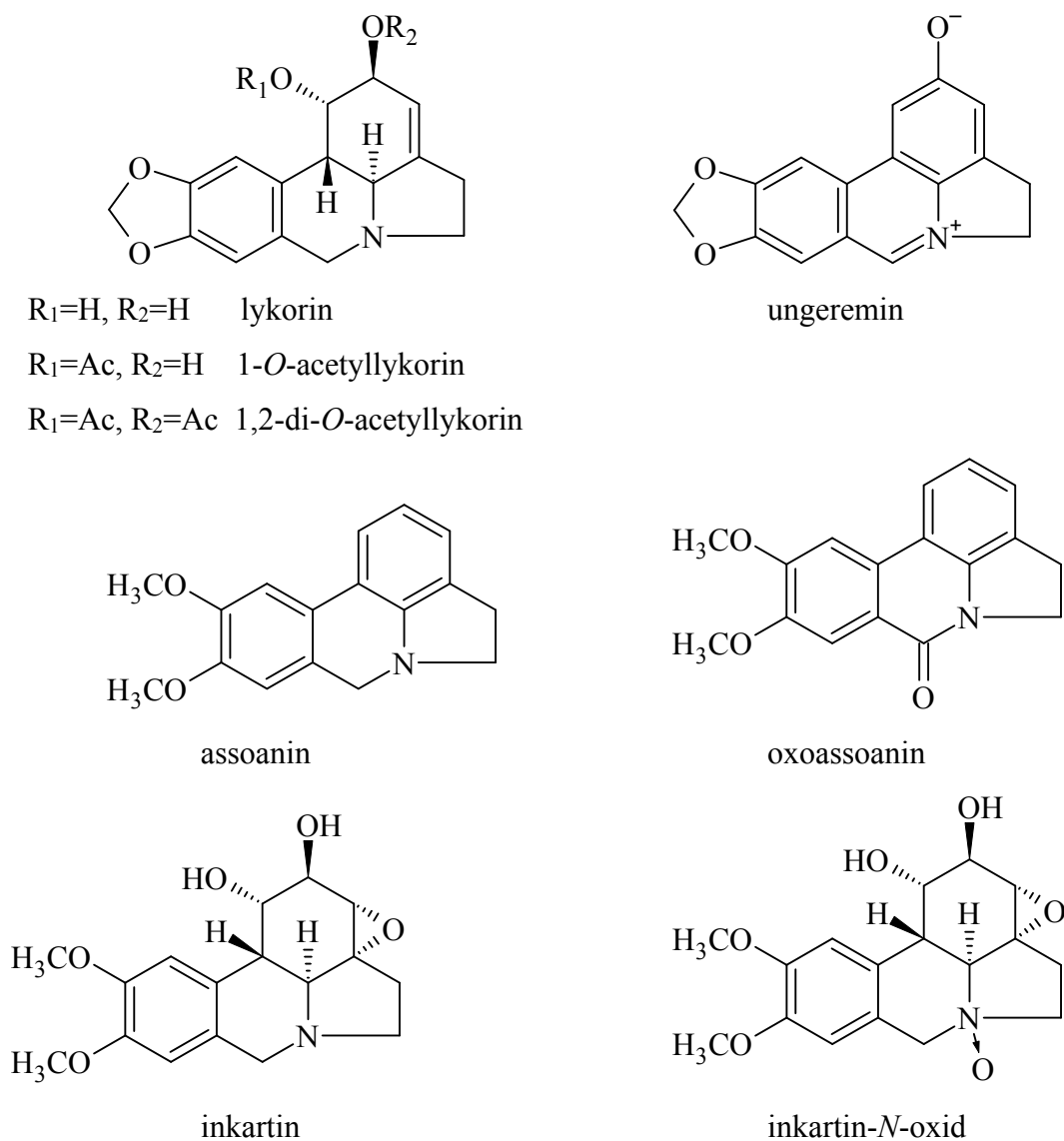
Lykorinový strukturní typ (Obr. 5)

Lykorin sám o sobě nevykazuje žádnou, resp. velmi slabou aktivitu vůči AChE. Testováním alkaloidů tohoto strukturního typu a jejich derivátů bylo zjištěno, že podstatná pro inhibiční aktivitu je substituce na C-1 a C-2. Lykorin má na těchto místech molekuly hydroxyskupiny. Derivatizace polohy C-1 a C-2 určuje stereochemii dané molekuly a s tím souvisí i vazba na AChE^{46,55}.

1-*O*-Acetyllykorin je dle studií z roku 2004⁵⁵ a 2011⁵⁶ inhibičně dvakrát aktivnější než galanthamin ($IC_{50} = 0,96 \pm 0,04 \mu M$ shodně dle obou prací). Stejná látka ovšem ve studii z roku 2016¹⁴ působila vůči lidské AChE (HuAChE) neaktivně ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Vzhledem k rozdílným výsledkům opakovali Vaněčková et al. stejný test s komerčně dostupnou AChE z elektrického úhoře, kdy byla naměřena mírná inhibiční aktivita ($IC_{50} = 28,4 \pm 0,35 \mu M$). Z těchto studií lze usoudit, že v některých případech je zdroj AChE zásadní pro stanovení inhibiční aktivity testovaných látek¹⁴.

Acetylace lykorinu v poloze C-2, stejně jako dvojnásobná acetylace v polohách C-1 a C-2, výrazně snižuje aktivitu enzymu. Z toho vyplývá, že klíčová pro inhibici AChE látkami lykorinového typu je přítomnost acetyl skupiny na C-1^{46,55}. Tuto hypotézu potvrdila i příprava řady polosyntetických derivátů lykorinu^{46,57}.

U přírodních alkaloidů lykorinového typu assoaninu a oxoassoaninu je aktivita vůči AChE přisuzována planaritě aromatického kruhu C⁵⁵. Stejně je tomu i u ungereminu, v jehož molekule se nachází kvartérní dusík. Ten pravděpodobně zvyšuje inhibiční aktivitu podobně jako třeba u isochinolinového alkaloidu berberinu⁵⁸. Inkartin a inkartin-*N*-oxid vykazují rovněž jistou aktivitu vůči AChE, v jejich molekule se rovněž nachází aromatický kruh C, methoxyskupiny a navíc i epoxidový můstek⁵⁹.



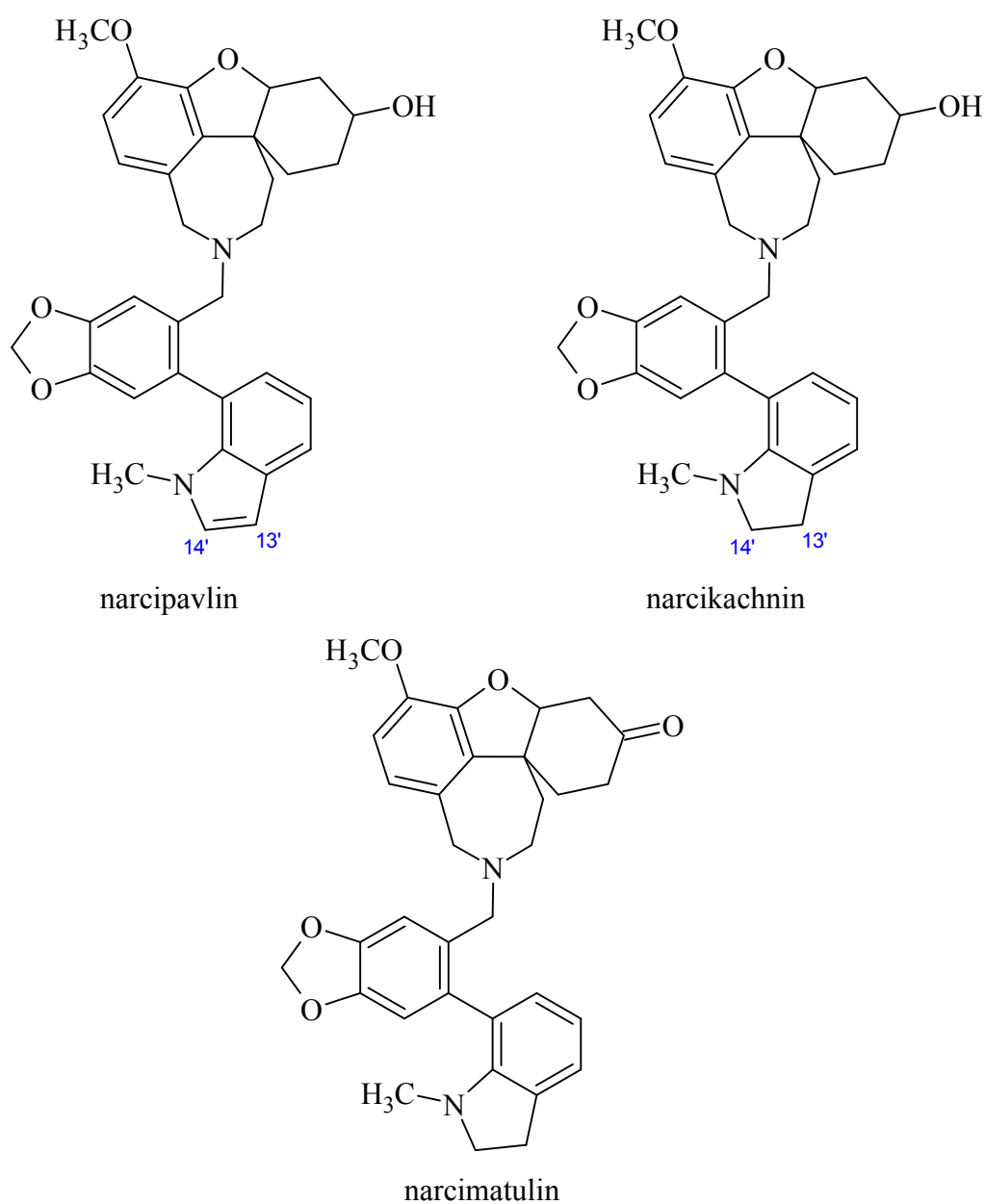
Obrázek 5. Přehled alkaloidů lykorinového strukturního typu jako inhibitorů cholinesteras

Narcikachninový strukturní typ (Obr. 6)

Tento strukturní typ amarylkovitých alkaloidů byl prvně popsán ve studii z roku 2017²⁸. Heterodimerní alkaloidy narcipavlin a narcikachnin izolované z čerstvých cibulí *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol kombinují ve své molekule dva základní strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, a to galanthaminový a galanthindolový. Molekula narcipavlinu se liší od narcikachninu pouze přítomností dvojně vazby mezi C-13' a C-14'. Narcipavlin vykázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidské BuChE (HuBuChE) (Tab. 2). Narcikachnin otestován nebyl, jelikož nebyl z rostlinného materiálu izolován v dostatečném množství pro stanovení biologických aktivit.

V roce 2019 byla uveřejněna práce¹⁶, která popisuje identifikaci dalšího alkaloidu narcikachninového strukturního typu, narcimatulinu, izolovaného z cibulí *Narcissus*

pseudonarcissus cv. Dutch Master. Tento alkaloid mj. projevil zajímavou inhibiční aktivitu vůči HuBuChE (Tab. 2).

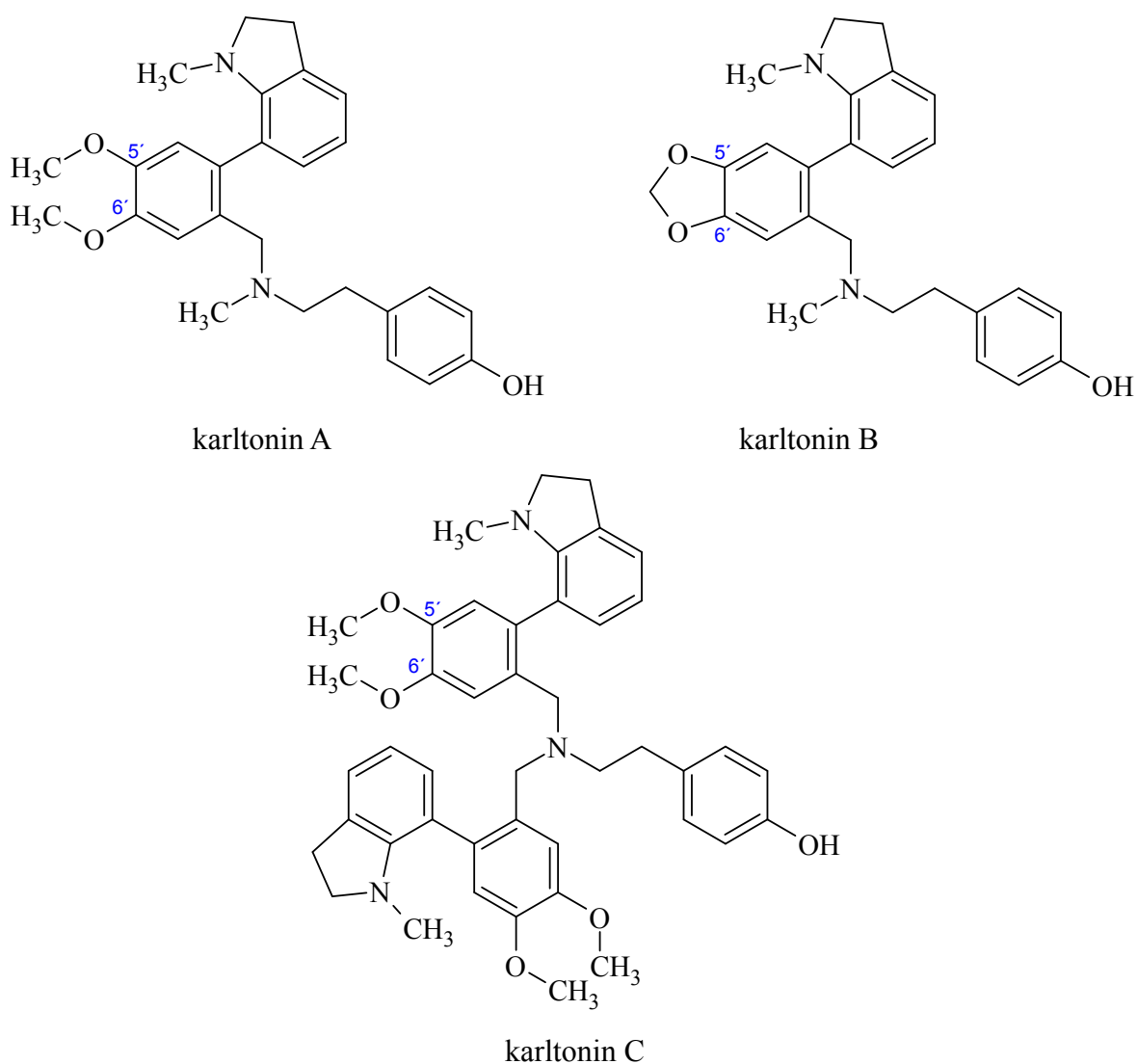


Obrázek 6. Struktury alkaloidů narcikachninového strukturního typu jako inhibitory cholinesteras

Belladinový strukturní typ (Obr. 7)

V letošním roce (2020) byla uveřejněna studie, která se zabývala izolací tří nově identifikovaných alkaloidů belladinového strukturního typu z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton⁹. Alkaloidy byly pojmenovány karltonin A-C a všechny vykazaly zajímavou selektivní inhibiční aktivitu vůči HuBuChE. Karltonin A a B dokonce

v nanomolárních množstvích (Tab. 2). Struktury karltoninu A a B se vzájemně liší pouze v poloze C-5' a C-6', kdy přítomnost 1,3-dioxolanu u karltoninu B vede k třicetinásobnému poklesu aktivity BuChE oproti dimethoxybenzenovému analogu karltoninu A. „Otevřeným“ analogem je také karltonin C, který obsahuje velký substituent vázaný na centrálním terciárním dusíku. Slibné *in vitro* výsledky inhibiční aktivity těchto alkaloidů vůči HuBuChE byly podpořeny dockingovou studií. Látky budou dále využity k přípravě a testování polosyntetických derivátů.

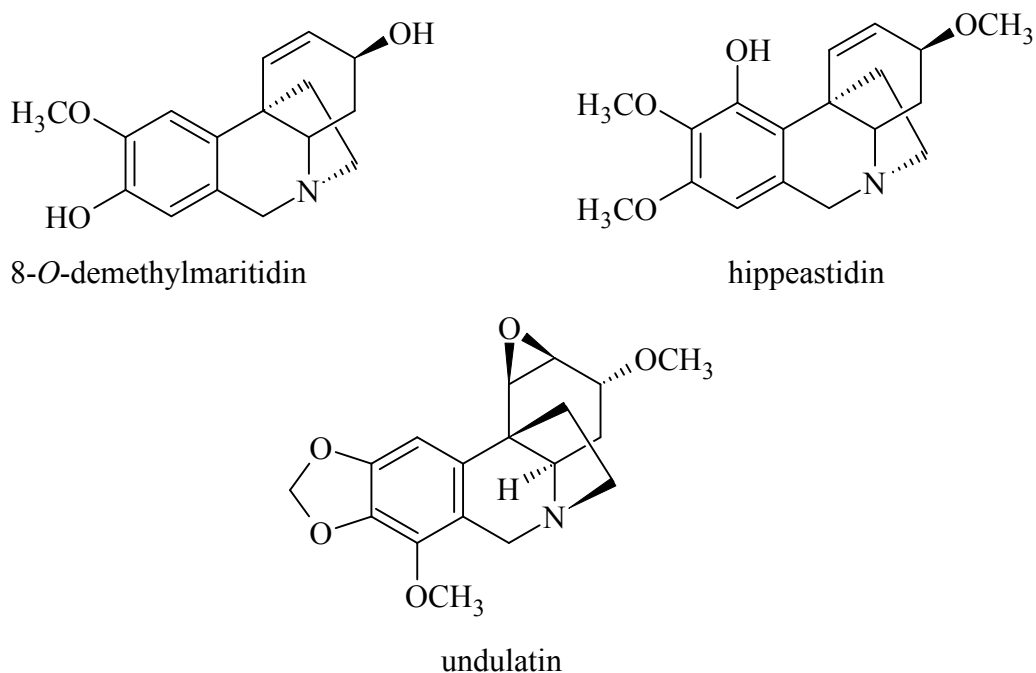


Obrázek 7. Struktury nových alkaloidů belladinového strukturního typu karltoninu A-C jako inhibitory cholinesteras

Ostatní strukturní typy (Obr. 8)

Podle dostupných literárních zdrojů nevykazují ostatní strukturní typy amarylkovitých alkaloidů významnou anticholinesterasovou aktivitu. Alkaloidy krininového

typu jsou považovány pouze za slabé inhibitory AChE. Podle stereochemie 5,10b-ethanového můstku se tyto alkaloidy dále dělí na α - a β -krininový typ, resp. krininový a haemanthaminový. Na účinnost toto prostorové uspořádání ovšem vliv nemá⁵⁵. Navzdory publikovaným informacím se podařilo výzkumné skupině ADINACO izolovat alkaloidy tohoto typu s dosud nepublikovanou zajímavou inhibiční aktivitou vůči AChE. Konkrétně se jedná o 8-*O*-demethylmaritidin a hippeastidin izolované z cibulí *Zephyrantes robusta*⁶⁰ a undulatin z cibulí *Chlidanthus fragrans*¹⁵ (Tab. 2). Ačkoli 8-*O*-demethylmaritidin i undulatin vykazaly přibližně desetkrát nižší inhibiční aktivitu než galanthamin, přineslo toto zjištění zajímavý fakt, že i tato strukturní skupina alkaloidů je schopna určité inhibice AChE¹⁵.



Obrázek 8. Struktura amarylkovitých alkaloidů 8-*O*-demethylmaritidinu, hippeastidinu a undulatinu

Tabulka 2. Inhibiční aktivity vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae vůči AChE a BuChE

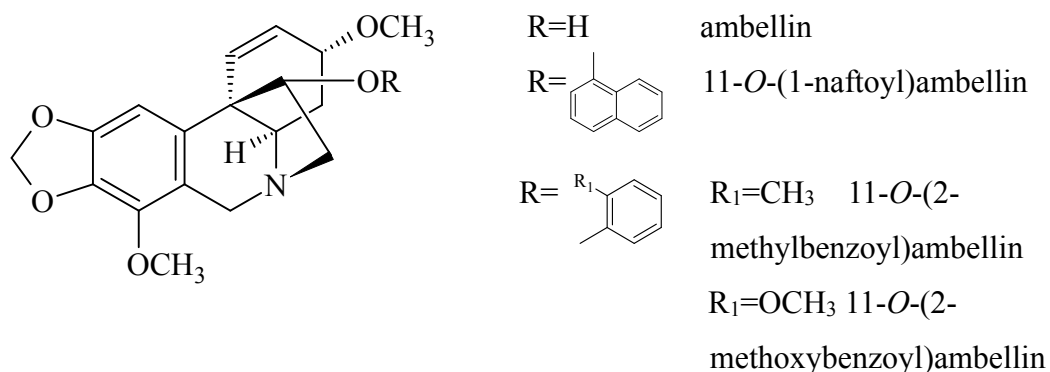
Látka	IC ₅₀ AChE (μ M)	IC ₅₀ BuChE (μ M)	Cit.
Galanthamin	1,07 \pm 0,18	43,3 \pm 1,3	46, 60
Sanguinin	0,10 \pm 0,01	-	46
<i>N</i> -Allylnorgalanthamin	0,18	-	52
<i>N</i> -(14-Methylallyl)norgalanthamin	0,16	-	52
Lykoramin	> 500	> 500	46, 60
Epinorlykoramin	> 500	-	46

Chlidanthin	147 ± 6	422 ± 15	15
Lykorin	> 500	> 1000	46, 60
1- <i>O</i> -Acetyllykorin	0,96 ± 0,04	-	55, 56
2- <i>O</i> -Acetyllykorin	> 500	-	55
1,2-Diacetyllykorin	211 ± 10	-	55
Assoanin	3,87 ± 0,24	-	46
Oxoassoanin	47,21 ± 1,13	-	46
Ungeremin	0,35	-	58
Narcipavlin	24,4 ± 1,2	-	28
Narcimatulin	489 ± 60	5,9 ± 0,2	16
Karltonin A	> 100	0,91 ± 0,02	9
Karltonin B	> 100	0,031 ± 0,001	9
Karltonin C	> 100	14,8 ± 1,1	9
8- <i>O</i> -Demethylmaritidin	28,0 ± 0,9	> 1000	60
Hippeastidin	99,7 ± 4,1	900 ± 35,0	60
Undulatin	23,0 ± 1,0	> 1000	15

Jak již bylo uvedeno výše, BuChE představuje důležitou roli v pozdních fázích AD a v současnosti představuje jeden z možných cílů, jak ovlivnit průběh nemoci. Zájem o selektivní inhibitory BuChE je v dnešní době o to větší, když bylo zjištěno, že tyto inhibitory zlepšují nejen kognitivní funkce, ale zároveň snižují množství APP, který je zdrojem pro vznik β -amyloidu, resp. senilních plaků⁶¹.

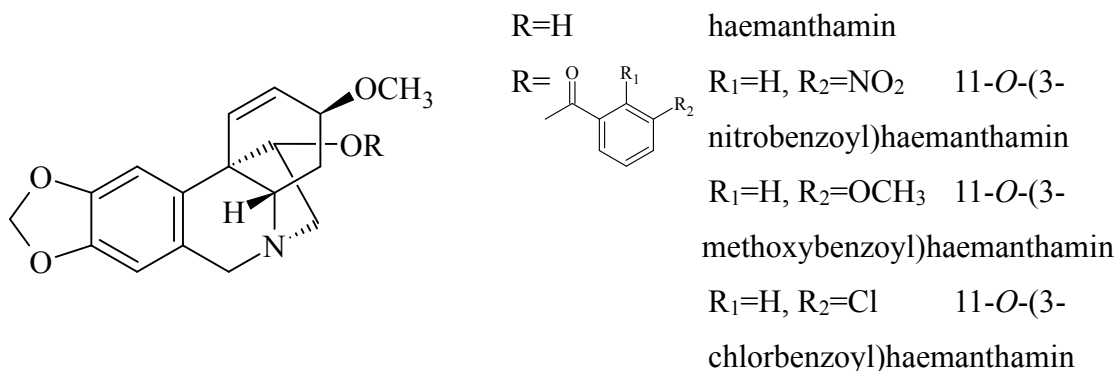
V rámci hledání nových látek potenciálně využitelných v terapii AD se ve spolupráci s dalšími výzkumnými týmy věnuje skupina ADINACO také přípravě a testování polosyntetických derivátů čeledi Amaryllidaceae. V letošním roce (2020) byly publikovány práce, které se zabývají přípravou derivátů alkaloidu krininového typu ambellinu⁶² a alkaloidů haemanthaminového typu haemanthaminu⁶³ a vittatinu⁶⁴. Tyto látky samy o sobě vykazují pouze slabou inhibiční cholinesterasovou aktivitu. Ovšem některé jejich aromaticky esterifikované deriváty na volné C-11 hydroxy- skupině u ambellinu a haemanthaminu, resp. C-3 hydroxy- skupině u vittatinu působí velmi perspektivně.

Konkrétně z derivátů ambellinu 11-*O*-(1-naftoyl)ambellin, 11-*O*-(2-methylbenzoyl)ambellin a 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)ambellin (Obr. 9) vyvolaly silnou selektivní inhibici HuBuChE (Tab. 3). Tato studie naznačuje, že vysoká inhibiční aktivita je spojena s *ortho* substitucí vedlejšího aromatického cyklu, a to především methylem⁶².



Obrázek 9. Struktura ambellinu a jeho derivátů s anticholinesterasovou aktivitou

V případě derivátů haemanthaminu působil vůči HuAChE nejvíce 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthamin, vůči HuBuChE 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)haemanthamin a duálně neselektivně 11-*O*-(2-chlorbenzoyl)haemanthamin (Obr. 10, Tab. 3). Výraznější HuAChE inhibiční aktivita byla spojena s přítomností nitro- skupiny na benzoylu. Přítomnost methoxy- skupiny na benzoylu se pak zdá být zásadní pro HuBuChE inhibiči⁶³.



Obrázek 10. Struktura haemanthaminu a jeho derivátů s anticholinesterasovou aktivitou

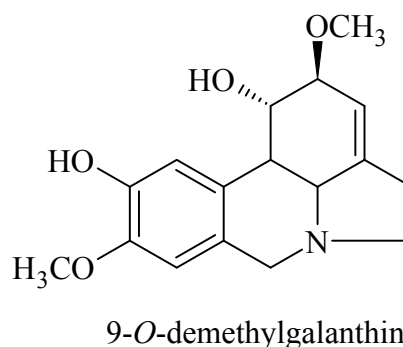
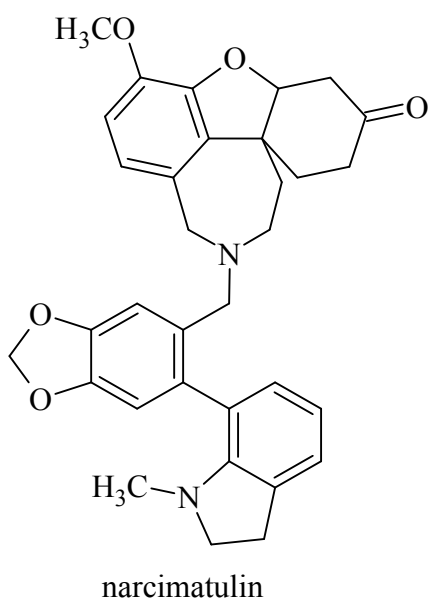
Ze zkoumaných derivátů vittatinu mírně inhibovaly HuAChE pouze 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatin a 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatin. Naopak silná inhibiční aktivita vůči HuBuChE byla naměřena u zmíněného 3-*O*-(2-nitrobenzoyl)vittatinu a dále u 3-*O*-(2-chlorbenzoyl)vittatinu a 3-*O*-(2-methylbenzoyl)vittatinu (Obr. 11, Tab. 3). Obdobně jako u derivátů ambellinu je i v tomto případě nejsilnější inhibiční účinnost vůči HuBuChE vázána na *ortho* substituci benzoylu, a to zejména nitro- skupinou⁶⁴.

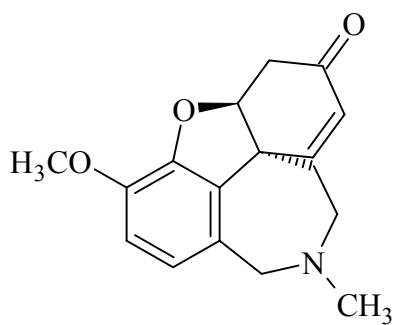
3.2.1.2. Inhibice prolyl oligopeptidasy

Prolyl oligopeptidasa (POP) je cytosolická serinová peptidasa vysoce exprimovaná v neuronech mozku. Je odpovědná za štěpení malých peptidů obsahujících aminokyselinu prolin. Hydrolýza probíhá na karboxy- konci prolinových zbytků. Substrátem tohoto enzymu je například substance P, vazopresin či thyreotropní hormon a některé další neuropeptidy. Právě ty jsou známy svou funkcí modulátorů kognitivních funkcí a jejich degradace působením POP může urychlovat proces stárnutí a hrát tak případně roli mj. v rozvoji neurodegenerativních onemocnění⁶⁵.

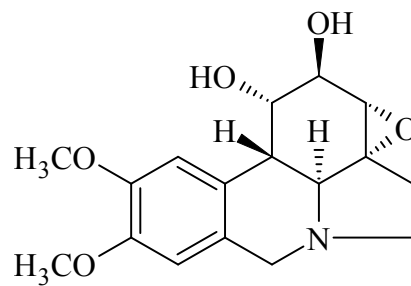
V posledních letech se zvýšil zájem o vliv inhibice POP jako potenciální cíl při terapii schizofrenie, bipolární poruchy či kognitivních poruch, které se vyskytují u pacientů s AD. Inhibitory POP by se tak mohly v budoucích letech využívat jako podpůrná léčiva v terapii AD⁶⁶.

Ve spolupráci s Centrem pokročilých studií Fakulty vojenského lékařství v Hradci Králové Univerzity obrany v Brně a dalšími univerzitními katedrami se pracovní skupina ADINACO v posledních letech věnuje vedle testování AChE a BuChE aktivity rovněž testování POP inhibiční aktivity. Dosud nejzajímavější výsledek v čeledi Amaryllidaceae v tomto směru zaznamenal narcikachninový alkaloid narcimatulin izolovaný z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master¹⁶. Velmi perspektivního výsledku dosáhl již dříve lykorinový alkaloid 9-*O*-demethylgalanthin izolovaný ze *Zephyranthes robusta*⁶⁷, který působil proti POP čtyřikrát silněji než použitý standard bajkalin. Dále pak z rodu *Narcissus* byly izolovány další alkaloidy se zajímavou POP inhibiční aktivitou, a to narwedín a inkartin⁶⁸ (Obr. 12, Tab. 4).





narwedin



inkartin

Obrázek 12. Struktury amarylkovitých alkaloidů s významnou inhibiční POP aktivitou

Tabulka 4. Významná POP inhibiční aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloid	IC ₅₀ (mM)
Narcimatulin	0,029 ± 0,001
9- <i>O</i> -Demethylgalanthin	0,150 ± 0,020
Narwedin	0,950 ± 0,120
Incartin	0,910 ± 0,090
Bajkalin ^a	0,610 ± 0,021
Berberin ^a	0,142 ± 0,021

^a Referenční látka

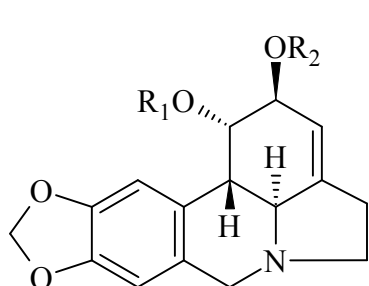
3.2.2. Cytotoxická aktivita

Významnou a intenzivně studovanou biologickou aktivitou amarylkovitých alkaloidů je také jejich cytotoxická aktivita. Onkologická onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých zemích. Ačkoli se během posledních dekád podařilo objasnit mnohé mechanismy podílející se na rakovinném bujení a výrazně se pokročilo v jeho terapii, pacienti stále celosvětově umírají na toto onemocnění v důsledku rezistence rakovinných buněk k léčbě⁶⁹. Obrovskou výhodou je, pokud molekula potenciálního léčiva je schopna působit protinádorově indukci apoptózy a cílit selektivně vůči nádorovým buňkám než proti zdravým a klidovým buňkám²¹.

Při pátrání po přírodních zdrojích potenciálně využitelných v terapii nádorových onemocnění rostliny čeledi Amaryllidaceae projevily slibné a nadějně výsledky⁷⁰. Ačkoli jsou protinádorové účinky detekovatelné u celé řady amarylkovitých alkaloidů, nejlepší výsledky zatím vykazují alkaloidy řazené do strukturního typu lykorinového, haemanthaminového a pankratistatinového⁷¹.

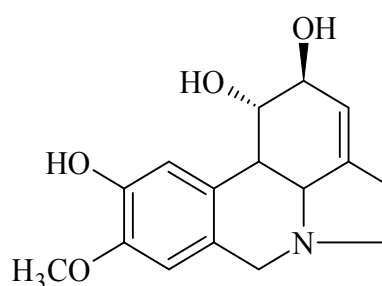
Lykorin (Obr. 13) je považován za nejúčinnější amarylkovitý alkaloid

s protinádorovou aktivitou již v mikromolárních koncentracích, ačkoli u něj převažuje spíše efekt cytostatický než cytotoxický. Výraznou cytotoxickou aktivitu prokázal na mnoha různých typech nádorových buněčných liniích, např. Rauscher, HeLa, P-388, U-373, HepG2, 3T3, KB, Molt-4, HT-1080, COL-2 či ZR-75⁷². Pro účinnost dalších molekul tohoto strukturního typu alkaloidů na nádorové linie je důležité zachovat základní strukturu lykorinu, a to především konformační volnost kruhu C, stereochemii kruhů C/D a diolové skupiny na kruhu C⁷³. Do skupiny alkaloidů lykorinového typu, u nichž byla zjištěna protinádorová aktivita, se řadí např. karanin, pseudolykorin, 1-*O*-acetyllykorin, amarbellisin, galanthin či ungeremin²¹ (Obr. 13).

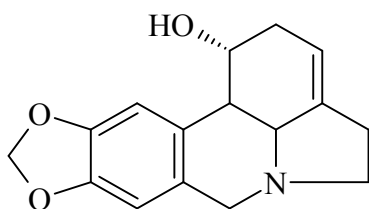


R₁=H, R₂=H lykorin

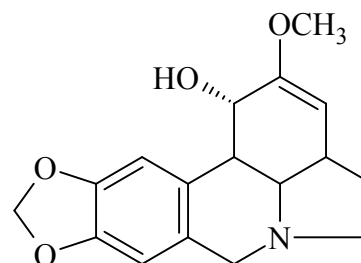
R₁=Ac, R₂=H 1-*O*-acetyllykorin



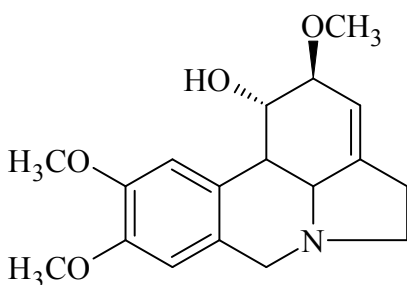
pseudolykorin



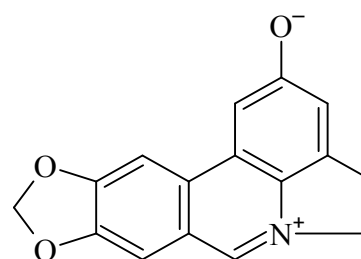
karanin



amarbellisin



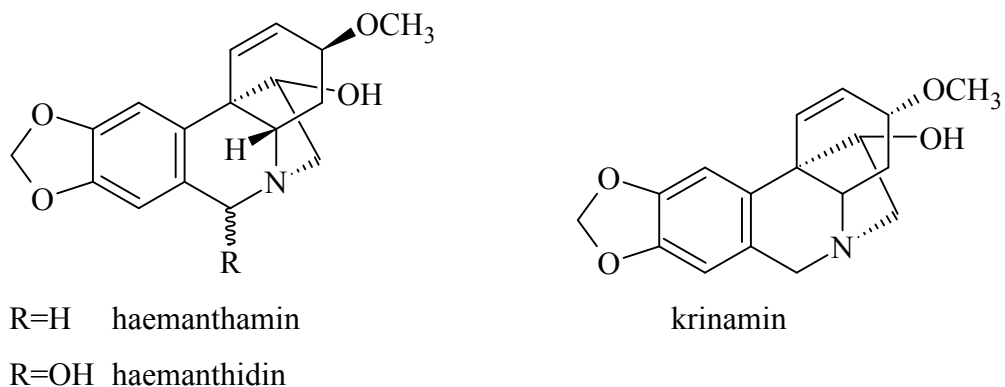
galanthin



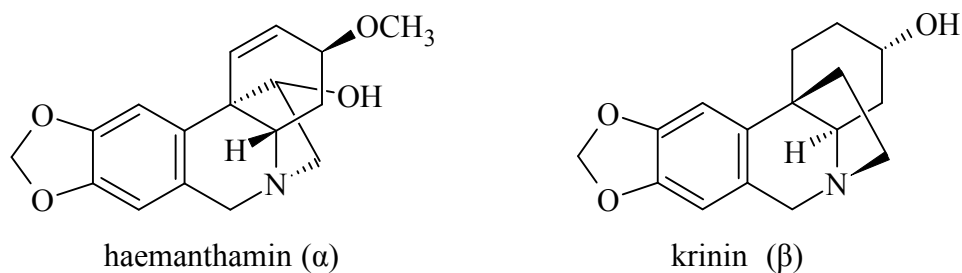
ungeremin

Obrázek 13. Přehled struktur alkaloidů lykorinového typu s významnou cytotoxickou aktivitou

Druhou nejvýznamnější skupinou amarylkovitých alkaloidů s protinádorovou aktivitou je haemanthaminový strukturní typ. Mezi nejúčinnější alkaloidy patří haemanthamin, haemanthidin a krinamin (Obr. 14), které působí cytotoxicky na nádorové buňky²¹. Protinádorový účinek haemanthaminu byl prokázán na různých buněčných nádorových liniích, zajímavá je jeho schopnost překonat rezistenci nádorových buněk a vyvolat buněčnou smrt indukci apoptózy⁷¹. Studie z roku 2015¹⁸ se zabývala stanovením IC_{50} proti dvěma p53-mutovaným lidským buněčným liniím kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT-29 u 13 amarylkovitých alkaloidů izolovaných ze *Zephyrantes robusta*⁶⁰ a *Chlidanthus fragrans*¹⁵. Současně byly použity normální buňky tenkého střeva FHS-74int k ověření celkové toxicity vůči zdravým buňkám. Vinorelbin, semisyntetický vinka alkaloid, byl použit jako standard. Z testovaných látek prokázaly největší aktivitu vůči oběma nádorovým liniím alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin¹⁸ (Tab. 5). Protinádorová aktivita haemanthaminu a haemanthidinu je přisuzována přítomnosti α -C2 5,10*b*-ethanového můstku ve struktuře molekuly. Tato orientace můstku se zdá být pro cytotoxickou aktivitu důležitá (Obr. 15). Alkaloidy obsahující ve své struktuře β -C2 můstek, např. krinin, ambellin, buphanamin, cytotoxické účinky nevykazují¹⁸.



Obrázek 14. Struktury alkaloidů haemanthaminového typu s cytotoxickou aktivitou



Obrázek 15. Rozdíl orientace 5,10*b*-ethanového můstku ve struktuře haemanthaminu a krininu

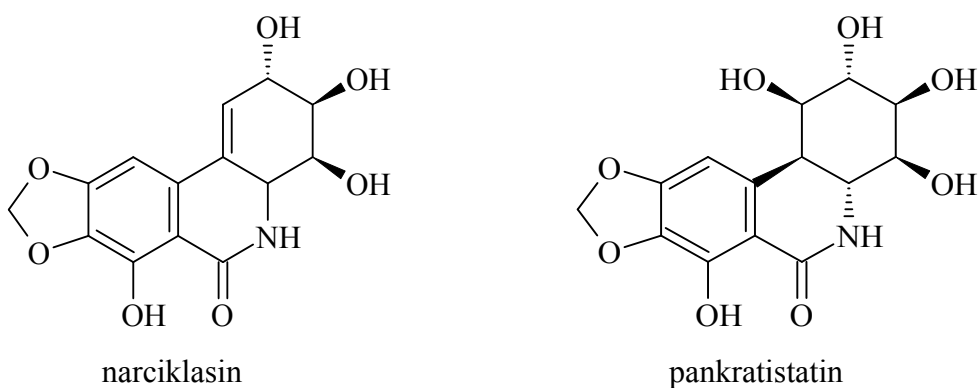
Tabulka 5. *In vitro* inhibiční cytotoxická aktivita alkaloidů haemanthaminového typu vůči dvěma nádorovým a jedné zdravé buněčné linii

Látka	Nádorové buňky		Zdravé buňky
	Caco-2 IC ₅₀ (μM)	HT-29 IC ₅₀ (μM)	FHS-74int IC ₅₀ (μM)
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemanthidin	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	11,6 ± 0,9
Lykorin	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,0	22,7 ± 0,1
Vinorelbin ^a	0,03 ± 0,0	n.t.	4,0 ± 0,3

^a Referenční látka

n.t. Nezměřeno

Ve skupině alkaloidů pankratistatinového strukturního typu dosahují prozatím nejlepších cytotoxických výsledků narciklasin a pankratistatin (Obr. 16). U narciklasinu byla prokázána indukce apoptózy u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a buněk karcinomu prostaty PC-3, zatímco účinek k primárním buňkám lidských fibroblastů Ccd-25-Lu je u narciklasinu 250× menší⁷⁴. Protinádorové účinky pankratistatinu byly stanoveny u mnoha typů malignit, např. u karcinomu prsu, tlustého střeva, ledvin, prostaty, leukémie, melanomu, osteosarkomu a dalších⁷⁵. U pankratistatinu byla zjištěna vysoká selektivita vůči nádorovým buňkám na dvou typech buněčných liniích kolorektálního karcinomu p53-mutovaných HT-29 a p53-wild-type HCT116 oproti zdravým fibroblastům střeva CCD-18Co. Pankratistatin působil cytotoxicky indukcí apoptózy pouze vůči nádorovým buňkám⁷⁶. Tento jeho cytotoxický účinek byl potvrzen i na buněčných liniích karcinomu prostaty LNCaP a DU145, kdy byly opět zdravé lidské fibroblasty HDF zasaženy minimálně⁷⁷.

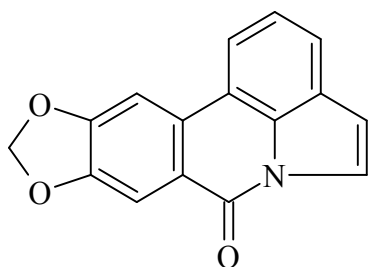


Obrázek 16. Struktury alkaloidů narciklasinu a pankratistatinu

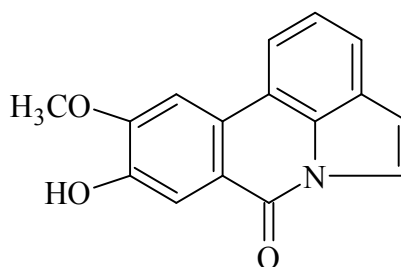
3.2.3. Antimikrobiální aktivita

Mezi studované aktivity alkaloidů čeledi Amaryllidaceae patří také antimikrobiální účinky. V roce 2009 byl analyzován extrakt z listů i jednotlivé izolované látky z rostliny *Crinum purpurascens*⁷⁸. Alkaloidy hippadin a pratorimin (Obr. 17) a jedna steroidní molekula (β -D-glukopyranosid sitosterolu) byly společně se sumárním extraktem podrobeny testu vůči několika bakteriím, které způsobují břišní tyfus (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi B*) či urogenitální infekce (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Tyto infekce jsou stále velmi závažným zdravotním problémem v rozvojových zemích. Pratorimin se ukázal jako antimikrobiálně neaktivní. Alkaloid hippadin a steroidní molekula pak společně vykázaly široký baktericidní účinek na testované bakterie⁷⁸.

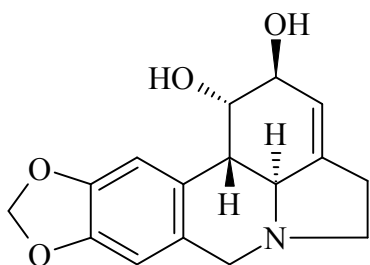
V rámci fytochemické studie rostliny *Amaryllis belladonna* bylo izolováno 6 alkaloidů – lykorin, pankracin, vittatin, 11-hydroxyvittatin, hippeastrin a nově zde popsán lykorinový alkaloid amarbellisin⁷⁹ (Obr. 17). Všechny tyto alkaloidy vykazovaly antimikrobiální účinky. Konkrétně proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* působil amarbellisin, pankracin, vittatin a 11-hydroxyvittatin. Gramnegativní bakterii *Escherichia coli* potlačoval amarbellisin a vittatin, *Pseudomonas aeruginosa* pak pouze pankracin. Všechny izolované alkaloidy působily antifungálně na *Candida albicans*⁷⁹.



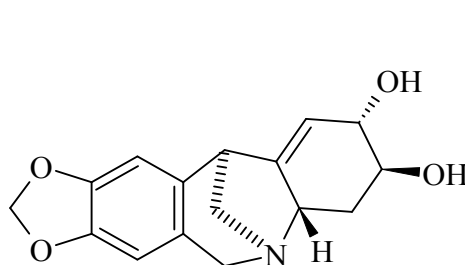
hippadin



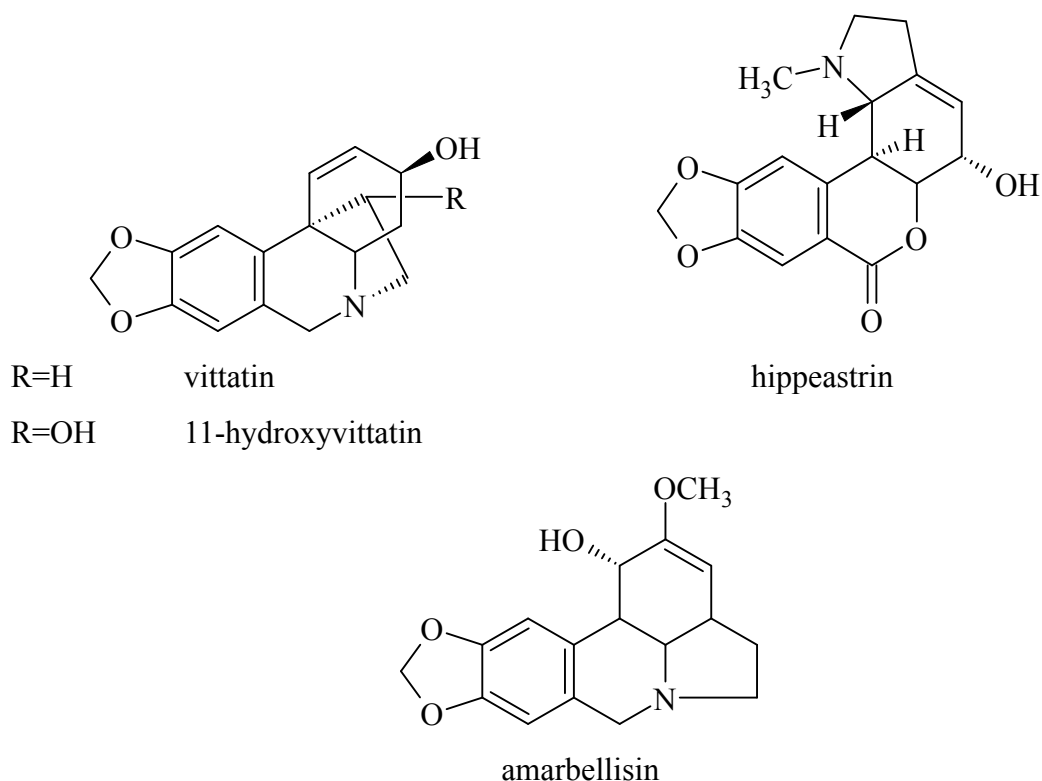
pratorimin



lykorin



pankracin



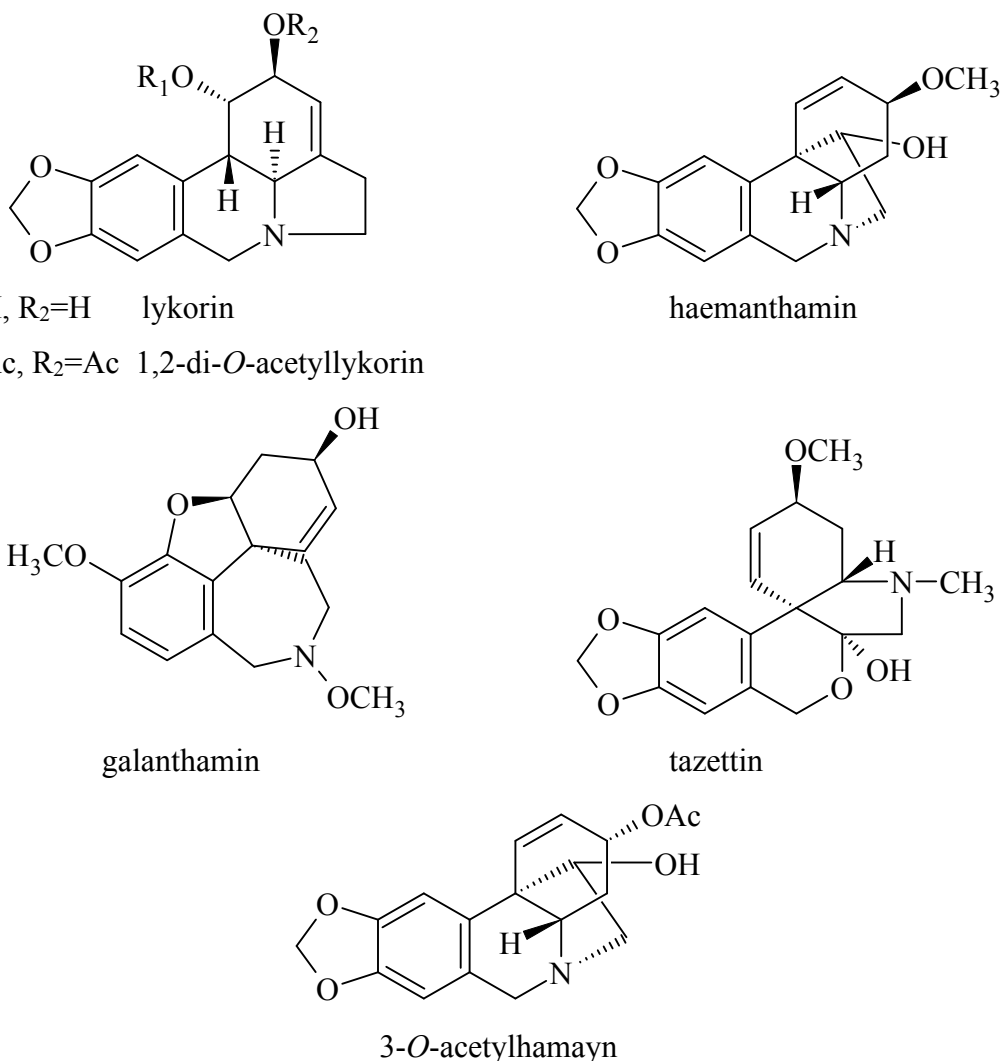
Obrázek 17. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae testované na antimikrobiální aktivitu

3.2.4. Antiprotozoální aktivita

Významná je rovněž antimalarická aktivita některých amaryllkovitých alkaloidů. Malárie je nejčastěji importované protozoální onemocnění, můžeme se s ní setkat i v našich podmínkách. Způsobuje ji prvek rodu *Plasmodium* a šíří se kousnutím samičky komára rodu *Anopheles* z jedné osoby na druhou. Nejrozšířenějším druhem je *Plasmodium falciparum*⁸⁰. Lykorin a 1,2-di-*O*-acetyllykorin (Obr. 18) izolované z *Brunsvigia littoralis* vykázaly slibnou antimalarickou aktivitu jak proti chlorochin-senzitivním, tak i chlorochin-rezistentním kmenům *P. falciparum*⁸¹. V jiné studii⁸² porovnávali přírodní alkaloidy lykorin, haemanthamin, galanthamin a tazettin (Obr. 18) v působení na *P. falciparum*. Zatímco lykorin a haemanthamin působily antimalaricky, galanthamin a tazettin působily velmi slabě. Z výsledků bylo vyvozeno, že methylenedioxybenzenová část molekuly a terciární dusík bez methylu přispívá k vyšší aktivitě lykorinu a haemanthaminu⁸².

Antiprotozoální účinky u již výše zmíněné rostliny čeledi Amaryllidaceae *Amaryllis belladonna* zkoumali ve své práci také Tallini et al.⁸². Nejvýznamnějších výsledků dosáhl alkaloid 3-*O*-acetylhamayn (Obr. 18), který působil silně proti všem zkoumaným parazitickým prvokům (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*). Nevýhodou se ukázalo, že bohužel působil zároveň cytotoxicky

vůči krysím myoblastům LC6, tudíž nelze tento alkaloid považovat za selektivní antiprotozoální látku⁸².



Obrázek 18. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae testované na antiprotozoální aktivitu

3.3. Rostliny rodu *Nerine*

Rod *Nerine* Herb. patří do čeledi Amaryllidaceae a s počtem asi 30 druhů se řadí mezi rozsáhlejší rody této rostlinné čeledi. Jedná se o cibulovité trvalky kvetoucí na podzim. Rostliny tohoto rodu rostou převážně endemicky v teplých oblastech jižní Afriky – v Botswaně, Lesothu, Namibii, Svazijsku a Jihoafrické Republice – tj. oblastech s letními dešti a chladnými suchými zimami⁸³.

Celá řada druhů rodu *Nerine* je pěstována jako okrasné rostliny vzhledem k jejich dekorativním různobarevným květům, což zároveň poskytuje prostor pro šlechtění kultivarů⁸⁴.

Cibule rostlin *Nerine* využívaly v tradiční medicíně domorodé jihoafrické kmeny Sotho a Zulu. Přípravovaly z nich odvary k léčbě kašle a nachlazení, ledvinových a jaterních obtíží, dále ulevovaly při bolestech zad, ale také našly uplatnění při řešení neplodnosti⁸⁵.

Z přibližně 30 dosud popsaných druhů rostlin *Nerine* bylo prozatím prostudováno pouze 11 z nich. Konkrétně se jedná o druhy *Nerine bowdenii*, *N. corusca*, *N. falcata*, *N. filamentosa*, *N. filifolia*, *N. flexuosa*, *N. huttoniae*, *N. krigei*, *N. laticoma*, *N. sarniensis* a *N. undulata*. Primární pozornost byla věnována studiu alkaloidů, dalším obsahovým látkám jen minimálně. Doposud bylo identifikováno nebo izolováno 53 amarylkovitých alkaloidů různých strukturních typů. Jmenovitě se popsané alkaloidy řadí mezi belladinový, krininový, haemanthaminový, homolykorinový, mesembrinový, montaninový a tazettinový typ²⁵.

Taxonomické zařazení rodu *Nerine*⁸⁶

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád:	chřestotvaré (<i>Asparagales</i>)
Čeleď:	amarylkovité (<i>Amaryllidaceae</i>)
Rod:	<i>Nerine</i>

3.3.1. *Nerine bowdenii*

Fytochemicky nejvýznamnějším a nejvíce prozkoumaným druhem tohoto rodu je endemická rostlina *Nerine bowdenii* W. Watson. Pochází z provincie KwaZulu-Natal a provincie Východní Kapsko v Jižní Africe, kde kvete od února do května, na severní polokouli pak v podzimních měsících⁸⁷. Jedná se o vytrvalou bylinu s podzemní cibulkou, roste do výšky 30 – 70 cm, listy jsou úzce řemenité, až 30 cm dlouhé, květy rostou v okolíku na přímém stvolu, květní stopky jsou lysé. Květy mají nálevkovitý tvar s úzkými růžovými okvětními lístky, na okraji jsou zvlňžené, nazpět stočené (Obr. 19)⁸⁸.



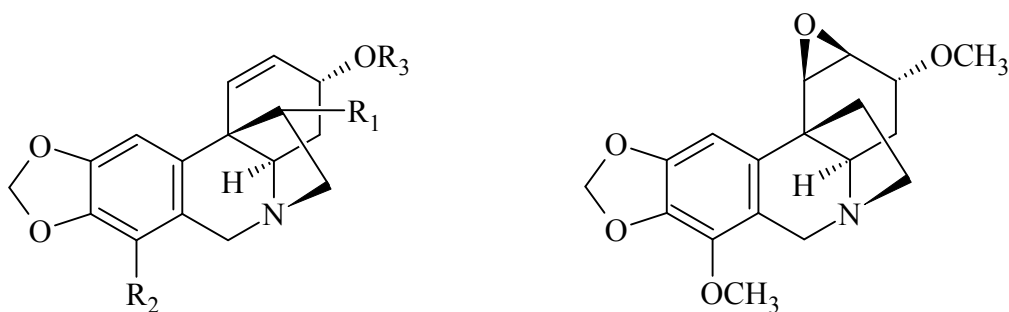
Obrázek 19. *Nerine bowdenii*⁸⁸

V tomto i minulém století byly provedeny různé studie zabývající se fytochemickou stránkou *Nerine bowdenii*. Během nich bylo z cibulí této rostliny izolováno a popsáno přibližně 30 amarylkovitých alkaloidů. Většina z nich patří do strukturního typu krininového, lykorinového a belladinového²⁵. Jako hlavní byly identifikovány ambellin, 11-*O*-acetylbambellin, undulatin, buphanisin⁸⁹, belladin, v menším zastoupení pak bowdesin, buphanidrin, krinamin, nerbowdin⁹⁰, powellin a ve stopovém množství 6-hydroxybuphanidrin, 6-hydroxypowellin⁹¹ a ungeremin⁵⁸ (Obr. 20). Některé z těchto alkaloidů izolované v čistém stavu byly podrobeny testu stanovení inhibiční aktivity vůči AChE (Tab. 6). Nejzajímavější hodnota byla zjištěna u alkaloidu krininového typu undulatinu s hodnotou IC_{50} 37 μ M⁸⁹ a lykorinového alkaloidu ungereminu s IC_{50} 0,35 μ M⁵⁸. Ungeremin je však molekula kvartérní povahy, tudíž její přestup přes HEB je minimální⁵⁸.

V rámci studie z roku 2011 byla publikována práce¹³, která popisuje detekci 22 molekul v alkaloidním extraktu z cibulí *N. bowdenii*, z nichž 19 bylo identifikováno pomocí GC/MS. V tomto vzorku měly největší poměrné zastoupení alkaloidy belladin, ambellin a *N*-demethylbelladin (Obr. 20). Právě belladin a *N*-demethylbelladin zde byly prvně popsány jako obsahová látka *N. bowdenii*. Celkový alkaloidní extrakt vykazoval zajímavou anticholinesterasovou aktivitu vůči lidské sérové BuChE (IC_{50} = 14,8 \pm 1,1 μ g/ml).

Podrobná fytochemická studie uveřejněná v roce 2016¹⁴ vedla k izolaci 22 amarylkovitých alkaloidů získaných z čerstvých cibulí *N. bowdenii*. Tyto alkaloidy patří do strukturního typu belladinového, krininového, haemanthaminového, lykorinového a tazettinového. V této práci byly poprvé popsány 2 alkaloidy belladinového typu 6-*O*-

demethylbelladin a 4'-*O*-demethylbelladin (Obr. 20). Vedle samotné izolace alkaloidů v čistém stavu se studie věnovala u látek získaných v dostatečném množství stanovení biologických aktivit – inhibiční aktivitě vůči lidské AChE a BuChE a POP. Dále jsou zde uvedeny výsledky screeningu cytotoxických účinků dosud netestovaných alkaloidů na p53-mutované lidské buněčné linie kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT-29. Současně byly použity normální buňky tenkého střeva FHS-74int k ověření celkové toxicity k nenádorovým buňkám. Zajímavé výsledky vykázal krininový alkaloid buphanisin. Z testovaných alkaloidů pak nejlepší aktivitu vůči HuAChE vykázaly krininové alkaloidy undulatin a powellin, vůči HuBuChE 4'-*O*-demethylbelladin a POP nejlépe inhiboval 4'-*O*-demethylbelladin, buphanidrin a 1-*O*-acetyllykorin.



$R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ ambellin

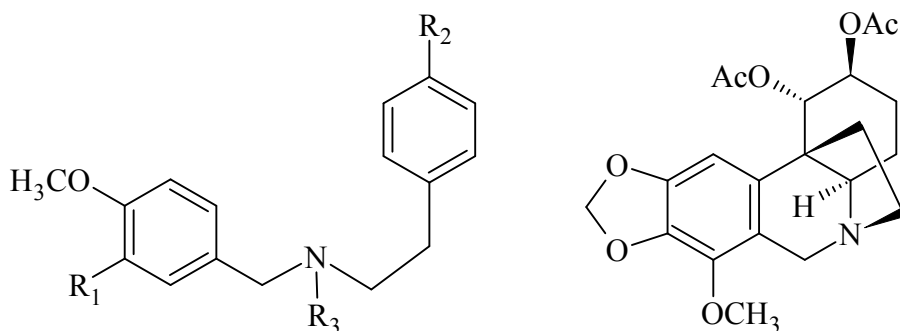
undulatin

$R_1=OAc, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ 11-*O*-acetylabellin

$R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ buphanidrin

$R_1=H, R_2=H, R_3=CH_3$ buphanisin

$R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=H$ powellin



$R_1=OCH_3, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ belladin

bowdesin

$R_1=OCH_3, R_2=OCH_3, R_3=H$ *N*-demethylbelladin

$R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ 4'-*O*-demethylbelladin

$R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=CH_3$ 6-*O*-demethylbelladin

Obrázek 20. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. bowdenii*

3.3.2. Další rostliny rodu *Nerine*

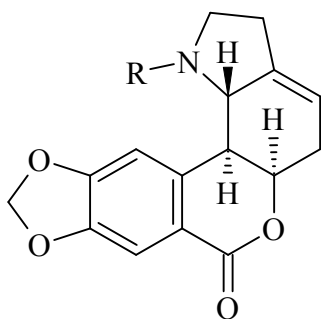
Nerine filifolia

N. filifolia Baker je vytrvalá cibulovitá bylina se stálezelenými tenkými listy a četnými stvoly, které nesou 8 – 10 květů světle růžové nebo červené barvy. Tento druh pochází z Východního Kapska, Mpumalanga a Svazijska⁸⁵.

GC/MS analýza alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *N. filifolia* z roku 2012⁹² uvádí 7 amarylkovitých alkaloidů, resp. 6 z nich bylo identifikováno jako masonin, *N*-demethylmasonin, karantin, lykordin, krinin, acetylkarantin a *O*-methylodulin (Obr. 21). Jeden alkaloid se podle hmotnostního spektra nepodařilo identifikovat a může se tak jednat o novou doposud nepopsanou látku. V alkaloidním vzorku převažoval homolykordinový strukturní typ.

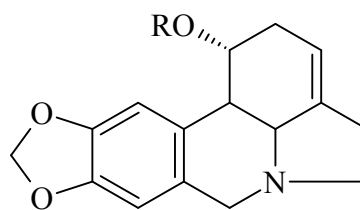
Fytochemickou studií uveřejněnou v roce 2014⁸⁵ bylo z této rostliny izolováno 8 amarylkovitých alkaloidů. Hlavními složkami byly belladin, 11-*O*-acetylbambellin a undulatin, v menším zastoupení pak bambellin a 6 α -methoxybuphanidrin (Obr. 21). Jako přírodní produkty byly v této práci prvně popsány *N*-demethylbelladin, 6 α -methoxybuphanidrin a filifolin (11-*O*-nikotinylbambellin) (Obr. 21)

V *N. filifolia* bylo v rámci jiné studie zjištěno i malé množství galanthaminu⁹³.



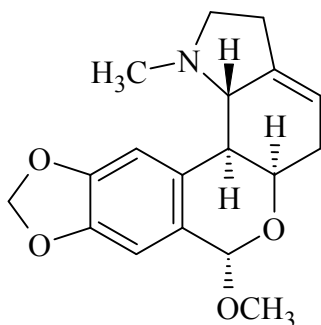
R=CH₃ masonin

R=H *N*-demethylmasonin

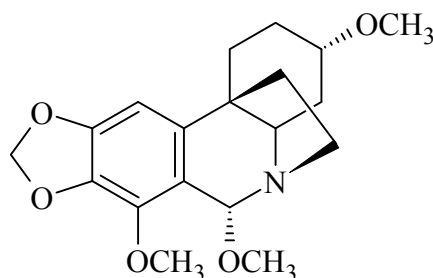


R=H karantin

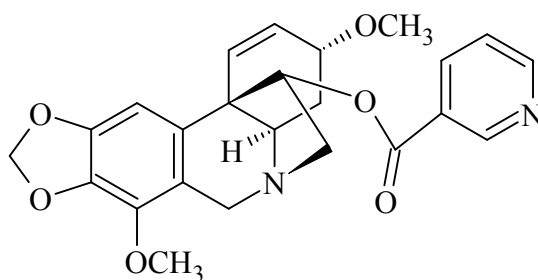
R=Ac acetylkarantin



O-methylodulin



6 α -methoxybuphanidrin



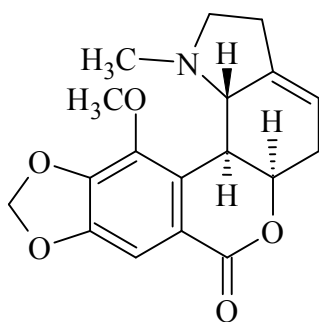
filifolin

Obrázek 21. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. filifolia*

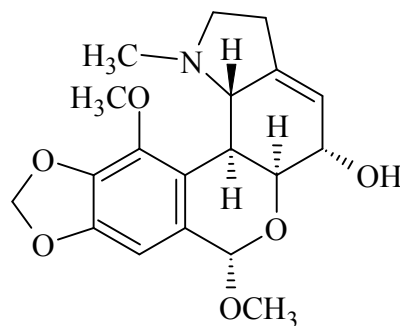
Nerine huttoniae

N. huttoniae Schönland je vytrvalý druh s velkými cibulemi a stálezelenými, dlouhými, tenkými, lesklými, tmavě zelenými listy. Kvete v létě. Roste v západní části provincie Východní Kapsko⁹⁴.

V rámci rozsáhlého screeningu rostlin čeledi Amaryllidaceae vykázal sumární extrakt *N. huttoniae* zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE. Z tohoto extraktu byly poté izolovány 4 alkaloidy – lykorin, tazettin, oxokrigenamin a dále 6-*O*-methylkrigein (Obr. 22), který byl vůbec prvně identifikován v čeledi Amaryllidaceae. Zatímco 6-*O*-methylkrigein neprojevil žádnou aktivitu vůči AChE, oxokrigenamin vykázal hodnotu IC₅₀ 34 ± 11 µg/ml⁹⁵.



oxokrigenamin



6-*O*-methylkrigein

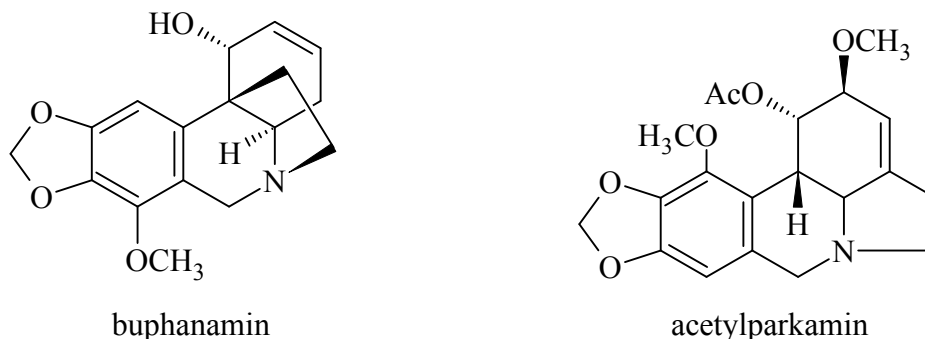
Obrázek 22. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. huttoniae*

Nerine filamentosa

N. filamentosa W. F. Barker je stálezelený vytrvalý druh rostoucí v malé oblasti Východního Kapska⁹⁶.

V roce 2012 byla publikována studie⁹², která se zabývala GC/MS analýzou alkaloidního extraktu z čerstvých cibulí *N. filamentosa* za účelem identifikace jednotlivých složek a stanovení jeho inhibiční aktivity vůči cholinesterasám. Sumární extrakt vykázal pro

AChE hodnoty IC_{50} $21.6 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$ a pro BuChE IC_{50} $13,0 \pm 0,7$ $\mu\text{g/ml}$. Ve vzorku dominovaly tři alkaloidy krininového typu – undulatin, buphanamin, ambellin, a jeden alkaloid lykorinového typu – acetylparkamin (Obr. 23).

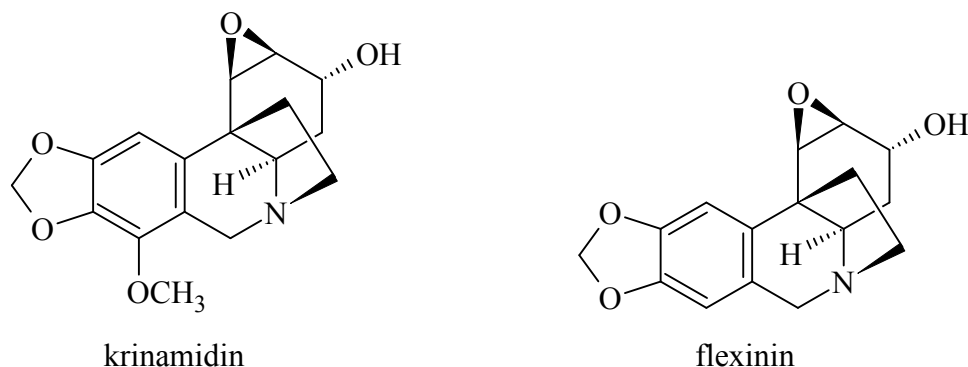


Obrázek 23. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. filamentosa*

Nerine undulata

N. undulata (L.) Herb. roste v oblasti Východního Kapska a produkuje velmi jemné pavoukovité květy⁹⁷.

Fytochemické analýzy vedly k identifikaci a izolaci lykorinu, ambellinu, undulatinu⁹⁸, dále buphanaminu, buphanidrinu, bowdensinu, krinamidinu a flexininu⁹⁹ (Obr. 24).

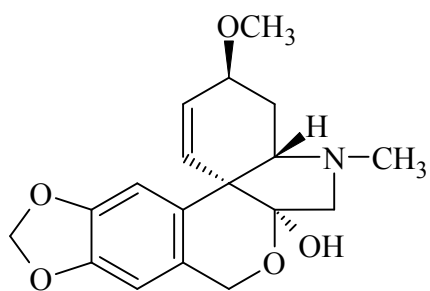


Obrázek 24. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. undulata*

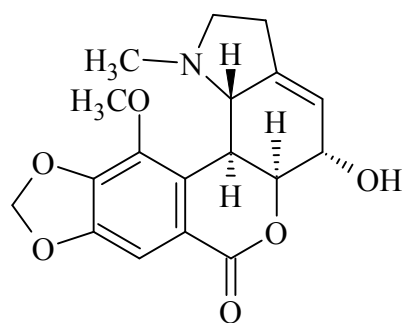
Nerine sarniensis

N. sarniensis (L.) Herb. je považována za zřejmě nejkrásnější druh tohoto rodu. Pochází z oblasti Západního Kapska¹⁰⁰.

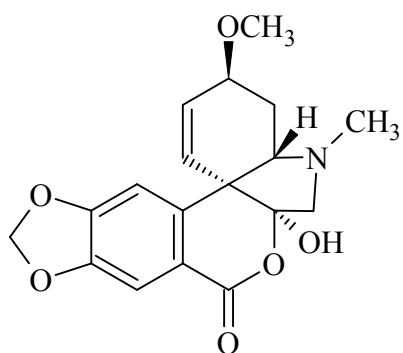
Alkaloidní spektrum tohoto druhu zůstává prozatím převážně neprobádáno, přesto z něj již byly izolovány amarylkovité alkaloidy tazettin, nerinin, lykorin, 3-epimakronin a sarniensin^{101,102} (Obr. 25).



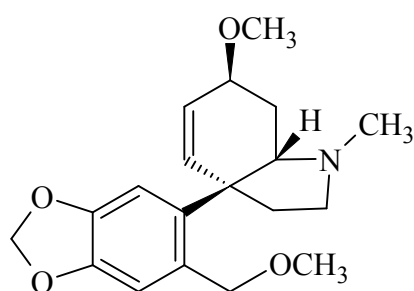
tazettin



nerinin



3-epimakronin



sarniensin

Obrázek 25. Struktury vybraných alkaloidů izolovaných z *N. sarniensis*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a vybavení použité při izolaci a identifikaci alkaloidů z *Nerine bowdenii*

4.1.1. Rozpouštědla

- Aceton p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Me_2CO)
- Benzin lékařský RN vyhovující ČL 2009 a ČSN 656544 (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12} , cHx)
- Diethylether p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethylacetát č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- Chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl_3)
- Chloroform deuterovaný pro NMR analýzu – chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl_3)
- Methanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- Methanol deuterovaný pro NMR analýzu – methanol-d₄ atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- Toluen p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, To)

4.1.2. Chemikálie

- Amoniak vodný roztok 22 – 25% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- Diethylamin p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2OH , DEA)
- Dusičnan bismutitý zásaditý p.a. (Lachema, Brno) ($\text{BiNO}_3(\text{OH})_2 \cdot \text{BiO}(\text{OH})$)
- Hydroxid sodný č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaOH)
- Chlorid rtuťnatý p.a. (Fischer Scientific, Pardubice) (HgCl_2)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina sírová 96% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (H_2SO_4)
- Kyselina vinná p.a. (Balex, Pardubice) ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)

4.1.3. Chromatografické adsorbenty

A1: Oxid hlinitý (Al_2O_3) pro sloupcovou chromatografii neutrální, 63 – 200 μm ;
Across (Lach-Ner, Neratovice), deaktivovaný 6 % vody

A2: Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha); 20 × 20 cm, komerční hliníková
deska s vrstvou silikagelu pro analytickou TLC, tloušťka vrstvy 0,2 mm

A3: Silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck Millipore, Praha) na přípravu desek pro preparativní
TLC

4.1.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1: cHx:EtOAc:DEA (5:4:1)

S2: cHx:Aceton: NH_4OH (30:60:2)

S3: To:DEA (99:1)

4.1.5. Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera¹⁰³

- roztok A byl připraven rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g
kyseliny vinné v 80 ml vody

- roztok B byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody

- zásobní roztok byl získán smísením roztoků A a B v poměru 1:1

- činidlo pro analýzu bylo připraveno rozpuštěním 5 ml kyseliny vinné v 50 ml vody
a 5 ml zásobního roztoku

- zásobní roztok i činidlo byly uchovávány v lednici při 4 °C

Mayerovo činidlo

- vzniklo rozpuštěním 5 g jodidu draselného ve 30 ml vody, k tomuto roztoku bylo
přidáno 1,35 g práškového chloridu rtuťnatého a bylo mícháno do rozpuštění vzniklé
sraženiny

- činidlo bylo uchováno v lednici při 4 °C

4.1.6. Pomocný materiál

Křemelina (Sigma Aldrich, Praha) (SiO_2)

Silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)

Síran sodný bezvodý p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)

Vata

4.1.7. Přístroje

pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)

Plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 spojený s hmotnostním spektrometrem (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

Spektrometr VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114 vybavená vodní lázní Buchi Waterpath B-480 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland)

Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)

4.2. Materiál a vybavení použité ke stanovení biologických aktivit

4.2.1. Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid p.a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)

Berberin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Praha) ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{Cl}$)

10mM butyrylthiocholin jodid p.a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)

Diethylether p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et_2O)

Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH_2PO_4)

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

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

Dioxan p.a. (Lach-Ner, Neratovice) ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)

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

Ethylacetát č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)

Galanthamin hydrobromid $> 98\%$ (Changsha Organic Herb Inc., People Republic of China) ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$)

Hydrogenfosforečnan sodný bezvodý p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2HPO_4)

Chlorid draselný p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)

Chlorid sodný p.a. (Lachema, Brno) (NaCl)

Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₃H₁₆N₄O₄)

Z-Pro-prolinal $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₈H₂₂N₂O₄)

4.2.2. Pufry

5mM fosfátový pufr pH 7,4

- připravený smícháním 57 ml *roztoku A* s 283 ml *roztoku B* a 300 ml vody

- *roztok A*: 10mM roztok dihydrogenfosforečnanu sodného

(1,20 g NaH₂PO₄·2H₂O v 1 l roztoku)

- *roztok B*: 10mM roztok hydrogenfosforečnanu sodného

(1,42 g Na₂HPO₄ v 1 l roztoku)

5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM NaCl

- 8,766 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 do objemu 1000 ml

100mM fosfátový pufr pH 7,4

- připravený smícháním 57 ml *roztoku A* s 243 ml *roztoku B* a 300 ml vody

- *roztok A*: 200mM roztok dihydrogenfosforečnanu sodného

(24,0 g NaH₂PO₄·2H₂O v 1 l roztoku)

- *roztok B*: 200mM roztok hydrogenfosforečnanu sodného

(28,4 g Na₂HPO₄ v 1 l roztoku)

PBS: 100mM Na/K fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl

- připravený smícháním 20 ml *roztoku A* se 100 ml *roztoku B*

- *roztok A*: 0,68 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 1,50 g chloridu sodného bylo společně rozpuštěno ve 100 ml vody

- *roztok B*: 0,89 g dihydrofosforečnanu sodného a 1,50 g chloridu sodného bylo společně rozpuštěno ve 100 ml vody

4.2.3. Přístroje

Microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Odstředivka Avanti J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)

Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)

Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.3. Všeobecné postupy

4.3.1. Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím přečištěna předestilováním. Nejprve byl zachycen předeček (cca 5 %, většinou s vodným azeotropem) a poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých skleněných nádobách.

Sumární ethanolové extrakty pro izolaci alkaloidů byly odpařeny na poloprovozní odparce Laborota 20 Heidolph na vodní lázni při 50 °C za sníženého tlaku.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Buchi Rotavapor R-114 vybavené vodní lázní Buchi Waterpath B-480 při 45 °C za sníženého tlaku.

4.3.2. Sušení a skladování

Sušení alkaloidních extraktů, frakcí i chemicky čistých látek probíhalo ve vakuovém exsikátoru (vakuum cca 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu po dobu minimálně 24 hodin. Po vysušení byly uchovávány v lednici při teplotě 2 – 8 °C.

4.3.3. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla provedena systémem stupňovité eluce na oxidu hlinitém neutrálním deaktivovaným 6 % vody. Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony obvyklým způsobem. Na povrch sloupce byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

4.3.4. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna vzestupně v systému normálních komor, které byly předem nasyceny mobilní fází. Sycení komor trvalo 20 minut. Chromatogramy byly detekovány pod UV ($\lambda = 254$ a 366 nm) a jednotlivé zóny byly označeny preparativní jehlou. Zóny se stejným Rf u všech desek byly vyškrábány, spojeny a smíchány se stejným objemovým množstvím křemeliny nebo oxidu hlinitého a v koloně promývány směsí CHCl_3 :EtOH (1:1).

4.3.5. Detekce alkaloidů

Přítomnost alkaloidů ve vodné fázi byla při přípravě alkaloidního extraktu dokazována pomocí Mayerova činidla. Po okyselení roztoku pomocí HCl na pH 2 – 3 a přidání 1 – 2 ml vody bylo k roztoku přidáno několik kapek činidla. V případě přítomnosti alkaloidů vznikla v roztoku bílá sraženina.

Kontrolní chromatogramy frakcí ze sloupcové chromatografie i preparativní TLC byly detekovány nejprve pod UV ($\lambda = 254$ a 366 nm), viditelné zóny označeny a poté postříkány Dragendorffovým činidlem. Po odvětrání činidla vzniklo v případě přítomnosti alkaloidů intenzivní oranžové zbarvení.

4.4. Extrakce a izolace alkaloidů z *Nerine bowdenii*

4.4.1. Původ drogy

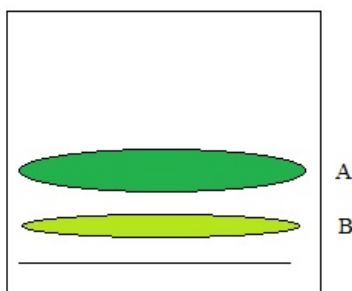
Čerstvé cibule rostliny *Nerine bowdenii* W. Watson byly pořízeny u komerčního prodejce Lukon-Glads a.s. (Sadská, Česká republika). Verifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Vzorek drogy byl uložen v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod číslem CUFPH-16130/AL-254.

4.4.2. Zpracování alkaloidního extraktu

Alkaloidní extrakt byl připraven Mgr. Ninou Vaněčkovou, Ph.D. v rámci její disertační práce¹⁰⁴. Předmětem předložené rigorózní práce bylo zpracování frakce 9, 16, 41 za účelem izolace čistých alkaloidů.

4.4.3. Zpracování frakce 9

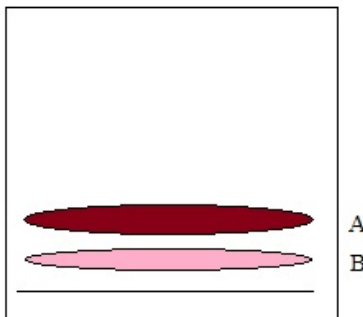
0,0957 g vzorku bylo rozpuštěno v CHCl_3 , naneseno na 5 desek velikosti 20×10 cm a následně podrobena preparativní TLC na tenkých vrstvách SiO_2 . Vyvíjení desek probíhalo v soustavě S2 vždy dvakrát. Na základě UV detekce byly z desek vypreparovány dvě zóny označené 9A a 9B (Obr. 26). Obě zóny byly přečištěny od mechanických nečistot filtrací přes vrstvu SiO_2 promytím směsí CHCl_3 :EtOH (1:1). Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byl vzorek 9A (0,0778 g) podroben strukturní analýze. Vzorek 9B (0,0150 g) byl uložen pro případné další zpracování.



Obrázek 26. Preparativní TLC frakce 9

4.4.4. Zpracování frakce 16

Vzorek o hmotnosti 0,1043 g byl rozpuštěn v CHCl_3 a nanesen na 4 tenké desky SiO_2 velikosti 20×10 cm, jež byly podrobena preparativní TLC. Tyto desky byly vyvíjeny vždy třikrát v soustavě S3. Pomocí UV detekce byly z desek získány dvě zóny označené 16A a 16B (Obr. 27), které byly jednotlivě přečištěny od mechanických nečistot filtrací přes kolonu. Zóna 16A byla po promytí stacionární fáze směsí CHCl_3 :EtOH (1:1) přečištěna přes vrstvu SiO_2 , zóna 16B přes vrstvu Al_2O_3 . Po odpaření rozpouštědel a krystalizaci byly jednotlivé čisté látky 16A (0,0639 g) a 16B (0,0373 g) podrobena strukturní analýze.

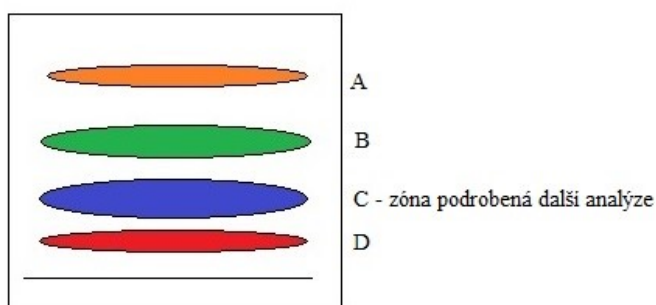


Obrázek 27. Preparativní TLC frakce 16

4.4.5. Zpracování frakce 41

Vzorek o hmotnosti 0,8710 g byl rozpuštěn v CHCl_3 a nanesen na 25 skleněných desek 15×15 cm s vrstvou SiO_2 . Desky byly podrobeny preparativní TLC v soustavě S1, vyvíjeny byly dvakrát. Na základě UV detekce a detekce pomocí Dragendorffova činidla byly z desek vypreparovány 4 zóny (41A – 41D; Obr. 28). Stacionární fáze těchto zón byly přečištěny filtrací přes vrstvu Al_2O_3 . K promytí byla použita směs $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1).

Zóna 41C se jevila pod UV detekcí jako směs více látek, proto byla podrobena další separaci za účelem oddělení jednotlivých alkaloidů. Zbylé zóny nebyly v rámci této rigorózní práce dále zpracovávány.

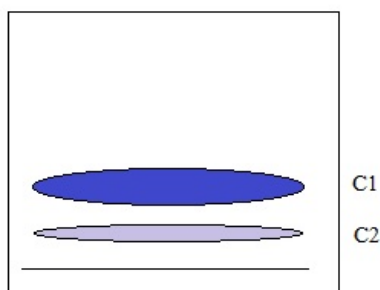


Obrázek 28. Preparativní TLC frakce 41

4.4.5.1. Zpracování podfrakce 41C

0,4890 g přečištěného a vysušeného vzorku bylo rozpuštěno v CHCl_3 a separováno pomocí preparativní TLC na 9 skleněných deskách SiO_2 15×15 cm. Desky byly vyvinuty jednou v soustavě S2. Na základě detekce pomocí UV lampy byly izolovány dvě zóny označené jako 41C1 a 41C2 (Obr. 29).

Po odpaření rozpouštědla a krystalizaci byl vzorek 41C1 (0,3581 g) podroben strukturální analýze. Vzorek 41C2 (0,0949 g) byl uložen pro případné další zpracování.



Obrázek 29. Preparativní TLC podfrakce 41C

Na základě porovnávací TLC provedené v soustavách S1 a S2 byly vzájemně spojeny zóny 9A s 41C1 a 9B s 41C2.

4.5. Strukturní identifikace izolovaných látek

4.5.1. EI-MS analýza (hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací)

Identifikace získaných alkaloidů z rostliny *N. bowdenii* byla provedena pomocí plynového chromatografu spojeným s hmotnostním spektrometrem Agilent 7890A GC 5975. Analýza probíhala v EI režimu použitím kolizní energie 70 eV. K separaci jednotlivých složek byla použita kolona typu HP-5. Teplotní program byl 100 – 180 °C s nárůstem 15 °C/min, 1 min na 180 °C, 180 – 300 °C při 5 °C/min a po dobu 5 min na 300 °C, škála detekce m/z 40 – 600. Průtok nosného plynu (helium) byl 0,8 ml/min. Teplota při nástřiku vzorku byla 280 °C, teplota detektoru 200 °C. Alkaloidy byly rozpuštěny v MeOH (1 mg/ml) a nástřik byl proveden v split modu v poměru 1:10.

Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány na základě porovnání získaných spekter se známými spektry uveřejněnými v NIST knihovně (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v odborné literatuře nebo s referenčními spektry alkaloidů, které byly již dříve izolované a identifikované v rámci výzkumu pracovní skupiny ADINACO.

4.5.2. NMR analýza

NMR spektra byla měřena na spektrometru VNMR S500 s pracovní frekvencí 499,87 MHz pro ^1H a 125,70 MHz pro ^{13}C jádra. Měření byla prováděna v deuteriochloroformu při 25 °C. K ozařování a detekci signálu byla použita OneNMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty.

Hodnoty chemických posunů δ jsou udány v parts per million (ppm), v prostředí CDCl_3 byly $\delta = 7,26$ ppm pro ^1H atomy a $\delta = 77,00$ ppm pro ^{13}C atomy. Naměřená data jsou ve výsledcích uváděna v pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet, bs = široký singlet) a interakční konstanta J (Hz).

4.5.3. Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru P3000. Látky byly rozpuštěny v CHCl_3 . Specifická otáčivost byla dopočítána dle vzorce:

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

t – teplota měření

D – linie sodíkového světla $\lambda = 589,3 \text{ nm}$

α – naměřená otáčivost [°]

c – koncentrace měřeného alkaloidu [g/100 ml]

l – délka květy [dm]

4.6. Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Měření cholinesterasové inhibiční aktivity bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Podrobný popis metody je uveden v následující literatuře (Cahlíková et al., 2011)²⁹.

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla použita modifikovaná Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹⁰⁵. Hodnoty IC_{50} (koncentrace testované látky, která je schopna inhibovat cholinesterasu z 50 %) byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism.

% I (inhibice) bylo počítáno dle vzorce:

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

kde ΔA_{Bl} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{Sa} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

Zjištěná inhibiční aktivita IC_{50} AChE a BuChE pro jednotlivé látky byla porovnána s hodnotami IC_{50} známých referenčních látek.

4.7. Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči prolyl oligopeptidase

Měření inhibiční aktivity vůči POP bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové Univerzity obrany v Brně. Stanovení provedla Mgr. Martina Hrabínová. Podrobný popis

metody je možno nalézt v následující literatuře (Cahlíková et al., 2015)¹⁰⁶.

Inhibiční aktivita testovaných látek byla měřena pomocí spektrofotometrické metody za použití *Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu* jako substrátu a byla vyjádřena jako IC₅₀ (koncentrace testované látky, která vyvolá 50% POP inhibici). Zjištěné hodnoty IC₅₀ byly porovnány s IC₅₀ referenčních látek.

4.8. Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů

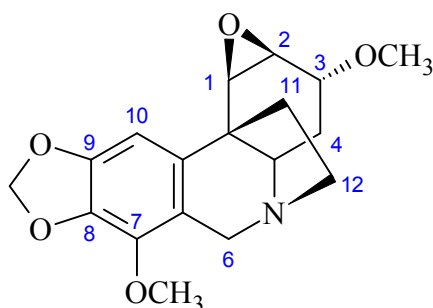
Izolované alkaloidy byly podrobeny testu stanovení cytotoxicity na dvou nádorových (Caco-2, HT-29) a jedné zdravé (FHS-74int) buněčné linii střevního epitelu. Měření cytotoxické aktivity provedl Ing. Ivo Doskočil, Ph.D. z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Přesný popis metody je uvedený v následující literatuře (Doskočil et al., 2015)¹⁸.

5. VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako undulatin, buphanidrin a 1-*O*-acetylbulbisin.

5.1. Strukturní studie undulatinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter, MS spekter, optické otáčivosti a porovnáním těchto dat s daty v literatuře jako undulatin, alkaloid patřící do krininového strukturního typu Amaryllidaceae alkaloidů¹⁰⁷ (Obr. 30).



Obrázek 30. Struktura undulatinu

MS studie undulatinu (EI-MS)

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 331(100), 316(6), 302(9), 300(6), 286(20), 272(5), 260(18), 258(40)

NMR studie undulatinu

^1H -NMR (499.9 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

6.62 (1H, s, H-10), 5.89 (1H, d, $J=1.5$ Hz, overlapped, OCH_2O), 5.88 (1H, d, $J=1.5$ Hz, overlapped, OCH_2O), 4.27 (1H, d, $J=17.6$ Hz, H-6), 4.00-3.97 (1H, m, H-3), 3.98 (3H, s, C7- OCH_3), 3.79 (1H, d, $J=17.6$ Hz, H-6), 3.75 (1H, d, $J=3.4$ Hz, H-1), 3.43 (3H, s, C3- OCH_3), 3.33 (1H, dd, $J=3.4, 2.4$ Hz, H-2), 3.28 (1H, ddd, $J=12.8, 10.9, 4.7$ Hz, H-12), 3.14 (1H, dd, $J=13.6, 3.3$ Hz, H-4a), 2.85 (1H, ddd, $J=12.8, 9.1, 5.8$ Hz, H-12), 2.43 (1H, ddd, $J=12.5, 10.9, 5.8$ Hz, H-11), 2.04 (1H, ddd, $J=12.5, 9.1, 4.7$ Hz, H-11), 1.91 (1H, brd, $J=13.8$ Hz, H-4), 1.42 (1H, ddd, $J=13.8, 13.6, 3.0$ Hz, H-4)

^{13}C -NMR (125.7 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

148.4 (s, C-8), 141.0 (s, C-10), 138.2 (s, C-9), 133.5 (s, C-6a), 117.9 (s, C-10a), 100.7 (t, OCH_2O), 96.4 (d, C-7), 74.6 (d, C-3), 61.4 (d, C-4a), 59.1 (q, OCH_3), 58.3,

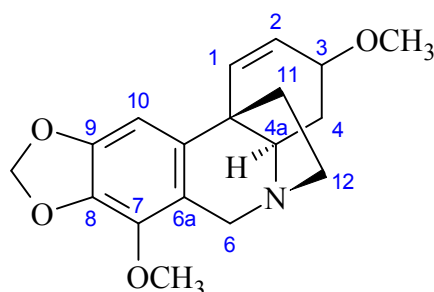
57.7, 55.0, 53.5, 52.4 (C-1,2,6,12 a OCH₃), 41.7 (s, C-10b), 38.7 (t, C-11), 24.7 (t, C-4).

Optická otáčivost undulatinu

$[\alpha]_D^{25} = -15,1^\circ$ (c=0,1, CHCl₃)

5.2. Strukturní studie buphanidrinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ¹H- a ¹³C-NMR spekter, MS spekter, optické otáčivosti a porovnáním těchto dat s daty v literatuře jako buphanidrin, alkaloid krininového strukturního typu¹⁰⁷ (Obr. 31).



Obrázek 31. Struktura buphanidrinu

MS studie buphanidrinu (EI-MS)

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int) 315(100), 300(32), 284(40), 272(10), 260(45), 245(63), 231(25), 215(22), 202(25).

NMR studie buphanidrinu

¹H-NMR (499.9 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

1.60 (1H, ddd, $J = 4.0, 13.5, 13.5$ Hz, H-4 β), 1.99 (1H, ddd, $J = 6.0, 10.5, 12.5$ Hz, H-11 $_{exo}$), 2.20 (1H, ddd, $J = 4.0, 9.0, 12.5$ Hz, H-11 $_{endo}$), 2.46 (1H, brd, $J = 13.5$ Hz, H-4 α), 2.99 (1H, ddd, $J = 6.0, 9.0, 13.0$ Hz, H-12 $_{endo}$), 3.29 (3H, s, 3-OMe), 3.50 (1H, dd, $J = 3.5, 13.5$ Hz, H-4a), 3.64 (1H, m, H-12 $_{exo}$), 3.77 (1H, m, H-3), 3.92 (3H, s, 7-OMe), 3.95 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-6 β), 4.35 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-6 α), 5.81-5.82 (2H, 2d, $J = 1.5$ Hz, OCH₂O), 5.95 (1H, dd, $J = 5.0, 10.0$ Hz, H-2), 6.42 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1), 6.50 (1H, s, H-10).

¹³C-NMR (125.7 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

148.2 (s, C-9), 140.8 (s, C-7), 138.6 (s, C-10a), 133.4 (s, C-8), 132.1 (d, C-1), 125.5 (d, C-2), 115.8 (s, C-6a), 100.6 (t, OCH₂O), 96.9 (d, C-10), 72.2 (d, C-3), 62.8 (d, C-

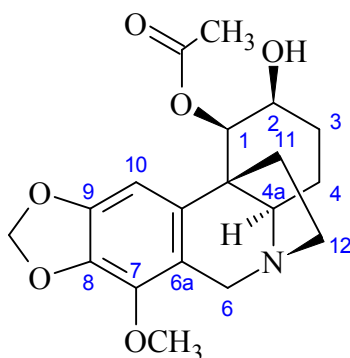
4a), 59.1 (q, 7-OMe), 58.1 (t, C-6), 56.5 (q, 3-OMe), 53.3 (t, C-12), 44.3 (s, C-10b), 43.4 (t, C-11), 28.0 (t, C-4).

Optická otáčivost buphanidrinu

$[\alpha]_D^{25} = 19,0^\circ$ (c=0,3, CHCl₃)

5.3. Strukturní studie 1-*O*-acetylbulbisinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ¹H- a ¹³C-NMR spekter, MS spekter, optické otáčivosti a porovnáním těchto dat s daty v literatuře jako 1-*O*-acetylbulbisin, alkaloid krininového strukturního typu¹⁰⁸ (Obr. 32).



Obrázek 32. Struktura 1-*O*-acetylbulbisinu

MS studie 1-*O*-acetylbulbisinu (EI-MS)

EI-MS, 70 eV, *m/z* (rel. int) 361(100), 318(16), 314(24), 272(35), 254 (30), 231(20), 202(20).

NMR studie 1-*O*-acetylbulbisinu

¹H NMR (499.9 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

1.67 (1H, dd, $J_2 = 2.9$, $J_3 = 14.2$, H-3 α), 1.81 (1H, dd, $J_2 = 3.2$, $J_3 = 12.5$, H-4 β), 2.01 (1H, m, H-4 α), 2.02 (1H, m, H-3 β), 2.23 (2H, m, H-11 $endo$), 3.44 (1H, dd, $J_2 = 7.3$, $J_3 = 10.3$, H-12 $endo$), 3.49 (1H, m, H-11 exo), 3.82 (1H, dd, $J_2 = 5.5$, $J_3 = 12.5$, H-4a), 3.94 (1H, dd, $J_2 = 3.8$, $J_3 = 11.0$, H-12 exo), 4.04 (3H, s, MeO-7), 4.31 (1H, d, $J = 16.0$, H-6 β); 4.34 (1H, brdd, $J_2 = 3.9$, $J_3 = 5.8$, H-2 α), 4.57 (1H, d, $J = 16.0$, H-6 α), 5.13 (1H, d, $J = 3.9$, H-1), 5.93 (2H, s, OCH₂O), 6.31 (1H, s, H-10).

¹³C NMR (125.7 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

171.9 (s, Ac-CO-1), 151.5 (s, C-9), 141.6 (s, C-7), 139.2 (s, C-10a), 135.6 (s, C-8), 111.0 (s, C-6a), 102.9 (t, 8-OCH₂O-9), 98.6 (d, C-10), 76.0 (d, C-1), 69.5 (d, C-4a),

66.0 (d, C-2), 60.0 (q, MeO-7), 56.8 (t, C-6), 53.0 (t, C-12), 35.6 (t, C-11), 28.3 (t, C-3), 21.3 (q, Ac-CH₃-1), 19.2 (t, C-4).

Optická otáčivost 1-*O*-acetylbulbisinu

$$[\alpha]_{D}^{25} = 21,3^{\circ} (c=0,1, \text{CHCl}_3)$$

5.4. Inhibiční aktivita vůči HuAChE, HuBuChE, POP

Izolované alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase (HuAChE) a sérové butyrylcholinesterase (HuBuChE). Tyto alkaloidy byly rovněž podrobeny testu na stanovení inhibiční aktivity vůči POP. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 6).

Tabulka 6. *In vitro* inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči HuAChE, HuBuChE, POP

Látka	IC ₅₀ ^a HuAChE (μM)	IC ₅₀ ^a HuBuChE (μM)	IC ₅₀ ^a POP (mM)
Undulatin	23,5 ± 1,2	> 1000	1,97 ± 0,12
Buphanidrin	72,6 ± 8,2	> 1000	0,37 ± 0,04
1- <i>O</i> -Acetylbulbisin	84,8 ± 11,0	481,7 ± 84,1	2,45 ± 0,21
Galanthamin ^b	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	> 100
Berberin ^b	-	-	0,14 ± 0,02

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

5.5. Cytotoxická aktivita vůči dvěma buněčným liniím kolorektálního karcinomu tlustého střeva a buněčné linii normálních střevních buněk

Dva ze tří izolovaných alkaloidů, undulatin a 1-*O*-acetylbulbisin, byly podrobeny testu na jejich cytotoxickou aktivitu vůči lidským p53-mutovaným buněčným liniím kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT-29 a buněčné linii normálních střevních buněk FHS-74int. Získané údaje jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 7)

Tabulka 7. *In vitro* inhibiční cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů vůči dvěma nádorovým a jedné zdravé buněčné linii

Látka	Nádorové buňky		Zdravé buňky
	Caco-2 IC ₅₀ ^a (μM)	HT-29 IC ₅₀ ^a (μM)	FHS-74int IC ₅₀ ^a (μM)
Undulatin	51,7 ± 1,1	53,4 ± 2,2	70,4 ± 6,8
1- <i>O</i> -Acetylbulbisin	33,4 ± 2,9	47,9 ± 1,6	61,3 ± 8,8
Vinorelbin ^b	0,03 ± 0,0	n.t.	4,0 ± 0,3

^a Každé měření bylo opakováno třikrát

^b Referenční látka

n.t. Nezměřeno

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Vlivem vývoje vědy a techniky, včetně oblasti medicíny a zdravotnické péče, dochází ke zvyšování životní úrovně lidí, a tím také k prodlužování délky života. Toto zároveň přispívá k vyššímu riziku rozvoje neurodegenerativních poruch, mezi které se řadí i Alzheimerova choroba. Každý rok je celosvětově diagnostikováno přibližně 4,6 milionů nových případů této nemoci¹⁰⁹, což s sebou nese enormní finanční náklady a AD se tak začíná stávat závažným problémem pro veřejné zdravotnictví⁹. Etiopatogeneze AD není do dnešního dne dostatečně objasněna, proto současná léčba řeší pouze symptomaticky deficit acetylcholinu zvýšením jeho dostupnosti inhibicí centrálních cholinesteras³⁷. U pacientů s AD není postižen pouze cholinergní systém. Dochází také ke katecholaminergní, glutamatergní a serotoninergní neurotransmitterové dysfunkci¹¹⁰. Přesto, kromě v praxi využívaného *N*-methyl-*D*-aspartátového inhibitoru memantinu, jsou hlavní využívanou terapeutickou skupinou právě inhibitory AChE, konkrétně donepezil, galanthamin a rivastigmin⁵.

V souvislosti s uvedením galanthaminu na farmaceutický trh se zvýšil zájem o obsahové látky rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich strukturně jedinečné sekundární metabolity, amarylkovité alkaloidy⁶. Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou známé svým širokým spektrem biologických účinků. Současný výzkum se zaměřuje hlavně na využití amarylkovitých alkaloidů v léčbě nádorových onemocnění, především díky jejich velké selektivitě k nádorovým buňkám. Nadále je v souvislosti s AD věnována pozornost inhibiční aktivitě vůči lidským cholinesterasám a dalším potenciálním cílům využitelným v terapii této choroby (POP, GSK-3 β)¹⁰⁴.

Na základě screeningové studie cholinesterasové aktivity alkaloidních extraktů rostlin čeledi Amaryllidaceae^{13,92,99} byl pro detailní fytochemickou studii vybrán druh *Nerine bowdenii*. Cílem této rigorózní práce bylo izolovat alespoň dva alkaloidy v čistém stavu z přidělených frakcí alkaloidního extraktu připraveného z čerstvých cibulí této rostliny. Pomocí preparativní TLC za využití různých mobilních fází byly izolovány tři látky, které byly na základě spektroskopických metod (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnáním dat s literaturou identifikovány jako undulatin, buphanidrin a 1-*O*-acetylbulbisin, alkaloidy krininového strukturního typu^{107,108}. Vzorky těchto alkaloidů byly podrobeny testům biologických aktivit. Měřena byla inhibiční účinnost vůči lidské erytrocytární AChE a sérové BuChE, ve spolupráci s Centrem pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové Univerzity obrany v Brně dále inhibiční aktivita vůči POP. Undulatin a

1-*O*-acetylbulbisin byly ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze podrobeny testu na cytotoxicitu u dvou p53-mutovaných lidských buněčných linií kolorektálního karcinomu tlustého střeva (Caco-2, HT-29). K ověření celkové toxicity ke zdravým buňkám byly použity normální buňky tenkého střeva (FHS-74int).

Undulatin, izolovaný z *Nerine bowdenii* již v roce 1956¹¹¹, patří mezi nejčastěji se vyskytující alkaloidy krininového typu. Jeho obsah je popsán v mnoha rostlinných rodech a druzích, např. v *Brunsvigia josephinae*¹⁰⁷, *Crinum latifolium*¹¹² nebo *Amaryllis belladonna*⁸². V testu inhibiční aktivity vůči lidské erytrocytární AChE působil ze získaných alkaloidů nejúčinněji s hodnotou IC_{50} $23,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Vůči lidské sérové BuChE byl neaktivní ($IC_{50} > 1000 \mu\text{M}$). Mírný inhibiční efekt vykázal také vůči POP s IC_{50} $1,97 \pm 0,12 \text{ mM}$. Jako významný inhibitor AChE působil undulatin ve studii z roku 2015¹¹³, kdy vykázal hodnotu IC_{50} $7,4 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Pro tuto studii byl izolován z rostliny *Chlidanthus fragrans* a jako zdroj AChE byl použit komerčně dostupný enzym získaný z elektrického úhoře, proto nejsou data s námi získaným výsledkem zcela porovnatelná. Uvedená studie dále popsala, že undulatin působí mechanismem smíšené inhibice enzymu a že je schopen pronikat přes HEB pasivní difúzí. Hodnotu IC_{50} získanou v roce 2015 ovšem nepotvrdila ani studie z roku 2020¹¹⁴, která naměřila hodnotu IC_{50} $33,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Použitá AChE byla rovněž z elektrického úhoře, undulatin byl izolován z *Amaryllis belladonna*.

Buphanidrin byl poprvé izolován z *Boophone fischerii* v roce 1955¹¹⁵ a představuje hlavní alkaloid obsažený v *Boophone disticha*¹¹⁶. Jeho přítomnost byla popsána mj. také v *Brunsvigia josephinae*¹⁰⁷ a *Amaryllis belladonna*¹¹⁴ společně s undulatinem. V našem měření inhibiční cholinesterasové aktivity vykázal buphanidrin vůči HuAChE mírný účinek s IC_{50} $72,6 \pm 8,2 \mu\text{M}$, vůči HuBuChE byl neaktivní. Výše uvedená studie z roku 2020¹¹⁴ uvádí při použití AChE z elektrického úhoře hodnotu IC_{50} $52,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Z alkaloidů izolovaných v rámci rigorózní práce působil buphanidrin nejlépe vůči POP s IC_{50} $0,37 \pm 0,04 \text{ mM}$, což je výsledek blízký použitému standardu berberinu ($IC_{50} = 0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$). POP je cytosolová serinová peptidasa, která má vliv na kognitivní funkce a její inhibice tak může představovat důležitou podpůrnou léčbu v terapii AD^{15,66}.

1-*O*-Acetylbulbisin je v rostlinách čeledi Amaryllidaceae málo zastoupeným alkaloidem. Poprvé byl identifikován v roce 2011 z *Crinum asiaticum* var. *sinicum*¹⁰⁸. V našich testech projevil mírné inhibiční účinky vůči HuAChE ($IC_{50} = 84,8 \pm 11,0 \mu\text{M}$), HuBuChE ($IC_{50} = 481,7 \pm 84,1 \mu\text{M}$) i POP ($IC_{50} = 2,45 \pm 0,21 \text{ mM}$). Při měření cytotoxické účinnosti působil 1-*O*-acetylbulbisin lépe než undulatin, přesto můžeme obě látky

v porovnání se standardem vinorelbinem označit za cytotoxicky neaktivní ($IC_{50} > 10 \mu M$). Tento výsledek je v souladu s tvrzením, že alkaloidy obsahující ve své struktuře β -C2 5,10b-ethanový můstek cytotoxické účinky nevykazují¹⁸.

Závěrem lze konstatovat, že rostliny čeledi Amaryllidaceae, včetně druhu *Nerine bowdenii*, stejně jako samotné alkaloidy specifické pro tuto čeleď a jejich deriváty zůstávají i nadále významným zdrojem látek potenciálně využitelných v terapii různých chorob.

7. LITERATURA

1. Park S. Y.: Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch. Pharmac. Res.*, **2010**, *33*, 1589-1609.
2. Cahlíková L.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva, Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2015**.
3. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. prax.*, **2008**, *4*, 224-227.
4. Atack J. R., Perry E. K., Bonham J. R., et al.: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.*, **1986**, *47*, 263-277.
5. Jiráček J.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farm. Farmac.*, **2004**, *18*, 212-214.
6. Jin Z., Yao G.: Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2019**, *36*, 1318-1343.
7. <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/> staženo 3.9.2020
8. Lleó A.: Current therapeutic options for Alzheimer's disease. *Curr. Genom.*, **2007**, *8*, 550-558.
9. Al Mamun A., Maříková J., Hulcová D., et al.: Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules*, **2020**, *10*, 800.
10. Nair J. J., Bastida J., Valadomat F., Staden J. V.: Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat. Prod. Commun.*, **2012**, *7*, 1667-1688.
11. Li Y., Liu J., Tang L.-J., et al.: Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncol. Rep.*, **2007**, *17*, 377-384.
12. Havelek R., Seifertová M., Královec K., et al.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cell. *Phytomedicine*, **2014**, *21*, 479-490.
13. Cahlíková L., Zavadil S., Macáková K., et al.: Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Comm.*, **2011**, *6*, 1827-1830.
14. Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., et al.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 80114-80120.
15. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., et al.: Alkaloids from *Chlidanthus*

- fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat. Prod. Comm.*, **2013**, *8*, 1541-1544.
16. Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, **2019**, *165*, 112055.
 17. Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., et al.: Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules*, **2018**, *23*, 719.
 18. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., et al.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochem. Lett.*, **2015**, *13*, 394-398.
 19. Nair J. J., van Staden J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *62*, 262-275.
 20. Jin Z.: Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 1126-1146.
 21. Dalecká M., Havelek R., Královec K., et al.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy*, **2013**, *107*, 701-708.
 22. Nagakawa Y., Uyeo S., Yajima H.: The double bond in lycorine. *Chem. Ind.*, **1956**, 1238-1239.
 23. Kilgore M. B., Kutchan T. M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochem. Rev.*, **2016**, *15*, 317-337.
 24. Wildman W. C., Battersby A. R., Breuer S. W.: Biosynthesis in the Amaryllidaceae. Incorporation of 3-C¹⁴-tyrosine and phenylalanine in *Nerine bowdenii* W.Wats. *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 4599-4600.
 25. Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., et al.: The Genus *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae): Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules*, **2019**, *24*, 4238.
 26. Berkov S., Pavlov A., Georgiev V., et al.: Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Pancreatium maritimum*. *Plant Physiol. Bioch.*, **2010**, *48*, 827-835.
 27. Unver N.: New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochem. Rev.*, **2007**, *6*, 125-135.
 28. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., et al.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activities. *Arch. Pharm. Res.*, **2018**, *41*, 208-218.
 29. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., et al.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Nat. Prod.*

- Comm.*, **2011**, *6*, 603-606.
30. Jin Z.: Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 886-905.
 31. Cahlíková L., Kawano I., Řezáčová M., et al.: The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochem. Rev.*, **2020**, v tisku.
<https://doi.org/10.1007/s11101-020-09675-8>
 32. Marešová P., Klímová B., Novotný M., Kuča K.: Alzheimer's and Parkinson's diseases: expected economic impact on Europe – a call for a uniform european strategy. *J. Alzheimer's Dis.*, **2016**, *54*, 1123-1133.
 33. Selkoe D. J.: The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.*, **1998**, *8*, 447-453.
 34. Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada Publishing, Praha, **1998**, 229 s.
 35. Plattner F., Angelo M., Giese K.P.: The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 25457-25465.
 36. Jiráček R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Psych. prax.*, **2002**, *2*, 55-58.
 37. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P., et al.: Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 41141-41147.
 38. Ballard C. G., Greig N. H., Guillozet-Bongaarts A. L., et al.: Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **2005**, *2*, 307-318.
 39. Loizo M. R., Tundis R., Menichini F., Menichini Fr.: Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 1209-1228.
 40. Sauvaitre T., Barlier M., Herlem D., et al.: New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 5311-5323.
 41. Lleó A., Greenberg S. M., Growdon J. H.: Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.*, **2006**, *57*, 513-533.
 42. Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., et al.: Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.*, **2010**, *9*, 702-716.
 43. Davis K. L., Powchick P.: Tacrin. *Lancet*, **1995**, *345*, 625-630.
 44. Yamada K., Nabeshima T.: Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of

- anti-dementia drugs. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *88*, 93-113.
45. Van Dam D., De Deyn P. P.: Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, *164*, 1285-1300.
 46. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* species. *Life Sci.*, **2002**, *71*, 2521-2529.
 47. Bores G. M., Kosley R. W.: Galanthamine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Future*, **1996**, *21*, 621-635.
 48. Lilienfeld S.: Galanthamine – a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.*, **2002**, *8*, 159-176.
 49. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. prax.*, **2007**, *2*, 112-117.
 50. Marco L., do Carmo Carreiras M.: Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, **2006**, *1*, 105-111.
 51. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Voj. Zdrav. Listy*, **2003**, *72*, 37-44.
 52. Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: *N*-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2263-2266.
 53. Bores G. M., Huger F. P., Petko W., et al.: Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1996**, *2772*, 728-738.
 54. Reyes-Chilpa R., Berkov S., Hernández-Ortega S., et al.: Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, **2011**, *16*, 9520-9533.
 55. Elgorashi E. E., Stafford G. I., van Staden J.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.*, **2004**, *70*, 260-262.
 56. Nair J. J., Aremu A. O., van Staden J.: Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2011**, *137*, 1102-1106.
 57. McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., et al.: Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 5290-5294.
 58. Rhee I. K., et al.: Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from

- Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, *27*, 1804-1809.
59. Sarikaya B. B., et al.: Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochem. Lett.*, **2012**, *5*, 367-370.
60. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., et al.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chem. Biodiv.*, **2013**, *10*, 1120-1127.
61. Greig N. H., Utsuki T., Yu Q., et al.: A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2001**, *17*, 159-165.
62. Maříková J., Ritomská A., Korábečný J., et al.: Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *J. Nat. Prod.*, **2020**, *83*, 1359-1367.
63. Peřinová R., Maafi R., Korábečný J., et al.: Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemathamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, **2020**, *100*, 103928.
64. Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* cv. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *S. Afr. J. Bot.*, **2020**, v tisku.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.024>
65. Puttonen K. A., Lehtonen S., Raasmaja A., Männöstö P. T.: A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Tox. Vitro*, **2006**, *20*, 1446-1454.
66. Toide K., Shinoda M., Fujiwara T., Iwamoto Y.: Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1997**, *56*, 427-434.
67. Šafratová M., Novák Z., Kulhánková A., et al.: Revised NMR data for 9-O-demethylgalanthine: An Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Nat. Prod. Comm.*, **2014**, *9*, 787-788.
68. Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., et al.: Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Nat. Prod. Comm.*, **2014**, *9*, 1151-1155.
69. Mellor H. R., Callaghan R.: Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and

- integrated cellular response. *Pharmacology*, **2008**, *8*, 275-300.
70. Evidente A., Kireev A. S., Jenkins A. R., et al.: Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: Discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Med.*, **2009**, *75*, 501-507.
 71. Van Goietsenoven G. V., Andolfi A., Lallemand B., et al.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1223-1227.
 72. Nair J. J., van Staden J.: Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Nat. Prod. Comm.*, **2014**, *9*, 1193-1210.
 73. He M., Qu C., Gao O., et al.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 16562-16574.
 74. Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., et al.: The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **2007**, *9*, 766-776.
 75. Ma D., Tremblay P., Mahngar K., et al.: Selective cytotoxicity against human osteosarcoma cells by a novel synthetic C-1 analogue of 7-deoxypancratistatine is potentiated by curcumin. *Plos One*, **2011**, *6*, 1-14.
 76. Griffin C., Karnik A., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.*, **2011**, *10*, 57-68.
 77. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **2011**, *38*, 1549-1556.
 78. Nkanwen E. R. S., Gatsing D., Ngamga D., et al.: Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (Amaryllidaceae). *Afr. Health Sci.*, **2009**, *9*, 264-269.
 79. Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., et al.: (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochem.*, **2004**, *65*, 2113-2118.
 80. Fendrich Z.: Malárie a její léčba. *Klin. Farmakol. Farm.*, **2005**, *19*, 89-94.
 81. Campbell W. E., Nair J. J., Gammon D. W., et al.: The anti-inflammatory and antibacterial activities of Amaryllidaceae alkaloid. *Planta Med.*, **1998**, *64*, 91-93.
 82. Tallini L. R., de Andrade J. P., Kaiser M., et al.: Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules*, **2017**, *22*, 1437-1448.
 83. Snijman D. A., Linder H. P.: Phylogenetic relationships, seeds characters, and dispersal system evolution in Amaryllideae (Amaryllidaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1996**, *83*,

- 362-386.
84. Zonneveld B. J. M., Duncan G. D.: Genome size for the species of *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae) and its evident correlation with growth cycle, leaf width and other morphological characters. *Pl. Syst. Evol.*, **2006**, 257, 251-260.
 85. Nair J. J., Campbell W. E., Brun R., et al.: Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochem.*, **2005**, 66, 373-382.
 86. <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id206652/> staženo 21.8.2020
 87. Duncan G.: The genus *Nerine*. *Bulbs*, **2002**, 1, 9-14.
 88. <https://botany.cz/cs/nerine-bowdenii/> staženo 21.8.2020
 89. Van Rijn R. M., Rhee I. K., Verpoorte R.: Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Res.*, **2010**, 24, 222-225.
 90. Lyle R. E., Kielar E. A., Crowder J. R., Wildman W. C.: Alkaloids of Amaryllidaceae. XV. The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Wats. and *Crinum moorei* J. D. Hook. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 2620-2625.
 91. Slabaugh M. R., Wildman W. C.: 6-Hydroxybuphanidine and 6-hydroxypowelline. *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3202-3207.
 92. Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., et al.: Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Comm.*, **2012**, 7, 571-574.
 93. Tanahashi T., Poulev A., Zenk M. H.: Radioimmunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.*, **1990**, 56, 77-81.
 94. Dold T., Weeks D. C.: *Nerine huttoniae*: A rare endemic from the Fish River. *Veld and Flora*, **2000**, 86, 14-15.
 95. Molander M., Christensen S. B., Jäger A. K., et al.: 6-O-Methylkrigeine, a new Amaryllidaceae alkaloid from *Nerine huttoniae* Schönland. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, 26, 56-60.
 96. <https://www.rareplants.co.uk/product/nerine-filamentosa/> staženo 25.8.2020
 97. <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/NerineSpeciesThree> staženo 25.8.2020
 98. Boit H. G.: Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. Über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 1129-1134.
 99. Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., et al.: GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Comm.*, **2011**, 6, 1255-1258.

100. <http://pza.sanbi.org/nerine-sarniensis> staženo 25.8.2020
101. Masi M., Cala A., Tabanca N., et al.: Alkaloids with activity against Zika virus vector *Aedes aegypti* (L.) – Crisarnine and Sarniensinol, two new crinine and mesembrine type alkaloids isolated from the South African plant *Nerine sarniensis*. *Molecules*, **2016**, *21*, 1432.
102. Masi M., van der Westhuyzen A. E., Tabanca N., et al.: Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, **2017**, *116*, 34-38.
103. Stahl E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. 2. vyd., Springer Verlag, Berlin, 1969, 1041 s.
104. Vaněčková N.: Study of the inhibitory (toxic) effect of the alkaloids from chosen plants of Amaryllidaceae family on some human enzymatic systems (*in vitro* study) II, Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2018**.
105. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-95.
106. Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., et al.: Isoquinoline alkaloids as potential prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, **2015**, *103*, 192-196.
107. Viladomat F., Codina C., Bastida J., et al.: Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 961-965.
108. Chen C. K., Lin F. H., Tseng L. H., et al.: Comprehensive study of alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum* assisted by HPLC-DAD-SPE-NMR. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 411-419.
109. Nichols E., Szoeké C. E. I., Vollset S. E., et al.: Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.*, **2019**, *18*, 88-106.
110. Francis P. T., et al.: Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, **2010**, *59*, 221-229.
111. Boit H. G., Ehmke H.: Alkaloide von *Nerine bowdenii*, *Crinum powellii*, *Amaryllis belladonna* und *Pancratium maritimum* (XII. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chem. Ber.*, **1956**, *89*, 2093-2097.
112. Kobayashi S., Tokumoto T., Kihara M., et al.: Alkaloidal constituents of *Crinum latifolium* and *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, *32*,

3015.

113. Cahlíková L., Pérez D. I., Štěpánková Š.: *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 1189-1192.
114. Sibanyoni M. N., Chaudhary S. K., Chen W., et al.: Isolation, *in vitro* evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. *Fitoterapia*, **2020**, 146, 104650.
115. Renz J., Stauffacher D., Seebeck E.: Die Alkaloide von *Buphane Fischerei* Baker. *Helv. Chim. Acta*, **1955**, 38, 1209-1222.
116. Hauth H., Stauffacher D.: Die Alkaloide von *Buphane disticha* (L.f.) Herb. *Helv. Chim. Acta*, **1961**, 44, 491-502.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ADINACO	Alzheimer's Disease and Natural Compounds
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidový prekurzorový protein
BACE-1	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (β -sekretasa)
BuChE	butyrylcholinesterasa
CAT	cholinacetyltransferasa
CDK-5	cyklin-dependentní kinasa-5
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
GIT	gastrointestinální trakt
GS	plynová chromatografie
GSK-3 β	glykogen syntasa kinasa-3 β
HEB	hematoencefalická bariéra
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
IC	inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
POP	prolyl oligopeptidasa
Rf	retenční faktor
TLC	tenkovrstvá chromatografie

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: **Mgr. Lada Krejčová**

Konzultant: **prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Název rigorózní práce: **Alkaloidy *Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae) a jejich biologická aktivita**

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou známy svým širokým spektrem biologických účinků. Cytotoxická a inhibiční aktivita vůči cholinesterasám patří mezi nejvýznamnější z nich. Náplní rigorózní práce bylo pomocí preparativní TLC izolovat alespoň dva alkaloidy v čistém stavu z přidělených frakcí alkaloidního extraktu *Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae). K identifikaci chemických struktur byly využity spektroskopické metody (MS, NMR, optická otáčivost). Izolované látky byly identifikovány jako alkaloidy krininového strukturního typu undulatin, buphanidrin a 1-*O*-acetylbulbisin. Všechny alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám (AChE, BuChE) a prolyl oligopeptidase, undulatin a 1-*O*-acetylbulbisin také na cytotoxicitu.

Inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám byla stanovena pomocí modifikované Ellmanovy spektrofotometrické metody. Nejvyšší účinnost vůči HuAChE vykázal undulatin s hodnotou $IC_{50} 23,5 \pm 1,2 \mu M$, vůči HuBuChE působily alkaloidy prakticky neaktivně ($IC_{50} > 1000 \mu M$), pouze 1-*O*-acetylbulbisin vykázal slabou aktivitu s hodnotou $IC_{50} 481,7 \pm 84,1 \mu M$.

Inhibiční aktivita vůči POP byla naměřena pomocí spektrofotometrické metody za použití *Z*-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu jako substrátu. Nejvyšší inhibiční účinek projevil buphanidrin s hodnotou $IC_{50} 0,37 \pm 0,04 \text{ mM}$.

Na cytotoxicitu byly testovanými nádorovými buněčnými liniemi Caco-2, HT-29 a zdravá buněčná linie FHS-79int. Undulatin ani 1-*O*-acetylbulbisin nevykázaly významnou aktivitu ($IC_{50} > 10 \mu M$).

Klíčová slova: *Nerine bowdenii*, Amaryllidaceae, alkaloidy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyl oligopeptidasa, cytotoxicita, undulatin, buphanidrin, 1-*O*-acetylbulbisin.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: **Mgr. Lada Krejčová**

Consultant: **prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Title of Rigorous Thesis: **Alkaloids from *Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae) and their biological activity**

The Amaryllidaceae alkaloids are known for their wide spectrum of biological effects. Cytotoxic and inhibitory activity against cholinesterases belong to the most important of them. The aim of the rigorous thesis was the isolation of at least two pure alkaloids from assigned fractions of alkaloidal extract prepared from *Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae). Spectroscopic methods (MS, NMR, optical rotation) were used for the identification of the chemical structures. The isolated substances were identified as alkaloids of crinine structural type undulatine, buphanidrine and 1-*O*-acetylbulbisine. All of these alkaloids were tested for the inhibitory activity against cholinesterases (AChE, BuChE) and prolyl oligopeptidase, undulatine and 1-*O*-acetylbulbisine for the cytotoxicity in addition.

The inhibitory activity against human cholinesterases was determined by a modified Ellman's spectrophotometric method. Undulatine was the most potent inhibitor of HuAChE with value of $IC_{50} 23,5 \pm 1,2 \mu M$, against HuBuChE the alkaloids were practically inactive ($IC_{50} > 1000 \mu M$), only 1-*O*-acetylbulbisine showed weak activity with value of $IC_{50} 481,7 \pm 84,1 \mu M$.

The POP inhibition activity was measured by a spectrophotometric method with Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilide as a substrate. Buphanidrine was the most potent with value of $IC_{50} 0,37 \pm 0,04 mM$.

Cancer cell lines Caco-2, HT-29 and healthy cell line FHS-79int were tested for the cytotoxicity. Undulatine nor 1-*O*-acetylbulbisine demonstrated significant activity ($IC_{50} > 10 \mu M$).

Keywords: *Nerine bowdenii*, Amaryllidaceae, alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, cytotoxicity, undulatine, buphanidrine, 1-*O*-acetylbulbisine.