

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů jako látky potenciálně využitelné v terapii
nádorových onemocnění

Derivatives of Amaryllidaceae alkaloids as potential drugs in the treatment
of tumor diseases

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

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

Hradec Králové, květen 2020

Iva Valachová

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

Tímto bych ráda poděkovala především PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za ochotu a vstřícnost při zpracování této diplomové práce, odborné vedení, poskytnuté materiály a stanovení inhibiční aktivity derivátů vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Dále bych velmi ráda poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné rady týkající se přípravy derivátů, Mgr. Elišce Kohelové a Ing. Rozálii Peřinové za pomoc při přípravě hydrochloridů derivátů vittatinu, doc. PharmDr. Jiřímu Kuneši, CSc. a Mgr. Janě Maříkové za změření a interpretaci NMR spekter, prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření ESI-HRMS spekter, RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. za stanovení cytotoxické aktivity a Katedře toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany, za molekulové dokování. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem dalším pracovníkům z Katedry farmakognozie a Katedry farmaceutické botaniky za milý přístup a příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1. Obecná charakteristika čeledi Amaryllidaceae	11
3.1.1. Rostliny čeledi Amaryllidaceae.....	11
3.1.2. Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae.....	12
3.1.3. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů	12
3.1.4. Strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů, jejich biologická aktivita	14
3.1.4.1. Lykorinový strukturní typ.....	15
3.1.4.2. Homolykorinový strukturní typ	16
3.1.4.3. Galanthaminový strukturní typ.....	17
3.1.4.4. Krininový a haemanthaminový strukturní typ.....	18
3.1.4.5. Pankratistatinový strukturní typ	19
3.1.4.6. Tazettinový strukturní typ	19
3.1.4.7. Montaninový strukturní typ.....	20
3.1.4.8. Belladinový strukturní typ.....	21
3.1.5. Terapeutické využití Amaryllidaceae alkaloidů	21
3.1.5.1. Nádorová onemocnění.....	21
3.1.5.2. Alzheimerova choroba	23
3.2. Charakteristika alkaloidu vittatinu	24
3.2.1. Struktura vittatinu, chemické a fyzikální vlastnosti	24
3.2.2. Biosyntéza vittatinu.....	25
3.2.3. Izolace vittatinu	26
3.2.4. Biologická aktivita vittatinu	28
3.2.4.1. Protinádorová aktivita.....	28
3.2.4.2. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE	30
3.2.4.3. Další významné biologické aktivity vittatinu	31
3.3. Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a jejich biologická aktivita.....	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1. Použitý materiál, chemikálie	37
4.1.1. Rostlinný materiál	37
4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla	38
4.1.3. Stacionární fáze pro analytickou a preparativní TLC.....	39

4.1.4.	Mobilní fáze pro analytickou a preparativní TLC	39
4.2.	Metody	39
4.2.1.	Metody použité při přípravě derivátů	39
4.2.1.1.	Příprava polosyntetických derivátů	39
4.2.1.2.	Analytická tenkovrstvá chromatografie	40
4.2.1.3.	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	41
4.2.1.4.	Eluce a odpařování	41
4.2.1.5.	Vysoušení připravených derivátů a jejich skladování	42
4.2.2.	Příprava chloridů alkaloidů	42
4.2.2.1.	Příprava bezvodého roztoku HCl v Et ₂ O	42
4.2.2.2.	Příprava chloridů	42
4.2.3.	Strukturní analýza derivátů vittatinu	42
4.2.3.1.	ESI-HRMS analýza	42
4.2.3.2.	NMR analýza	43
4.2.3.3.	Optická otáčivost	43
4.2.4.	Měření biologických aktivit derivátů vittatinu	44
4.2.4.1.	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	44
4.2.4.2.	Zkouška paralelního pronikání přes umělou membránu (PAMPA)	45
4.2.4.3.	Stanovení inhibice agregace β -amyloidu	46
4.2.4.4.	Stanovení protinádorové aktivity	46
4.2.5.	Molekulové dokování	46
5.	VÝSLEDKY	48
5.1.	Připravené deriváty vittatinu, jejich strukturní analýza	48
5.1.1.	3-O-(4-Methylbenzoyl)vittatin (VIT1)	48
5.1.2.	3-O-(2-Methylbenzoyl)vittatin (VIT2)	49
5.1.3.	3-O-(3-Methylbenzoyl)vittatin (VIT3)	50
5.1.4.	3-O-(2-Methoxybenzoyl)vittatin (VIT4)	51
5.1.5.	3-O-(3-Methoxybenzoyl)vittatin (VIT5)	52
5.1.6.	3-O-(2-Chlorobenzoyl)vittatin (VIT6)	53
5.1.7.	3-O-(3-Nitrobenzoyl)vittatin (VIT7)	54
5.1.8.	3-O-(4-Nitrobenzoyl)vittatin (VIT8)	55
5.1.9.	3-O-(4-Chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT9)	56
5.1.10.	3-O-(4-Methyl-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT10)	57
5.1.11.	3-O-(1-Naphthoyl)vittatin (VIT11)	58
5.1.12.	3-O-(2-Naphthoyl)vittatin (VIT12)	59

5.2.	Výtěžnost reakcí	60
5.3.	Biologická aktivita derivátů vittatinu	61
5.3.1.	Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE	61
5.3.2.	Schopnost prostupu přes HEB	61
5.3.3.	Inhibice agregace β -amyloidu	62
5.3.4.	Protinádorová aktivita	62
5.4.	Molekulové dokování	64
6.	DISKUZE A ZÁVĚR	66
7.	POUŽITÁ LITERATURA	71
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
9.	SEZNAM TABULEK	80
10.	ABSTRAKT	81
11.	ABSTRACT	83

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
Al ₂ O ₃	Oxid hlinitý
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CDCl ₃	Deuterovaný chloroform
ChAT	Cholinacetyltransferasa
CHCl ₃	Chloroform
cHx	Cyklohexan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
Et ₂ NH	Diethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
ESI-HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
GAL	Galanthamin
HEB	Hematoencefalická bariéra
HCl	Chlorovodík
HDAC2	Histon deacetylasa 2
MeCN	Acetonitril
N4OMT	Norbelladin 4'-O-methyltransferasa
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAMPA	Zkouška paralelního pronikání přes umělou membránu
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
To	Toluen
WHO	Světová zdravotnická organizace

1. ÚVOD

Již od nepaměti jsou rostliny nedílnou součástí léčby nemocí. Zatímco zpočátku bylo jejich používání kvůli nedostatečnému množství informací spíše instinktivní a založené na zkušenostech, s postupem času a detailnějším poznáním lidského těla i rostlin byly objeveny důvody pro použití specifických rostlin k léčbě konkrétních onemocnění¹. Mezi další významná zjištění patřilo také tvrzení, že nositelem léčivého účinku nejsou rostliny samotné, ale látky, které obsahují.

Významnou skupinu látek se specifickými farmakologickými účinky představují alkaloidy. Jedním z nejstarších písemných důkazů o použití těchto látek k léčebným účelům je sumerská hliněná destička nalezená v oblasti indického města Nagpur, jejíž stáří je odhadováno na 5000 let. Obsahuje seznam 12 receptur pro přípravu léčiv a odkazuje přibližně na 250 léčivých rostlin včetně alkaloidních, jako například mák, blín nebo mandragora¹. Alkaloidy se vyskytují hlavně ve vyšších rostlinách, ovšem byly nalezeny i v houbách (např. *Claviceps purpurea*) a některých kaprad'orostech, konkrétně v přesličkách (*Equisetum* spp.) a plavuních (*Lycopodium* spp.). Význam alkaloidů pro rostlinu dosud nebyl jednoznačně objasněn. Pro některé druhy by jejich prudce toxický účinek mohl být ochranným mechanismem proti parazitům či okusu býložravci, existuje ale mnohem větší množství rostlin, jejichž alkaloidy jim žádnou ochranu neposkytují. Toxicita určitých alkaloidů bývá selektivní, čehož se využívá v terapii různých onemocnění. Příkladem může být chinin, který už v nízkých dávkách působí toxicky na protozoa, pro člověka je ale prakticky netoxický. Ve farmakoterapii nachází uplatnění i mnoho dalších alkaloidů. Díky jejich rozmanité chemické struktuře se značně liší i jejich účinky, příkladem může být analgetické, antiarytmické, uterotonické, antiparazitické nebo chemoterapeutické působení².

Zejména cytotoxické působení je typické pro alkaloidy nacházející se v rostlinách čeledi Amaryllidaceae². Vzhledem k tomu, že nádorová onemocnění patří celosvětově mezi nejčastější příčiny úmrtí a je odhadováno, že v roce 2030 počet nových případů vzroste až na 23,6 milionů³, je cytotoxické působení Amaryllidaceae alkaloidů v současné době intenzivně studováno. K dalším významným účinkům těchto látek se řadí antimalarická aktivita⁴ nebo schopnost inhibovat acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE), čehož se využívá při léčbě Alzheimerovy choroby. Mezi inhibitory AChE patří i galanthamin, který má na rozdíl od ostatních inhibitorů AChE navíc schopnost alostericky modulovat presynaptické

i postsynaptické nikotinové receptory, a zvyšovat tak jejich citlivost k neuromediátoru acetylcholinu^{5,6}. V současnosti je to také jediný Amaryllidaceae alkaloid, který se v souvislosti s léčbou Alzheimerovy choroby již dostal do klinické praxe.

Hlavní náplní této diplomové práce byla příprava polosyntetických derivátů vittatinu, Amaryllidaceae alkaloidu haemanthaminového strukturního typu. Samotný vittatin prozatím prokázal antibakteriální^{7,8,9}, antimykotickou⁷, cytotoxickou⁸ a antimalarickou¹⁰ aktivitu, bohužel inhibiční aktivita vůči AChE u něj byla stanovena pouze velmi slabá a vůči BuChE je zcela neaktivní¹¹. Nicméně, po předchozích zkušenostech, kdy deriváty připravené z různých alkaloidů častokrát vykazovaly mnohonásobně vyšší účinnost než výchozí látky^{12,13}, byla obměnou struktury vittatinu připravena analoga, u kterých byla následně testována jejich biologická aktivita včetně inhibičního potenciálu vůči cholinesterasám.

2. CÍL PRÁCE

Náplní této diplomové práce byla příprava polosyntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu, jejich strukturní identifikace a zhodnocení biologických aktivit z hlediska potenciálního využití v léčbě nádorových onemocnění nebo Alzheimerovy choroby.

Mezi jednotlivé dílčí cíle spadaly tyto úkoly:

1. Rešerše literatury na téma biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů a přípravy jejich derivátů.
2. Příprava různých typů derivátů odvozených od Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu.
3. Příprava derivátů pro screening biologických aktivit.
4. Vyhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Obecná charakteristika čeledi Amaryllidaceae

3.1.1. Rostliny čeledi Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae představuje velmi rozmanitou a poměrně rozsáhlou skupinu rostlin, které jsou rozšířené po celém světě¹⁴. V současnosti zahrnuje okolo 85 rodů, 1100 druhů a patří mezi 20 nejdůležitějších rostlinných čeledí obsahujících alkaloidy¹⁵. Mezi oblasti s největším výskytem patří zejména tropické a subtropické oblasti s teplým klimatem jako Jižní Amerika a Afrika, odkud tato čeleď pravděpodobně pochází, nyní je ale můžeme nalézt i v oblastech s mírnějším podnebím, například ve střední nebo jižní Evropě kolem Středozemního moře. Z hlediska přírodních podmínek se Amaryllidaceae rostliny mohou vyskytovat na různých stanovištích. Příkladem mohou být deštné pralesy, řeky, ale i vysychavá jezírka a sezónně suchá místa^{16,17,18}.

Mezi zástupce, kteří se nachází v České republice, patří sněženka podsněžník (*Galanthus nivalis*), bledule letní (*Leucojum aestivum*), bledule jarní (*Leucojum vernum*), narcis bílý (*Narcissus poeticus*) a narcis žlutý (*Narcissus pseudonarcissus*)¹⁹.



Obrázek 1: *Galanthus nivalis*²⁰, *Leucojum aestivum*²¹ a *Narcissus pseudonarcissus*²²

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou vytrvalé byliny mající podzemní cibule, oddenky, případně cibulové hlízy. Typické jsou pro ně oboupohlavné květy, které jsou buď jednotlivé, nebo uspořádané do šroubelovitých či hroznovitých květenství. Listy jsou přízemní, výjimečně i lodyžní, úzké a zpravidla s čárkovitou čepelí. Nejčastějším plodem bývá tobolka nebo bobule^{18,23}.

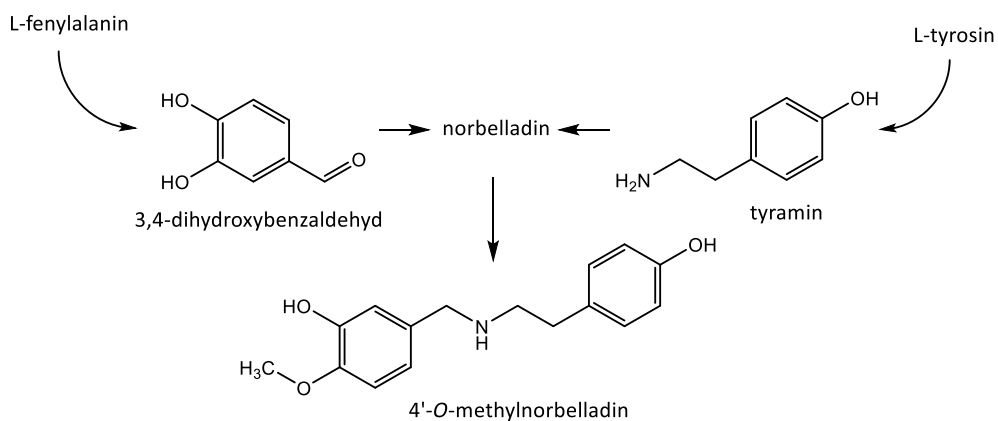
3.1.2. Obsahové látky čeledi Amaryllidaceae

V současnosti jsou rostliny čeledi Amaryllidaceae čím dál častějším předmětem zkoumání díky biologické aktivitě amaryllkovitých alkaloidů, což jsou sekundární metabolity rostlin vyskytující se téměř výhradně v této čeledi. Co se týká struktury těchto látek, typickým společným znakem je pro ně tetracyklické uspořádání, zpravidla se šestičlenným nebo pětičlenným cyklem obsahujícím atom dusíku. Od roku 1877, kdy byl izolován první z těchto alkaloidů, lykorin, se podařilo izolovat více než 500 různých Amaryllidaceae alkaloidů^{24,25}.

Pravděpodobně nejstarší důkaz o využití Amaryllidaceae alkaloidů k terapeutickým účelům pochází z doby 4. století př. n. l., kdy byl Hippokratem z Kósu používán olejový extrakt z *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy^{24,26}. Kromě protinádorového působení bylo postupem času prokázáno množství dalších rozmanitých biologických aktivit těchto sloučenin. Je to zejména antibakteriální, antivirové a antitumorigenní působení, dále například analgetické a antimalarické účinky a v neposlední řadě inhibiční potenciál vůči cholinesterasám²⁷.

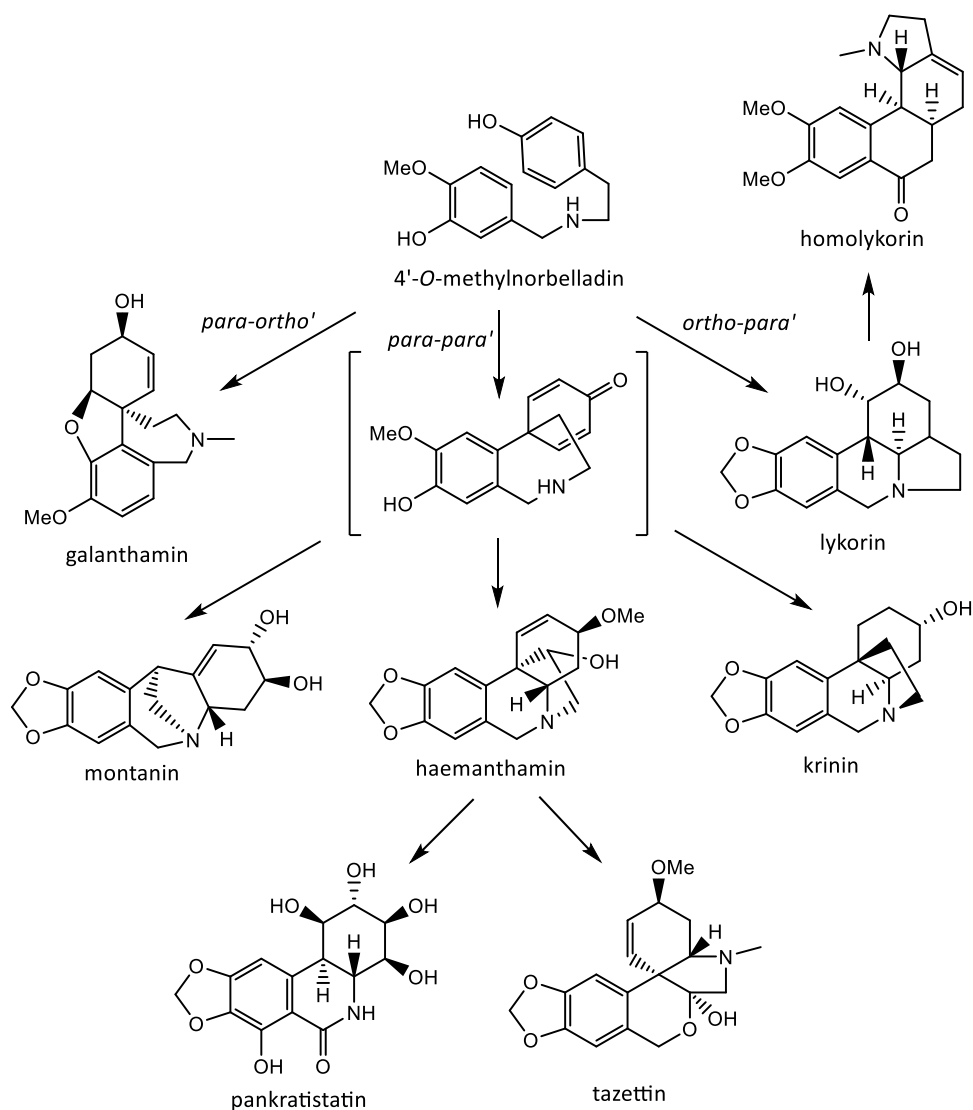
3.1.3. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů

Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů vychází z aromatických aminokyselin, a to konkrétně z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. V první fázi dochází pomocí enzymu fenylalanin amoniom lyázy k přeměně fenylalaninu na kyselinu skořicovou a amoniak, zatímco tyrosin je tyrosin-dekarboxylázou dekarboxylován na tyramin. Kyselina skořicová se dále rozkládá na aldehyd kyseliny protokatechové (3,4-dihydroxybenzaldehyd) a reaguje s tyraminem za vzniku Schiffovy baze. Ta je redukována na norbelladin a následuje methylace pomocí enzymu norbelladin 4'-O-methyltransferasa (N4OMT) na 4'-O-methylnorbelladin, který je prekurzorem pro biosyntézu všech Amaryllidaceae alkaloidů (Obrázek 2)^{10,28,29}.



Obrázek 2: Schéma biosyntézy *O*-methylnorbelladinu, prekursoru Amaryllidaceae alkaloidů²⁸

Následují 3 alternativní cesty oxidativního intramolekulárního spojení, která jsou podle poloh jednotlivých spojů ve struktuře označována jako *ortho-para'*, *para-ortho'* a *para-para'*. Výsledkem *ortho-para'* spojení jsou Amaryllidaceae alkaloidy lykorinového a homolykorinového strukturního typu, *para-ortho'* intramolekulární spojení umožňuje vznik alkaloidů galanthaminového strukturního typu a navázáním v polohách *para-para'* se tvoří alkaloidy haemanthaminového, pankratistatinového, tazettinového, krininového a montaninového typu (Obrázek 3)^{10,28,30,31}.



Obrázek 3: Schéma biosyntézy základních struktur Amaryllidaceae alkaloidů^{15,30}

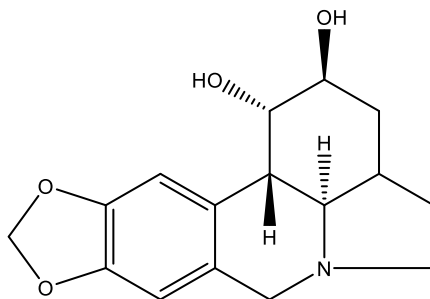
3.1.4. Strukturální typy Amaryllidaceae alkaloidů, jejich biologická aktivita

Podle struktur řadíme jednotlivé Amaryllidaceae alkaloidy celkem do 9 základních skupin, které jsou pojmenovány dle konkrétních strukturálních typů. Mezi základní strukturální typy patří galanthaminový, haemanthaminový, pankratistatinový, tazettinový, krininový, lykorinový, homolykorinový, *O*-methylbelladinový a montaninový³⁰. Mezi méně časté strukturální typy Amaryllidaceae alkaloidů pak patří například glasilinový, plikaminový, augustaminový, galanthindolový, karbolinový, mesembranový a další⁸.

Následující rozdělení se drží dříve zmíněných devíti strukturálních typů a jsou v něm zobrazeny struktury jejich základních zástupců, příklady dalších Amaryllidaceae alkaloidů patřících do stejné skupiny, rody, ve kterých je můžeme nalézt, a jejich využití z hlediska

biologické aktivity.

3.1.4.1. Lykorinový strukturní typ



Obrázek 4: Struktura lykorinu

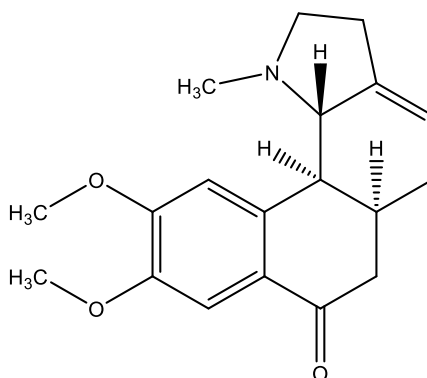
Nejstarším strukturním typem je typ lykorinový, a to díky lykorinu, prvnímu izolovanému Amaryllidaceae alkaloidu, který byl získán z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877^{7,30}.

Struktura tohoto typu vychází z pyrrolo[de]phenanthridinu a mezi další alkaloidy této skupiny můžeme zařadit pseudolykorin, galanthin, karantin, inkartin, amarbellisin, pluviin, norpluviin, *O*-acetylpluviin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin a lykorin-2-on^{30,32,33}.

Rody, ve kterých můžeme nalézt alkaloidy lykorinového strukturního typu, jsou *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Chlidanthus*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus* a *Zephyranthes*³⁴.

Co se týká biologické aktivity, lykorin má význačný antivirový účinek vůči mnoha virům, jako jsou poliovirus, vaccinia virus nebo SARS-asociovaný koronavirus. Dále má antiprotozoální účinek (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*) i antimykotický účinek (*Saccharomyces cerevisiae*)^{30,35}. Během studie Van Goietsenoven et al. (2010) bylo prokázáno, že lykorin má už v mikromolární koncentraci antiproliferativní potenciál vůči několika buněčným liniím rezistentním k apoptóze a že je minimálně 15× účinnější vůči nádorovým buňkám v porovnání se zdravými³⁶. Výhodou je zde tak selektivní působení na nádorové buňky a na poměrně rozmanité typy těchto buněk. Alkaloidy lykorinového strukturního typu jsou pravděpodobně nejvýznamnější skupinou Amaryllidaceae alkaloidů s cytotoxickým působením³⁰.

3.1.4.2. Homolykorinový strukturní typ



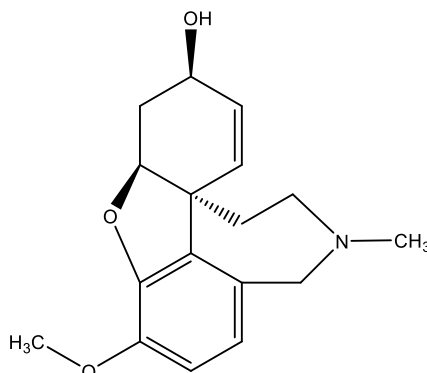
Obrázek 5: Struktura homolykorinu

Alkaloidy homolykorinového typu se vyskytují v rodech *Clivia*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Leucojum*, *Lycoris* a *Narcissus*³⁴.

Struktura těchto alkaloidů je odvozena od 2-benzopyrano[3,4-*g*]indolu a mezi další významné látky této skupiny kromě homolykorinu patří 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin³⁰.

Všechny uvedené sloučeniny vykazují cytotoxickou aktivitu, nevýhodou oproti lykorinovému typu ale je, že působí cytotoxicky i na nenádorové buňky. U některých alkaloidů této skupiny bylo pozorováno antivirové působení, homolykorin například vykazuje vysokou antiretrovirovou aktivitu a hippeastrin je aktivní vůči *Herpes simplex* typu 1. Dále byl prokázán antimykotický účinek hippeastrinu vůči *Candida albicans* a u homolykorinu a 8-*O*-dimethylhomolykorinu byl zjištěn hypotenzní účinek v rámci testování na normotenzních krysách. Poslední dvě uvedené sloučeniny byly také testovány na aktivitu vůči parazitickým prvokům *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* a *Plasmodium falciparum*, avšak nebyla prokázána žádná významná aktivita^{8,30}.

3.1.4.3. Galanthaminový strukturní typ



Obrázek 6: Struktura galanthaminu

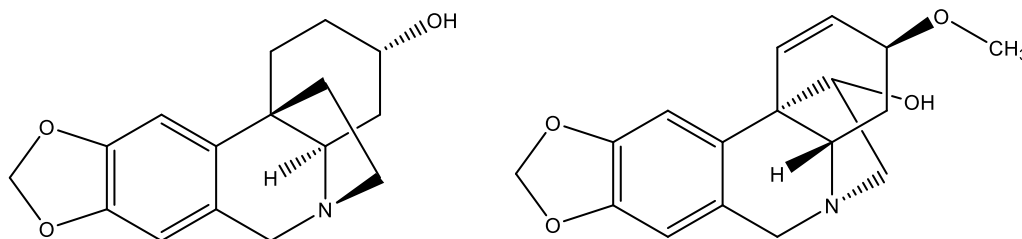
Kromě rodu *Galanthus* (konkrétně *Galanthus Woronovii*), ze kterého byl poprvé izolován galanthamin, nejdůležitější galanthaminový alkaloid, patří mezi rody obsahující alkaloidy této skupiny *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus* nebo *Zephyranthes*³⁴.

Základem struktury této skupiny alkaloidů je dibenzofuran a kromě galanthaminu mezi sloučeniny tohoto strukturního typu dále patří například sanguinin, chlidantin, narwedín, epinorgalanthamin, lykoramin, norlykoramin nebo lykoraminon^{8,30,32,33}.

Co se týká biologické aktivity galanthaminu, přestože absolutně postrádá protinádorové působení, je to jediný alkaloid, který již našel klinické uplatnění v léčbě Alzheimerovy choroby. Působí jako selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE, což je klíčový enzym v patogenezi tohoto onemocnění. Zároveň je také schopen modulovat nikotinový receptor pro acetylcholin, a tím zpomalit progresi této neurodegenerativní choroby^{8,30}.

Sanguinin je další sloučeninou této skupiny alkaloidů, která působí jako inhibitor AChE a která je dokonce 10× aktivnější v porovnání s galanthaminem. Příčinou této významné aktivity je pravděpodobně přítomnost hydroxyskupiny v poloze C-9 místo methoxyskupiny, která je přítomna ve struktuře galanthaminu. U lykoraminu naopak došlo ke kompletní ztrátě inhibiční aktivity vůči AChE, a to kvůli hydrogenaci dvojné vazby v poloze C-4, která je jedinou odlišností v porovnání se strukturou galanthaminu⁸.

3.1.4.4. Krininový a haemanthaminový strukturní typ



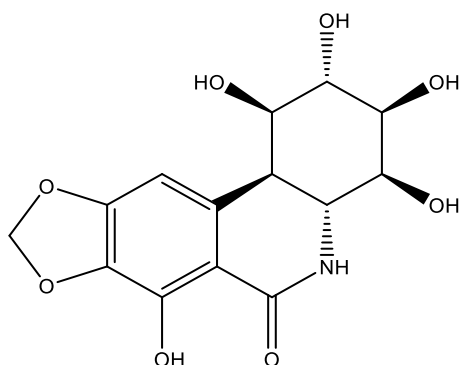
Obrázek 7: Struktura krininu a haemanthaminu

Ammocharis, *Brunsvigia*, *Clivia*, *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Eucharis*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Nerine* a *Zephyranthes* jsou rody obsahující alkaloidy krininového a haemanthaminového strukturního typu³⁴.

Struktura je odvozena od ethanophenanthridinu. Rovněž látky krininového a haemanthaminového strukturního typu vykazují protinádorové působení. Nejúčinnější z nich jsou haemanthamin, haemanthidin, krinamin a vittatin³⁰. Studie z roku 2017 Havelk et al. dokazuje, že haemanthamin a haemanthidin jsou látky schopné inhibovat proliferaci 16 lidských nádorových buněčných linií už v mikromolárních koncentracích. Na základě výsledků byl haemanthamin následně podroben i testování *in vivo* na myších s Erlichovým tumorem, bohužel ale nebyl pozorován žádný výrazný vliv na progresi tohoto nádoru, ani na dobu přežití těchto myší v porovnání s negativními kontrolními skupinami. Jedním z možných vysvětlení zde může být rychlá eliminace haemanthaminu z organismu³⁷.

Dále tyto látky vykazují i antimalarickou aktivitu vůči *Plasmodium falciparum*. Haemanthamin má také hypotenzní a antiretrovirovou aktivitu, zatímco pro haemanthidin jsou typické antiparazitické, analgetické a antiflogistické účinky, a to dokonce s vyšším potenciálem, než má kyselina acetylsalicylová^{8,30,35}. Podrobnosti ohledně biologické aktivity vittatinu jsou uvedeny v dalších kapitolách této práce.

3.1.4.5. Pankratistatinový strukturní typ

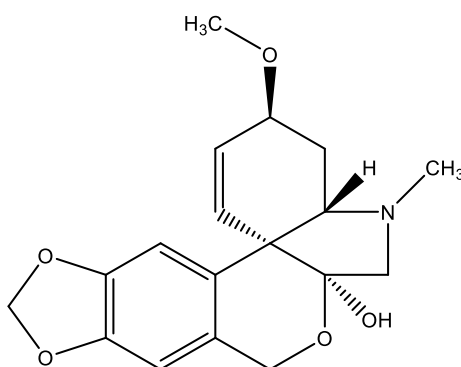


Obrázek 8: Struktura pankratistatinu

Pankratistatin a narciklasin jsou nejvýznamnější alkaloidy této skupiny a včetně dalších alkaloidů pankratistatinového typu jsou zastoupeny v rodech *Boophane*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Narcissus*, *Pancratium* a *Zephyranthes*³⁴.

Struktura těchto alkaloidů vychází z molekuly phenanthridinu. Co se týká biologické aktivity, pankratistatin i narciklasin mají silnou antimitotickou a protinádorovou aktivitu. Výhodou pankratistatinu je indukce apoptózy selektivně u nádorových buněk, zatímco efekt na zdravé buňky je minimální. Další ze zástupců, trisphaeridin, je vysoce účinný vůči retrovirům, má ale bohužel nízký terapeutický index^{8,38}.

3.1.4.6. Tazettinový strukturní typ

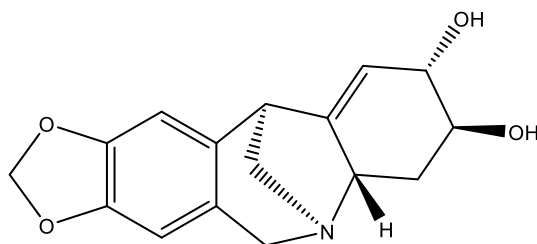


Obrázek 9: Struktura tazettinu

Amaryllidaceae alkaloidy tazettinového typu byly izolovány z rodů *Clivia*, *Eucharis*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Chlidanthus*, *Leucojum* a *Zephyranthes*³⁴.

Všechny sloučeniny této skupiny mají strukturu odvozenou od 2-benzopyrano[3,4-c]indolu. Hlavní zástupce, tazettin, má bohužel pouze velmi slabé cytotoxické působení. Oproti tomu jeho prekurzor, pretazettin, vykazuje mnohem vyšší aktivitu a zároveň působí antivirotický vůči *Herpes simplex*, flavivirům i onkovirům. U pretazettinu byla také testována inhibiční aktivita vůči AChE, bohužel ale s nevýznamným výsledkem^{8,30}.

3.1.4.7. Montaninový strukturní typ

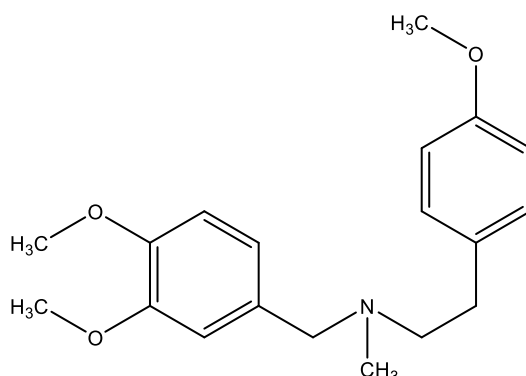


Obrázek 10: Struktura montaninu

Alkaloidy montaninového strukturního typu byly prozatím získány pouze z rodů *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Pancratium* a *Scadoxus*³⁴.

Vzhledem k širokému spektru biologických aktivit představuje montaninový strukturní typ jednu z nejzajímavějších skupin Amaryllidaceae alkaloidů. Nejvýznamnějšími z této skupiny jsou sloučeniny montanin a pankracin, u nichž byla zaznamenána poměrně významná cytotoxická aktivita, stejně jako u méně známých alkaloidů této skupiny, kokcininu a manthinu. U montaninu bylo dále pozorováno také anxiolytické, antidepresivní i antikonvulzivní působení, zatímco pankracin vykazuje antibakteriální účinky vůči mnoha bakteriím, jako jsou *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, a v menší míře také vůči parazitickým prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* a *Plasmodium falciparum*^{8,32}.

3.1.4.8. Belladinový strukturní typ



Obrázek 11: Struktura belladinu

V rodech *Crinum*, *Galanthus*, *Chlidanthus*, *Nerine* můžeme nalézt Amaryllidaceae alkaloidy belladinového strukturního typu³⁴.

Jedním ze zajímavých biologických účinků belladinových alkaloidů je potenciál inhibovat HDAC2 (histon deacetylase 2). Histon deacetylasy jsou enzymy, které hrají důležitou roli v inhibici transkripce tumor-supresorových genů, čímž následně dochází k rozvoji a růstu rakovinných buněk. Tento proces jejich inhibice je tak v současnosti podstatou několika strategií v léčbě nádorových onemocnění³⁹.

3.1.5. Terapeutické využití Amaryllidaceae alkaloidů

3.1.5.1. Nádorová onemocnění

Jak bylo již zmíněno výše, nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v populaci, a to zejména ve vyspělých zemích. Podle statistik WHO bylo v roce 2018 zaznamenáno téměř 18,1 milionů nových případů a bezmála 9,6 milionů pacientů na toto onemocnění ve stejném roce zemřelo⁴⁰. Podle odhadů se má v roce 2030 celkový počet postižených dokonce až ztrojnásobit, s velkou pravděpodobností tak bude postupem času úmrtnost na toto onemocnění častější než na kardiovaskulární choroby, které jsou v současné době na první příčce mezi příčinami úmrtí⁴¹.

Co se týká rizikových faktorů spojených s tímto onemocněním, jedním z nich je zcela určitě věk a prodloužení střední doby života. Čím je člověk starší, tím delší dobu je vystaven působení kancerogenních faktorů, stárnoucí tkáň se stává více náchylné vůči kancerogenním podnětům z okolí a kumulují se endogenní podněty, které způsobují

poškození DNA. Právě kvůli těmto vlivům tak více než 50 % nádorových onemocnění připadá na populaci ve věku 65 let a více. Dalším neovlivnitelným rizikovým faktorem je genetická predispozice, která bývá příčinou vzniku nádorů ze 7–10 %. Mezi ovlivnitelné rizikové faktory pak můžeme zařadit nevhodné stravovací návyky, nedostatek fyzické aktivity, obezitu, dlouhodobý stres, kouření nebo nadměrný příjem alkoholu. Díky těmto vnějším ovlivnitelným rizikovým vlivům se v současnosti nádorová onemocnění řadí také mezi civilizační choroby. Mezi potenciální kancerogeny pak patří vystavování se škodlivému záření, chemickým sloučeninám nebo onkovirům⁴¹.

Tyto faktory mohou způsobit poškození regulačních mechanismů buněčného cyklu, čímž dochází k narušení normálního procesu dělení, diferenciaci, růstu a apoptózy buněk. Vlivem těchto změn může následně dojít ke vzniku nádoru, což je označení pro skupinu buněk, která se vyznačuje nekontrolovatelným růstem a dělením⁴².

Nádory můžeme rozdělit na 2 základní typy, benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádor bývá ohraničený, roste pomalu, nešíří se do dalších částí těla a netvoří tak metastázy. Naopak maligní nádory se vyznačují rychlým růstem, bývají neohraničené, mohou se šířit a prorůstat do okolních tkání, a tím utlačovat nebo ničit jiné orgány. Typickým znakem maligních nádorů je také schopnost šířit se pomocí krevního nebo lymfatického systému do jiných částí těla a zakládat zde další ložiska, tzv. metastázy^{40,43}.

Chirurgické odstranění nádorů a radioterapie jsou základní metody používané při léčbě časných a lokalizovaných stádií nádorových onemocnění. U mnoha indikací se využívají i současně a mají také význam v paliativní medicíně. Další metodou je pak farmakologická léčba, která má hlavní roli zejména při terapii maligních nádorů⁴¹.

Mezi chemoterapeutiky používaných k léčbě různých typů nádorových onemocnění můžeme nalézt i poměrně velké množství přírodních látek a derivátů od těchto látek odvozených, v konvenční západní medicíně v současnosti představují zhruba 47 % všech schválených chemoterapeutik³⁷. K těm nejvýznamnějším můžeme zcela jistě zařadit alkaloid paclitaxel a jeho derivát docetaxel, které působí jako vřetenkové jedy a zastavují tak buněčné dělení. Dále Cantharanthus alkaloidy vinkristin a vinblastin, které inhibují polymeraci mikrotubulů, nebo deriváty alkaloidu kamptotecinu, topotekan a irinotekan, působící jako inhibitory topoizomerázy I⁴³.

Vzhledem k tomu, že incidence nádorových onemocnění narůstá, mnoho typů nádorů je vůči používané farmakoterapii rezistentní a léčiva často nepůsobí selektivně pouze na

nádorové buňky, je hledání vhodných chemoterapeutik stále aktuálním předmětem výzkumu. Jednou ze skupin, která je v současnosti díky svému cytotoxickému potenciálu intenzivně zkoumána, je právě skupina Amaryllidaceae alkaloidů. Těmi nejčastěji uváděnými Amaryllidaceae alkaloidy vykazující cytotoxické působení již v mikromolárních koncentracích jsou již zmiňované alkaloidy lykorin, narciklasin, pankratistatin a haemanthamin. V současnosti je pozornost věnována také alkaloidům montaninového strukturního typu (pankracin, montanin, kokcinin, manthin), mechanismus jejich cytotoxického účinku na molekulární úrovni ale stále nebyl zcela vysvětlen^{32,44}.

3.1.5.2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které postihuje především starší osoby ve věku nad 65 let, kdy jí trpí zhruba 3–7 % populace⁴⁵. U pacienta trpícího touto chorobou můžeme pozorovat typické příznaky. Nejprve to bývá zmatenost, zapomínání, porucha krátkodobé paměti, učení, myšlení nebo orientace. S progresí nemoci se pak může objevit i porucha řeči, motoriky, ztráta dlouhodobé paměti a narušení dalších nejen kognitivních funkcí, které mohou vést až k invaliditě a úplné nesoběstačnosti pacienta.

Příčina tohoto onemocnění není přesně známa a stejně tak dosud nebylo objeveno vhodné léčivo, které by bylo schopné tuto nemoc vyléčit. V současné době jsou tak používány látky, které alespoň zpomalují progresi Alzheimerovy choroby. Místem jejich působení je cholinergní systém, který bývá při této chorobě nejvíce zasažen. Mezi typické patofyziologické procesy patří zejména snížené uvolňování neuromediátoru acetylcholinu (ACh) z presynaptických zakončení, pokles hladiny enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT) zodpovědného za syntézu ACh a také snížené množství nikotinových receptorů pro ACh^{5,46}.

V klinické praxi jsou nejčastěji využívány inhibitory AChE (rivastigmin, donepezil a galanthamin), případně inhibitor NMDA receptorů memantin v pozdějším stádiu nemoci. AChE je enzym, který ukončuje přenos nervového vzruchu na synapsi tím, že rozkládá uvolněný neuromediátor ACh na cholin a acetát. Proto se v terapii využívají právě inhibitory tohoto enzymu, které tak prodlužují účinek ACh na postsynaptickém receptoru, a kompenzují tím pokles množství ACh^{5,46}.

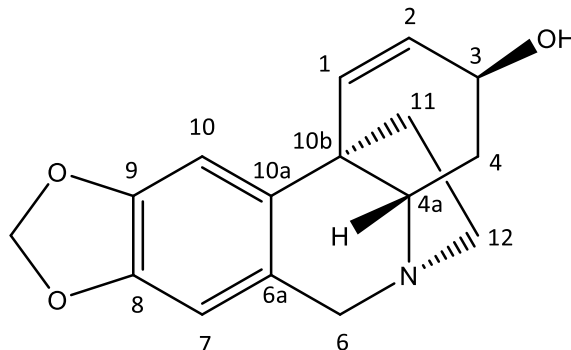
Právě galanthamin byl prvním a v současné době je stále jediným Amaryllidaceae alkaloidem používaným v klinické praxi při terapii Alzheimerovy choroby. Jeho výhodou

oproti ostatním používaným AChE inhibitorům je schopnost alostericky modulovat nikotinové receptory, bohužel má ale nízkou účinnost vůči BuChE, která se uplatňuje zejména v pozdější fázi tohoto onemocnění. Z rostlin čeledi Amaryllidaceae se podařilo izolovat množství dalších alkaloidů, které prokázaly potenciál inhibovat AChE, případně BuChE. Za zmínku stojí například již zmiňovaný sanguinin, derivát galanthaminu, který v *in vitro* studiích vykazoval mnohokrát vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE než galanthamin, nebo derivát lykorinu, 1-*O*-acetyllykorin. Další sloučeninou se zajímavými účinky z hlediska inhibice BuChE je alkaloid narcimatullin ($IC_{50} = 5,9 \pm 0,2 \mu M$), který byl poprvé izolován v roce 2019 z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master.

V posledních několika letech se výzkum zabývá také přípravou syntetických nebo polosyntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidů s cílem získat tak látky s ještě významnějším inhibičním potenciálem^{5,33,47}.

3.2. Charakteristika alkaloidu vittatinu

3.2.1. Struktura vittatinu, chemické a fyzikální vlastnosti



Obrázek 12: Struktura vittatinu

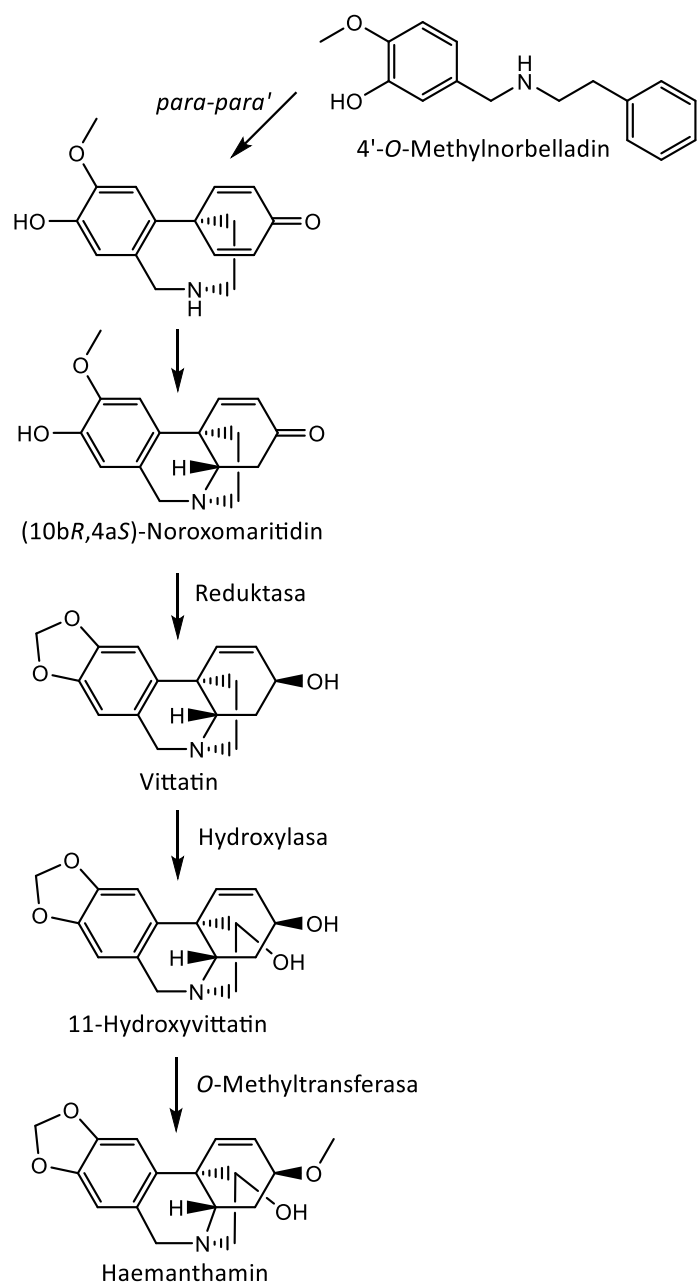
Vittatin je terciární dusíkatá base se sumárním vzorcem $C_{16}H_{17}NO_3$ a molární hmotností 271,31 g/mol. Teplota tání odpovídá 207–208 °C^{48,49} a specifická optická otáčivost byla naměřena +30 ° (25 °C, $CHCl_3$)¹¹. Vyskytuje se ve formě nažloutlých krystalků.

Struktura vittatinu (Obrázek 12) je odvozena od 5,10*b*-ethanophenanthridinu a dále obsahuje hydroxylovou skupinu v poloze C-3, 1,3-dioxolanový kruh, aromatické jádro a dvojnou vazbu v kruhu C. Jeho synonymem je například (3β,5α,13β,19α)-1,2-didehydrokrinan-3-ol nebo také (+)-krinin^{49,50}. Vittatin je tak enantiomerem neboli

optickým antipodem krininu^{48,51}, což znamená, že mají totožné sumární i strukturní vzorce, jsou si ale navzájem zrcadlovými obrazy. Jejich absolutní hodnota optické otáčivosti je tedy stejná, liší se ale ve směru stáčení roviny polarizovaného světla.

3.2.2. Biosyntéza vittatinu

Vittatin vzniká ze stejného prekursoru jako další Amaryllidaceae alkaloidy, 4'-*O*-methylnorbelladinu. V první fázi dochází k intramolekulárnímu spojení v poloze *para-para'* a k tvorbě noroxomaritidinu, ze kterého redukcí oxoskupiny na hydroxylovou v poloze C-3 pomocí enzymu reduktázy vzniká vittatin. Sám vittatin je prekurzorem pro biosyntézu dalších Amaryllidaceae alkaloidů. Působením hydroxylasy se v poloze C-11 tvoří hydroxyskupina a vzniká tak 11-hydroxyvittatin, který je dále *O*-methyltransferasou konvertován na haemanthamin (Obrázek 13). Tato biosyntetická cesta dále pokračuje až k tvorbě tazettinu^{29,51}.



Obrázek 13: Schéma biosyntetické cesty vittatinu²⁹

3.2.3. Izolace vittatinu

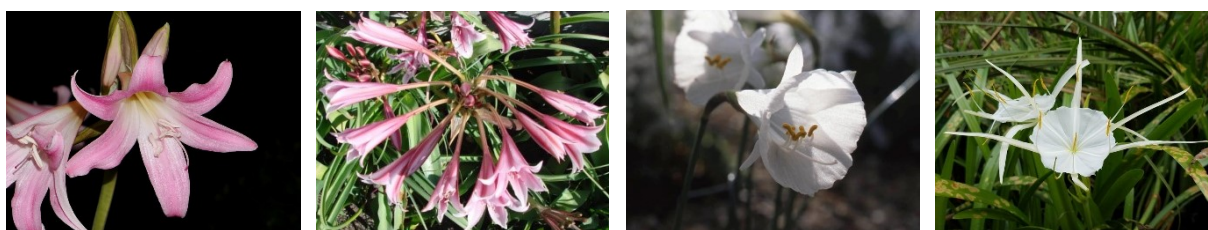
Amaryllidaceae alkaloid vittatin se poprvé podařilo izolovat z rostliny *Hippeastrum vittatum* (Obrázek 14), a to Hansem-G. Boitem z Chemického Institutu Humboldtovy univerzity v Berlíně v roce 1956^{48,51}.



Obrázek 14: *Hippeastrum vittatum* (Hvězdník proužkovaný)⁵³

Poté, co byly z cibulí a listů této rostliny úspěšně izolovány Amaryllidaceae alkaloidy tazettin a lykorin, se Chemickému Institutu podařilo získat další množství těchto dvouletých cibulí sklizených v Holandsku pro izolaci, která následovala. Směs získaných alkaloidů tvořily z 3 % a 20 % již dříve izolované alkaloidy tazettin a lykorin, dále se podařilo získat značné množství haemanthaminu (21 %), homolykorin (1 %) a ze 3 % a 7 % dva dosud neznámé alkaloidy, které byly nazvány hippeastrin a vittatin. Vittatin byl popsán jako terciární base se sumárním vzorcem $C_{16}H_{17}O_3N$, teplotou tání 207-208 °C a optickou otáčivostí $[\alpha]_D^{25} +38^\circ$ ⁴⁸.

Dalšími rostlinami z čeledi Amaryllidaceae, ze kterých byl vittatin izolován jsou například *Amaryllis belladonna*⁷, *Crinum bulbispermum*^{7,54}, *Narcissus cantabricus*⁵⁵, *Hymenocallis rotata*⁵⁶, *Hippeastrum equestre*⁵⁷, *Hippeastrum maritimum*⁵⁸, *Narcissus pseudonarcissus*^{58,59}, *Zephyranthes citrina*⁶⁰, *Pancratium sickenbergi*⁶⁰ nebo *Pancratium maritimum*⁵⁸.



Obrázek 15: Příklady druhů čeledi Amaryllidaceae, v nichž se vyskytuje alkaloid vittatin; zleva *Amaryllis belladonna*⁶¹, *Crinum bulbispermum*⁶², *Narcissus cantabricus*⁶³, *Hymenocallis rotata*⁶⁴

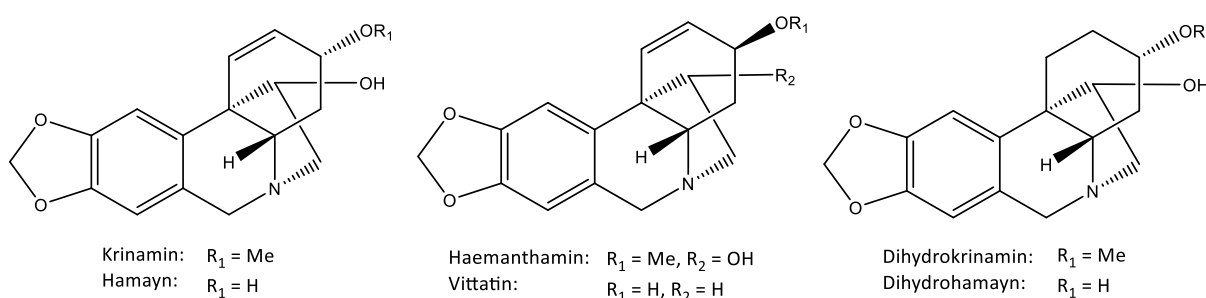
Vzhledem k poměrně náročnému procesu získání rostlinného materiálu a izolace Amaryllidaceae alkaloidů jsou v současné době prováděny i pokusy o jejich totální syntézu. Nejinak je tomu i v případě vittatinu. V roce 2007 byla publikována práce ohledně první chirální syntézy vittatinu, kdy výchozí látkou byla D-glukóza⁶⁵.

3.2.4. Biologická aktivita vittatinu

3.2.4.1. Protinádorová aktivita

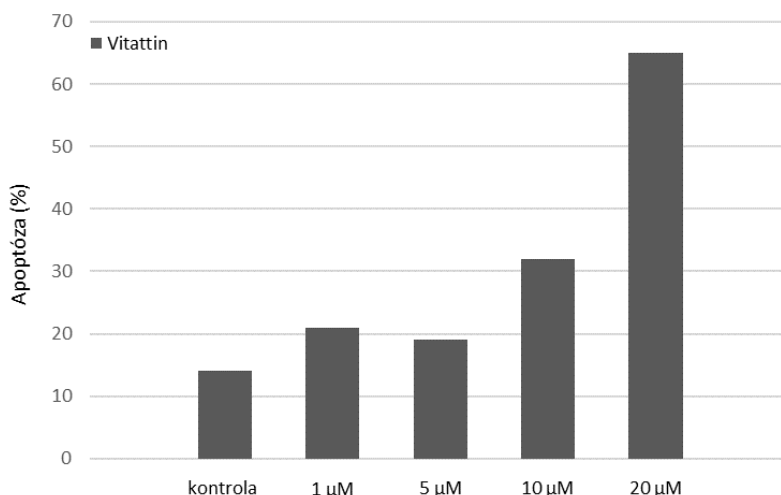
Nejvýznamnější aktivita, která byla u Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu prokázána je cytotoxicita⁸.

V roce 2009 byla provedena studie³⁸, jejímž předmětem bylo testování indukce apoptózy 4 vybraných alkaloidů u nádorové buněčné linie Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů). Alkaloidy vittatin a hamayn s novými deriváty dihydrokrinaminem a dihydrohamaynem byly do této studie vybrány na základě podobnosti strukturních znaků, které byly pozorovány u sloučenin (krinamin a haemanthamin) indukujících apoptózu buněk hepatocelulárního karcinomu (Obrázek 16). Mezi tyto strukturní požadavky patří především α -5,10*b*-ethano můstek, dále pak volná hydroxylová skupina v poloze C-11 a tolerována byla α nebo β -methoxy skupina v poloze C-3.



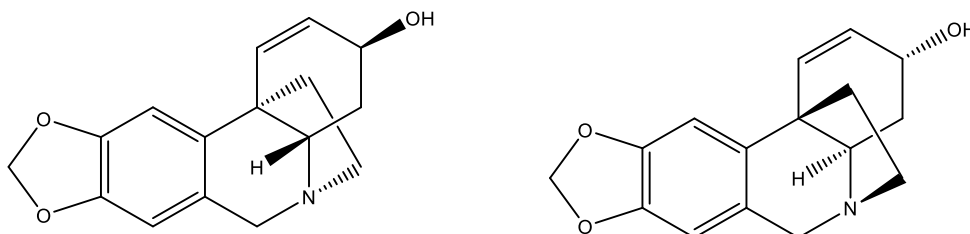
Obrázek 16: Struktury Amaryllidaceae alkaloidů testovaných na cytotoxickou aktivitu³⁸

Co se týká výsledků testování, po 24 hodinách působení vittatinu byla pozorována významná indukce apoptózy s podobným potenciálem jako u krinaminu a haemanthaminu. Přibližně u 65 % Jurkat buněk po 24hodinovém působení vittatinu v koncentraci 20 μM proběhla apoptóza a na následujícím obrázku (Obrázek 17) je zobrazena závislost množství usmrcených Jurkat buněk na určité koncentraci vittatinu.



Obrázek 17: Závislost apoptózy Jurkat buněk (%) na koncentraci vittatinu³⁸

Důkazem proapoptotické aktivity vittatinu v této studii byla kondenzace jader nádorových buněk, přemístění fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány a také zvýšená aktivita kaspasy 3. Za zmínku zde také stojí aktivita krininu, což je enantiomer vittatinu a jeho jediným strukturálním rozdílem je β orientace 5,10*b*-ethano můstku (Obrázek 18). Krinin na rozdíl od vittatinu vykazuje nulovou indukci apoptózy, což dokazuje nutnost vhodného stereochemického uspořádání v molekule pro přítomnost protinádorového působení.



Obrázek 18: Struktura vittatinu a jeho enantiomeru krininu

Kromě vittatinu byla v rámci této studie testována aktivita i u dalších již dříve zmiňovaných alkaloidů, která byla následně hodnocena vzhledem k jejich struktuře. Byly tak potvrzeny stávající a zjištěny další strukturální znaky, které jsou zodpovědné za cytotoxickou aktivitu těchto sloučenin. Opět byla tedy potvrzena nutná přítomnost α -5,10*b*-ethano můstku; přítomnost dvojné vazby mezi C-1 a C-2 není striktně vyžadována; aktivní deriváty mají na C-3 α nebo β -methoxyskupinu, případně β -hydroxyskupinu, zatímco α -hydroxyskupina způsobuje mírný pokles aktivity; na C-11 je tolerován malý substituent (-H,

-OH)³⁸.

Další práce se zabývala testováním cytotoxické aktivity extraktu a alkaloidů izolovaných z cibulí rostliny *Hippeastrum vittatum*. Cytotoxicita byla vyhodnocena pomocí testů využívajících aminoxanthenové barvivo sulforhodamin B s následným stanovením absorbance. Za cytotoxicky aktivní se považují vzorky, jejichž hodnota absorbance je <25 % kontrolní hodnoty v čase nula. Hodnoty absorbance alkaloidního extraktu i izolovaných alkaloidů vittatinu a montaninu byly <10 % kontrolní hodnoty, a vykazaly tak v určité míře inhibici růstu buněk u všech testovaných nádorových linií, jimiž byly HT29 (adenokarcinom tračníku), H460 (nemalobuněčný karcinom plic) a RXF393 (renální karcinom). V následující tabulce (Tabulka 1) jsou zobrazeny zjištěné hodnoty IC₅₀ [μg/ml], které dokazují, že všechny tyto buněčné linie jsou více rezistentní vůči působení vittatinu v porovnání s montaninem. I přes to vittatin vykazuje mírnou až střední cytotoxickou aktivitu. V práci ale bohužel není uvedeno, zda byl při testování využit nějaký standard, a tím pádem ani hodnoty, se kterými by bylo možné porovnat výsledky zkoušených látek⁶⁶.

Tabulka 1: Hodnoty IC₅₀ [μg/ml] alkaloidního extraktu a izolovaných alkaloidů z *H. vittatum*⁶⁶

	IC ₅₀ [μg/ml]		
	HT29	H460	RXF393
CH₂Cl₂ (extrakt)	0,68 ± 0,21	0,62 ± 0,06	0,79 ± 0,52
Montanin	0,71 ± 0,10	0,57 ± 0,57	0,65 ± 0,01
Vittatin	21,91 ± 1,61	15,88 ± 3,28	29,57 ± 12,66

<5 silná aktivita, 5–20 střední aktivita, 20–50 slabá aktivita, >50 neaktivní

Bohužel ne u všech testovaných typů nádorů byla cytotoxická aktivita vittatinu prokázána. V roce 2015 byla provedena studie ohledně cytotoxicity sedmi Amaryllidaceae alkaloidů, včetně vittatinu, a to na čtyřech dalších nádorových buněčných liniích, konkrétně A2780 (ovariální karcinom), SW1573 (karcinom plic), T-47D (karcinom prsu) a WiDr (karcinom tračníku). Ani u jedné z těchto buněčných linií cytotoxické působení vittatinu potvrzeno nebylo⁶⁷.

3.2.4.2. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

Schopnost inhibovat AChE a BuChE je další aktivitou, která je pro alkaloidy rostlin z čeledi Amaryllidaceae typická a která byla u vittatinu testována. Vzhledem k tomu,

že inhibiční aktivita vittatinu vůči AChE i BuChE přesahovala hodnotu 100 μM , můžeme vittatin v obou těchto případech označit v podstatě za neaktivní¹¹. Pomocí následující tabulky (Tabulka 2) lze porovnat hodnoty IC_{50} jednotlivých alkaloidů izolovaných z rostliny *Zephyranthes robusta* s hodnotami standardu galanthaminu.

Tabulka 2: Inhibiční aktivita vittatinu a dalších alkaloidů vůči AChE a BuChE¹¹

	IC_{50} [μM]	
	AChE	BuChE
Galanthamin	2,5 \pm 0,1	53,3 \pm 1,9
3-Epimakronin	87,7 \pm 3,2	> 100
Hippeastidin	99,7 \pm 4,1	> 100
Lykoramin	55,3 \pm 2,8	> 100
Galanthin	> 100	> 100
Haemanthamin	> 100	> 100
Tazettin	> 100	> 100
Vittatin	> 100	> 100
Lykorin	> 100	> 100
11-Hydroxyvittatin	> 100	> 100
Haemanthidin	> 100	> 100
Hamayn	> 100	> 100
8-O-Demethylmaritidin	28,0 \pm 0,9	> 100
Huperzin A^a	0,033 \pm 0,1 $\times 10^{-2}$	> 100
Eserin^a	0,063 \pm 0,1 $\times 10^{-2}$	0,130 \pm 0,4 $\times 10^{-2}$
Galanthamin^a	1,710 \pm 6,5 $\times 10^{-2}$	42,300 \pm 1,3

^astandard

3.2.4.3. Další významné biologické aktivity vittatinu

Kromě cytotoxického působení byla u vittatinu prokázána i antibakteriální aktivita, a to vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a vůči gramnegativní bakterii *Escherichia coli*^{7,8,9}.

Vittatin rovněž vykazoval antimykotické působení vůči *Candida albicans* (MIC = 31 $\mu\text{g}/\text{ml}$)⁷.

Pomocí následující tabulky (Tabulka 3) je možné porovnat antibakteriální

a antimykotickou aktivitu vittatinu s dalšími alkaloidy, které byly získány izolací z *Amaryllis belladonna*. Inhibiční aktivita vůči *S. aureus* a *C. albicans* byla pozorována i u jeho hydroxyderivátu, 11-hydroxyvittatinu. Jako pozitivní antibakteriální kontrola byl v této studii použit ampicilin (10 µg/disk) a jako pozitivní antimykotická kontrola klotrimazol (10 mg/ml), výsledné hodnoty těchto kontrol bohužel nebyly v práci uvedeny⁷.

Tabulka 3: Výsledky hodnocení antibakteriální a antimykotické aktivity alkaloidů izolovaných z *A. belladonna* L. (uvedené jako inhibiční zóna v mm a MIC [µg/ml])⁷

	Inhibiční zóna v mm				MIC [µg/ml]	
	Bakterie			Kvasinky		
	Grampozitivní	Gramnegativní				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
(-)-Lykorin	-	-	-	40	-	39
(-)-Amarbellisin	22	22	-	24	125	63
(-)-Hippeastrin	-	-	-	25	125	125
(-)-Pankracin	22	-	16	15	188	188
(+)-Vittatin	19	22	-	17	63	31
(+)-11-Hydroxyvittatin	17	-	-	20	219	156

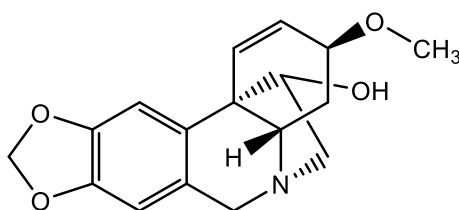
Prokázána byla dále antimalarická aktivita vittatinu. Testován byl účinek tohoto alkaloidu vůči *Plasmodium falciparum* F32 senzitivního na chlorochin. Tento nitrobenzylový prvok je původcem nejzávažnější formy tropické malárie⁶⁸. Principem testování bylo vyhodnocení inhibice parazitémie (proniknutí parazitů do periferní krve hostitele) po 3 dnech. Pro vittatin byla stanovena $IC_{50} = 7,3 \mu M^{49}$, pro srovnání je dále uvedena hodnota IC_{50} pro standard chlorochin, která odpovídá $IC_{50} = 0,04 \mu M^{43}$. Antimalarický účinek vittatinu byl prokázán i v dalších studiích⁶⁷.

3.3. Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a jejich biologická aktivita

Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá přípravou derivátů z Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu a testováním jejich biologické aktivity, bylo by zajímavé výsledky srovnat s jinými již popsány deriváty a zhodnotit vztah mezi jejich strukturou a účinkem. Bohužel do této doby prozatím nebyla publikována žádná práce, která by pojednávala o přípravě polosyntetických derivátů právě z vittatinu, a tím samozřejmě ani o jejich biologickém

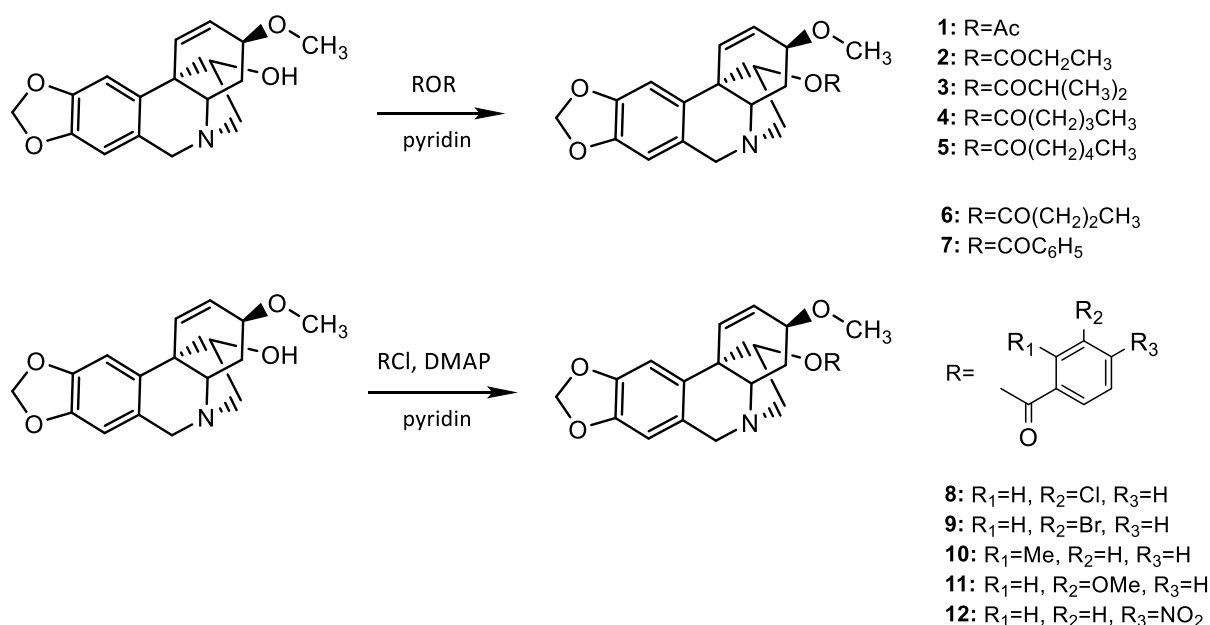
potenciálu. Proto jsou v následující kapitole alespoň uvedeny poznatky týkající se derivátů jiných Amaryllidaceae alkaloidů podobné struktury. Na většině studií, ze kterých je zde čerpáno, se podílela výzkumná skupina ADINACO, která spadá pod Katedru farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

V první řadě stojí za zmínku poznatky z výzkumu týkající se dvou Amaryllidaceae alkaloidů haemanthaminového strukturního typu, haemanthaminu a haemanthidinu, a jejich derivátů. Základ struktury těchto dvou látek, a stejně tak i vittatinu, tvoří α -5,10*b*-ethanophenanthridin. Právě α orientace 5,10*b*-ethano můstku je považována za významný strukturní znak, který byl pozorován u sloučenin s protinádorovým potenciálem a jinak tomu není ani v případě haemanthaminu (Obrázek 19). Jeho silná cytostatická a cytotoxická aktivita byla prokázána v mnoha studiích na desítkách typů nádorových buněčných linií. Díky tomu se haemanthamin dostal do popředí zájmu a v několika studiích byl vybrán jako výchozí látka pro přípravu analog⁶⁹.



Obrázek 19: Struktura haemanthaminu

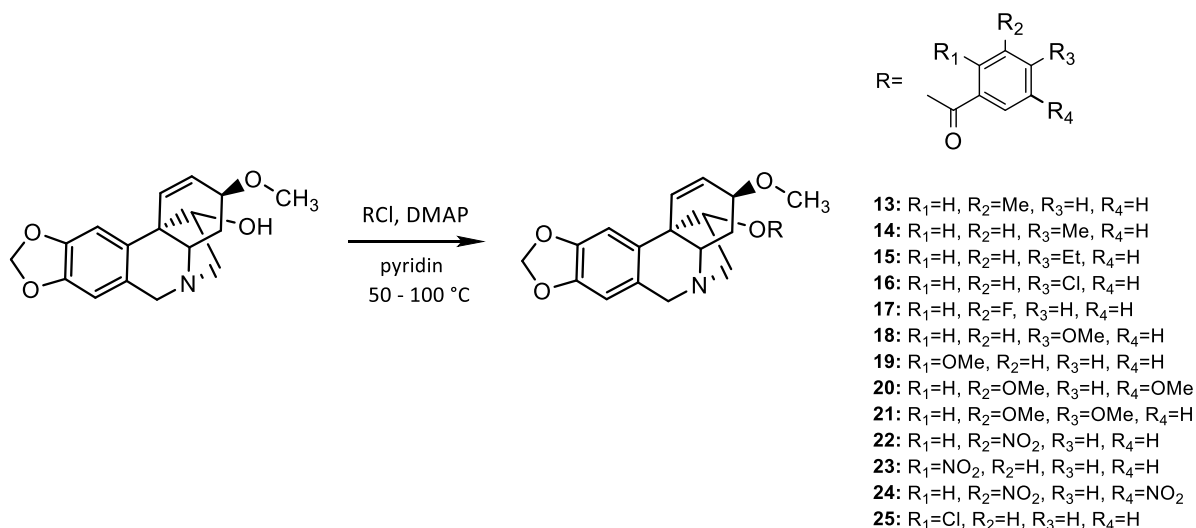
Studie z roku 2019 Kohelová et al. se zabývá syntézou alifatických a aromatických derivátů haemanthaminu. První série derivátů byla připravena acylací hydroxylové skupiny v poloze C-11 pomocí různých anhydridů, druhá série pak pomocí různě substituovaných benzoylchloridů za vzniku odpovídajících esterů (Obrázek 20)¹².



Obrázek 20: Příprava alifatických a aromatických esterů haemanthaminu¹²

Primárním cílem této studie byla příprava derivátů, které by vykazovaly vyšší cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím a nízkou toxicitu vůči buňkám zdravým. Bohužel u žádného z těchto derivátů nebyly pozorovány cytotoxické účinky vůči testovaným buněčným liniím, což byl poměrně překvapivý výsledek vzhledem k cytotoxické a apoptotické aktivitě výchozí látky, haemanthaminu. Připravená analoga byla následně testována na inhibiční aktivitu vůči lidské AChE a BuChE, což bylo inspirováno dalším Amaryllidaceae alkaloidem, lykorinem, který sám sice vykazuje nízkou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE, jeho acylovaná a etherifikovaná analoga ale představují sloučeniny s inhibičním potenciálem vůči oběma cholinesterasám. Zatímco haemanthamin je tedy vůči cholinesterasám inaktivní, některá jeho analoga překvapivě vykazovala poměrně slibnou inhibiční aktivitu. Vzhledem k tomu, že u všech alifatických esterů byla tato aktivita nízká nebo nulová, předpokládá se, že přítomnost aromatických acylů ve struktuře je nezbytná pro vyvolání inhibice vůči cholinesterasám. Nejaktivnějšími inhibitory AChE byly 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin ($IC_{50} = 18,2 \pm 1,3 \mu M$) a 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin ($IC_{50} = 14,7 \pm 1,8 \mu M$), který se ukázal jako potenciálně aktivní i vůči BuChE. U nesubstituovaného derivátu 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu byl pozorován významný pokles inhibičního potenciálu^{12,69}.

Na základě výsledků předchozí studie bylo v rámci práce Peřinová et al. (2020) připraveno dalších 12 aromatických derivátů haemanthaminu, aby bylo možné detailněji popsat vztah mezi strukturou a účinkem. Zde už byly cíleně připraveny pouze aromatické deriváty pomocí různě substituovaných benzoylchloridů (Obrázek 21)⁷⁰.



Obrázek 21: Příprava aromatických derivátů haemanthaminu⁷⁰

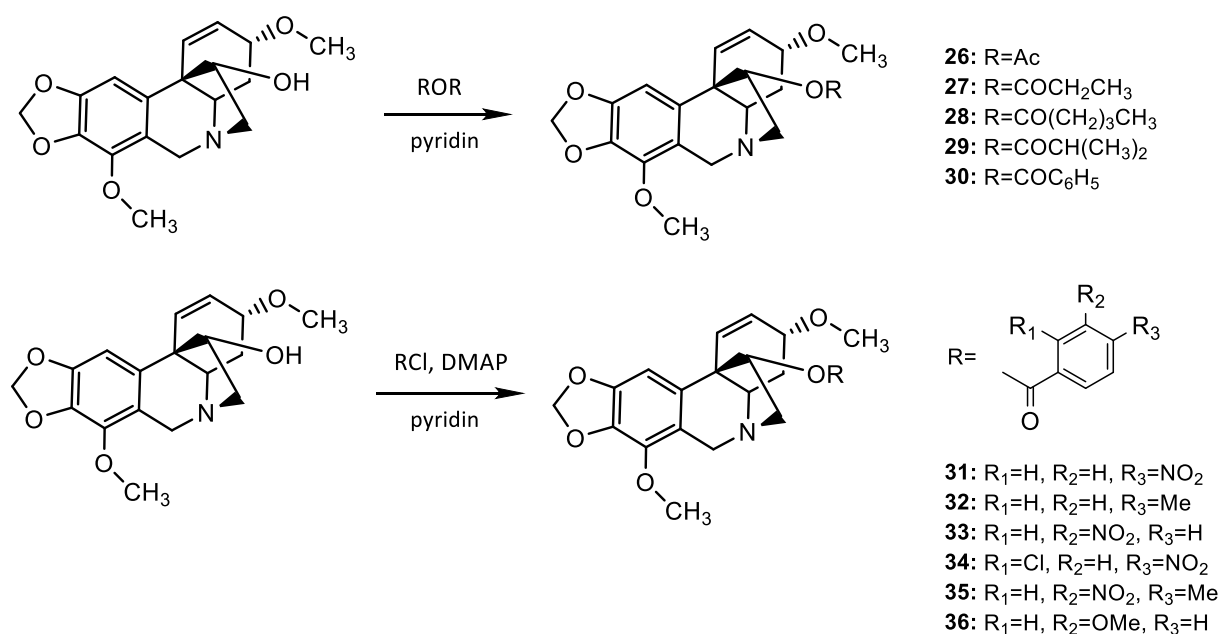
Nejsilnější inhibiční schopnost vůči lidské AChE vykazaly deriváty 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)haemanthamin, 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthamin a 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthamin, s hodnotami IC₅₀ 9,9 ± 0,5 μM, 4,0 ± 0,3 μM a 13 ± 0,8 μM. První dvě sloučeniny vykazovaly selektivní působení vůči AChE, zatímco u 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu pozorujeme inhibiční potenciál také vůči BuChE (hodnota IC₅₀ = 5,6 ± 0,6 μM). Tento analog tak můžeme označit jako neselektivní inhibitor obou cholinesteras, stejně jako 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin z předchozí studie Kohelová et al. (2019)^{12,70}.

Kromě 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu byl významnější inhibiční potenciál vůči BuChE zaznamenán také u 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)haemanthaminu s hodnotou IC₅₀ 3,3 ± 0,4 μM⁷⁰.

Již dříve byly na Katedře farmaceutické botaniky připraveny další desítky analog haemanthaminu, zejména v rámci diplomových prací. Co se týká závěrů ohledně vztahu mezi strukturou a aktivitou, ve všech studiích nejvyšší inhibici vůči AChE vykazaly struktury, jejichž benzoylový kruh byl substituován nitroskupinou. Jako nejvýhodnější se po srovnání inhibičních aktivit ukázala nitroskupina v poloze 3 na benzoylovém kruhu. Z hlediska inhibice

BuChE se jako významný strukturní znak zdá přítomnost methoxyskupiny na benzoylovém kruhu, ideálně v pozici 2. Při porovnání aktivit methylbenzoyl derivátů haemanthaminu vykázal nejlepší výsledky 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin. Substituenty v poloze 2 pravděpodobně brání benzoylové skupině ve volném otáčení a umožňují tak její vhodnou orientaci v aktivním místě BuChE. Deriváty se substitucí v poloze 2 na benzoylovém kruhu byly tak více aktivní vůči BuChE než nesubstituované deriváty v této poloze, a to bez ohledu na charakter substituentu^{70,71,72}.

V roce 2019 se ve své diplomové práci zabývala přípravou derivátů ambellinu, dalšího alkaloidu z čeledi Amaryllidaceae, Aneta Ritomská (Obrázek 22). Ze série aromatických analog vykazaly významnou aktivitu pouze dvě sloučeniny, a to 11-*O*-(benzoyl)ambellin a 11-*O*-(3-methoxybenzoyl)ambellin, s potenciálem selektivně inhibovat BuChE. Mírnou aktivitu vůči AChE pak vykazaly 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)ambellin a 11-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)ambellin, což potvrzuje závěry předchozích studií ohledně vztahu mezi inhibicí AChE a přítomností nitroskupiny v poloze 3 na benzoylovém kruhu. Vzhledem k tomu, že struktura ambellinu obsahuje β orientovaný 5,10*b*-ethano můstek, bylo předpokládáno a testováním na cytotoxicitu následně i potvrzeno, že žádný z těchto derivátů nevykazuje protinádorové působení. Rovněž bylo znovu zjištěno, že alifatické deriváty nejsou zajímavé z hlediska jak cytotoxické, tak i inhibiční aktivity vůči cholinesterasám⁷³.



Obrázek 22: Příprava derivátů ambellinu⁷³

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, chemikálie

4.1.1. Rostlinný materiál

Alkaloid vittatin, který byl použitý jako výchozí látka pro přípravu polosyntetických derivátů, byl získán izolací z cibulí rostliny *Hippeastrum ferrari* na Katedře farmaceutické botaniky. Botanickou identifikaci provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a dokladový vzorek s číslem CUFPH-16130/AL-562 je uložen v herbáriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Izolace byla provedena přibližně z 46,6 kg čerstvých cibulí, které byly nejprve rozdrobněny na částice o velikosti menší než 5 mm a 3× extrahovány varem ve dvojnásobném množství 95% EtOH. Extrakce probíhala 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Všechny extrakty byly poté spojeny a zahuštěny odpařením rozpouštědla na vakuové odparce za vzniku 420 g surového extraktu, který byl následně okyselen pomocí 2% kyseliny chlorovodíkové na pH 1-2 a naředěn na objem 5 l. Po krátké sonikaci a filtraci byl filtrát odtučněn extrakcí do Et₂O (3 × 1,5 l) a poté alkalizován 10% Na₂CO₃ na pH 9–10. Následovala extrakce chloroformem (6 × 300 ml), po oddělení byla organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena na vakuové odparce za vzniku 29,46 g koncentrovaného alkaloidního extraktu.

Rozdělení tohoto alkaloidního extraktu na jednotlivé frakce bylo provedeno sloupcovou chromatografií. Jako stacionární fáze bylo použito 1200 g Al₂O₃ a jako mobilní fáze směsi EtOH a CHCl₃ v různých poměrech (99:1–0:100). Frakce byly jímány v objemu 500 ml. Celkem bylo získáno 360 jednotlivých frakcí, které byly spojeny do 21 frakcí a následně analyzovány pomocí TLC a GC-MS. Po spojení frakcí se stejným alkaloidním profilem byl výsledný počet frakcí snížen na 15, které byly nakonec zpracovány pomocí preparativní TLC.

Na základě výsledků GC-MS analýzy byl vittatin izolován z frakce č. 3 krystalizací ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1). Celkem byly získány 2 g čistého vittatinu. Strukturní identifikace a čistota látky byla potvrzena pomocí NMR a HRMS analýzy.

Izolace vittatinu nebyla náplní této diplomové práce, další podrobnosti lze najít v článku Al Shammari L. et al. (2020)⁷⁴.

4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla

- cyklohexan, č. (Penta) (cHx)
- diethylamin, p. a. (Penta) (Et₂NH)
- ethanol 95 %, č. (Penta) (EtOH)
- ethylacetát, p. a. (Penta) (EtOAc)
- chloroform, č. (Penta) (CHCl₃)
- pyridin, p. a. (Penta)
- toluen, p. a. (Penta) (To)
- dimethylaminopyridin, p. a. (Penta) (DMAP)
- 2-chlorobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-chloro-3-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-methoxybenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-methoxybenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-methylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-methylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-methylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-methyl-3-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 1-naphthoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-naphthoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 1M roztok suchého HCl v Et₂O
- Dragendorffovo činidlo (podle Muniera)

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

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

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

4.1.3. Stacionární fáze pro analytickou a preparativní TLC

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

Pro analytickou TLC byly používány desky o rozměrech 5 × 10 cm, pro preparativní TLC poté o rozměrech 20 × 10 cm.

4.1.4. Mobilní fáze pro analytickou a preparativní TLC

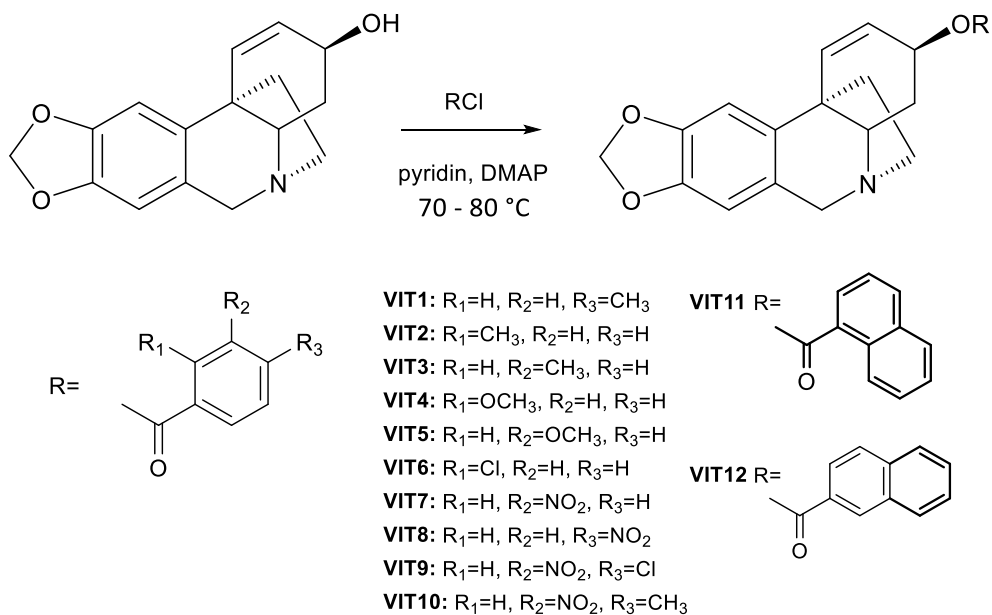
- S₁ = To:cHx:Et₂NH (5:4:1)
- S₂ = cHx:To: Et₂NH (7:2:1)
- S₃ = To: Et₂NH (9:1)

4.2. Metody

4.2.1. Metody použité při přípravě derivátů

4.2.1.1. Příprava polosyntetických derivátů

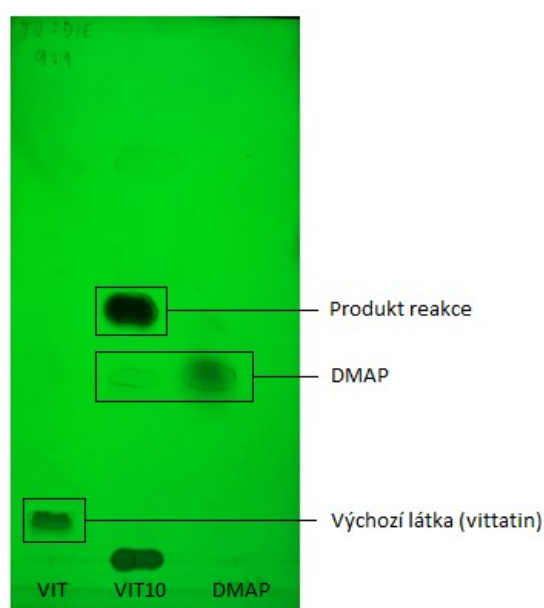
Navážka vittatinu (40 mg) byla nejprve rozpuštěna ve 2 ml suchého pyridinu, následně bylo přidáno vypočítané ekvivalentní množství příslušného chloridu v mírném nadbytku a katalytické množství DMAP. Reakční směs byla s magnetickým míchadlem v uzavřené zkumavce umístěna do parafinové lázně na elektromagnetické míchače s ohřevem. Reakce probíhala při teplotě 70–80 °C asi 16 h (Obrázek 23), po uplynutí této doby byla provedena analytická TLC pro kontrolu ohledně úplného zreagování výchozí látky.



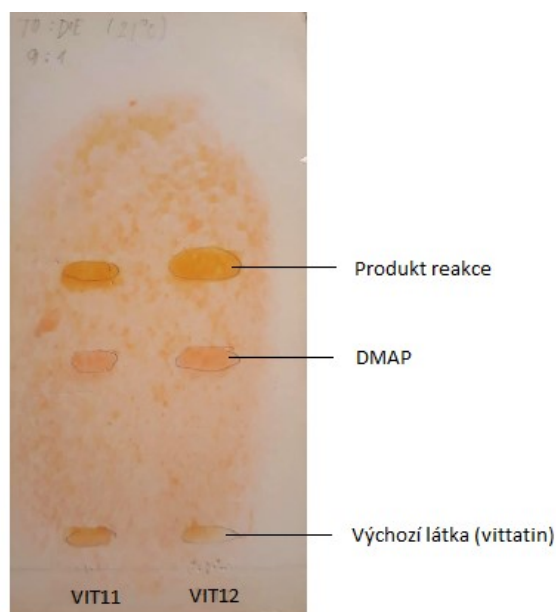
Obrázek 23: Příprava derivátů VIT1–VIT12 z alkaloidu vittatinu

4.2.1.2. Analytická tenkovrstvá chromatografie

Tato metoda byla využita pro kontrolu průběhu reakce. Na start TLC desky byly kapilárou nanášeny výchozí látka (vittatin), DMAP a produkt reakce. Desky byly poté vyvíjeny v nasycené chromatografické komoře za použití mobilní fáze S₁ pro VIT1–VIT5 a mobilní fáze S₃ pro VIT6–VIT12. Vyvinuté desky byly následně vysušeny a jednotlivé zóny detekovány nejprve pomocí UV lampy při 254 nm (Obrázek 24) a poté postříkem Dragendorffovým činidlem (Obrázek 25), které barví alkaloidní zóny do tmavě oranžova.



Obrázek 24: Detekce na TLC desce pomocí UV lampy při 254 nm



Obrázek 25: Detekce na TLC desce postříkem Dragendorffovým činidlem

Na obrázku 25 je zobrazen průběh reakce VIT11 a VIT12 za pokojové teploty. Kromě zón s produkty reakcí (připravenými deriváty) a zón s DMAP zde můžeme vidět i zóny s výchozí látkou. Z chromatogramu je tedy patrné, že reakce neproběhla úplně, a proto bylo nutné změnit reakční podmínky (teplota 70–80 °C).

4.2.1.3. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Po odpaření pyridinu z reakční směsi byl produkt reakce rozpuštěn ve směsi EtOH:EtOAc (1:1) a postupně nanesen na 5 komerčních desek. Nanášení bylo provedeno pomocí chromatografického pera v linii ve vzdálenosti 1 cm od obou bočních i spodního okraje desky. Po odpaření rozpouštědla byly desky vyvíjeny v nasycené chromatografické komoře. Jako mobilní fáze byla použita směs S₂ pro VIT1–VIT5 a směs S₃ pro VIT6–VIT12. Po vyjmutí z komory byly desky vysoušeny v digestoři buď volně na vzduchu nebo pomocí fénu. Na základě detekce pod UV světlem byly jednotlivé zóny s produkty vyznačeny separační jehlou a následně byly ze všech desek mechanicky separovány.

4.2.1.4. Eluce a odpařování

Separované zóny z TLC byly promývány směsí EtOH:EtOAc (1:1) přes vrstvu vaty. Rozpouštědla byla následně odpařena na rotační vakuové odparce Heidolph Laborota 4000 ve vodní lázni při teplotě 60 °C a sníženém tlaku.

4.2.1.5. Vysoušení připravených derivátů a jejich skladování

Po odpaření rozpouštědel na vakuové odparce byly deriváty dosušeny v exsikátoru se sušícími perlami ze silikagelu. Díky připojení exsikátoru na vakuovou pumpu bylo možné pracovat za sníženého tlaku a zvýšit tak účinnost sušení.

Vysušené deriváty byly dále uchovávány v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.2.2. Příprava chloridů alkaloidů

Vzhledem k vysoké lipofilitě připravených derivátů bylo pro provedení testů na biologickou aktivitu nezbytné jejich převedení na hydrochloridy.

4.2.2.1. Příprava bezvodého roztoku HCl v Et₂O

Chloridy alkaloidů byly připraveny za použití 1M roztoku suchého HCl v Et₂O. Jeho příprava probíhá ve speciální aparatuře za použití 3,1 g chloridu sodného, 15 až 20 ml 96% kyseliny sírové a Et₂O. Na chlorid sodný se po sestavení aparatury po kapkách přidává 96% kyselina sírová. Důležité je postupovat pomalu, aby se chlorovodík vyvíjel postupně a veškerý plyn se stačil absorbovat do diethyletheru. Kyselina sírová je do reakční směsi přidána v mírném nadbytku. Na závěr se roztok HCl v Et₂O přelije do uzavřené zabroušené baňky, ve které se uchovává, a pro přípravu chloridů je možné jej používat po dobu 2 dnů.

4.2.2.2. Příprava chloridů

Připravené deriváty byly rozpuštěny v minimálně desetinasobném množství bezvodého diethyletheru a nejmenším nutném množství CH₂Cl₂ a po krátké sonikaci v ultrazvukové lázni smíchány s 1M roztokem HCl v Et₂O. Tento roztok byl přidáván do změny pH na kyselé, aby bylo s určitostí zajištěno převedení celé navážky na chloridy. Nakonec byl na vodní lázni při teplotě 40 °C a po dobu zhruba 10 minut opatrně odpařen nadbytek roztoku HCl. Po následném vysušení v exsikátoru byly chloridy derivátů opět uchovávány v lednici při teplotě 2–8 °C.

4.2.3. Strukturní analýza derivátů vittatinu

4.2.3.1. ESI-HRMS analýza

ESI-HRMS spektra byla měřena na Katedře analytické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Analýzu provedla prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

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

4.2.3.2. NMR analýza

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

NMR analýza byla provedena na spektrometru VNMR S500 pracujícím při frekvenci 500 MHz pro ^1H jádra a při frekvenci 125 MHz pro ^{13}C jádra. Měření probíhalo při teplotě 25 °C v roztocích CDCl_3 . K ozařování i detekci signálu byla použita sonda OneNMR, což je širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda se schopností regulace teploty. Chemické posuny δ byly změřeny jako hodnoty pars per milion (ppm) a nepřímo vztaženy k TMS (tetramethylsilanu) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro CDCl_3 jsou hodnoty chemického posunu u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm, u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Data získaná měřením jsou uvedena v tomto pořadí: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita ($s = \text{singlet}$, $d = \text{dublet}$, $t = \text{triplet}$, $dd = \text{dublet dubletu}$, $ddd = \text{dublet dubletu dubletu}$, $td = \text{triplet dubletu}$, $m = \text{multiplet}$, $bs = \text{široký singlet}$), integrační konstanta J (Hz).

4.2.3.3. Optická otáčivost

Optická otáčivost derivátů byla měřena v roztocích derivátů pomocí automatického polarimetru ADP 220 BS. Měření probíhalo v prostředí methanolu při teplotě 24 °C, koncentrace měřeného vzorku byla 0,1 g/100 ml a délka kyvety 0,5 dm. Pro každý vzorek bylo provedeno celkem 5 měření a z jejich průměrné hodnoty byla vypočítána specifická otáčivost pomocí následujícího vzorce:

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

- α = naměřená optická otáčivost [°]
 t = teplota měření [°C]
 D = vlnová délka D-linie sodíkového světla [nm] (= 589,3 nm)
 c = koncentrace měřeného alkaloidu v roztoku [g/100 ml]
 l = délka kyvety [dm]

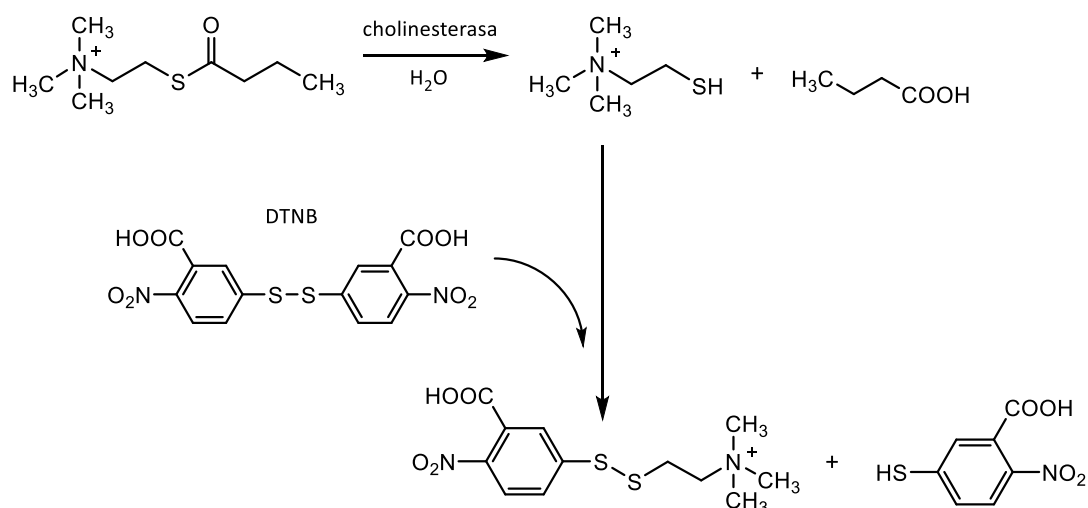
4.2.4. Měření biologických aktivit derivátů vittatinu

4.2.4.1. Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Měření inhibičního potenciálu připravených derivátů vůči AChE a BuChE provedla PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy.

Toto měření probíhalo Ellmanovou spektrofotometrickou metodou a inhibiční aktivita byla stanovena s využitím rekombinantních cholinesteras, které byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich.

Ellmanova metoda je založená na měření absorbance produktů vznikajících reakcí thiocholinu s DTNB (Ellmanovo činidlo) (Obrázek 26). Nejprve bylo do 6 jamek v mikrotitrační destičce postupně napipetováno 8,3 μ l roztoku enzymu, 283 μ l 5mM DTNB a 8,3 μ l roztoku testovaného derivátu dané koncentrace (případně DMSO jako slepý vzorek). Po krátkém promíchání byla destička 5 minut při teplotě 37 °C inkubována pomocí přístroje Reader SynergyTM. Následně bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu, kterým je buď acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid (o koncentraci 10 mM), který byl hydrolyzován na příslušnou kyselinu a thiocholin. Po 2 minutách byla změřena absorbance žlutého produktu, který vznikl reakcí thiocholinu a DTNB, a dále byl měřen nárůst absorbance během 1 minuty. Z naměřených hodnot lze vypočítat procentuální inhibici cholinesteras, hodnota IC₅₀ byla poté vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 8 pouze u derivátů s více než 50% inhibičním potenciálem. Výsledky měření byly nakonec porovnány s hodnotami standardu, kterým je galanthamin.



Obrázek 26: Průběh hydrolytické reakce za použití substrátu a Ellmanova činidla (DTNB)⁷⁵

Další informace ohledně využití této metody při stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE lze nalézt v publikovaných článkách^{75,76,77}.

4.2.4.2. Zkouška paralelního pronikání přes umělou membránu (PAMPA)

Schopnost přestupovat přes hematoencefalickou bariéru (HEB) byla stanovena RNDr. Lenkou Pulkrábkovou a doc. PharmDr. Ondřejem Soukupem, Ph.D. ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany a Centrem biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

V rámci tohoto měření byla využita metoda PAMPA, která je založena na principu pasivního přestupu zkoušených látek z donorového do akceptorového roztoku přes umělou lipidovou bariéru. Testované látky byly nejprve rozpuštěny v DMSO a zředěny fosfátovým pufrům o pH 7,4 k dosažení požadované koncentrace (75–100 μM). Donorová mikrotitrační destička byla naplněna 300 μl tohoto roztoku, akceptorová mikrotitrační destička 300 μl fosfátového pufru o pH 7,4. Donorová destička byla poté opatrně položena na akceptorovou destičku, aby umělá membrána pokrytá fosfolipidy na dně donorové destičky byla v kontaktu s donorovým i akceptorovým roztokem a testovaná látka tak mohla difundovat z donorového do akceptorového roztoku. Po 3, 4, 5 a 6 h inkubace byla měřena koncentrace testované sloučeniny v donorovém i akceptorovém roztoku s využitím UV spektrometru a ze získaných hodnot stanovena schopnost sloučeniny pasivně pronikat přes lipidovou bariéru. Podrobnosti ohledně stanovení prostupu přes HEB touto metodou lze nalézt v publikovaném

článku⁷⁸.

4.2.4.3. Stanovení inhibice agregace β -amyloidu

Stupeň inhibice agregace β -amyloidu měřili Mgr. Markéta Benková a doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D. ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany a Centrem biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

4.2.4.4. Stanovení protinádorové aktivity

Protinádorová aktivita derivátů vittatinu byla stanovena ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Stanovení provedl RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

Cytotoxická aktivita byla testována *in vitro* na 9 nenádorových buněčných liniích, konkrétně Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální karcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom pankreatu), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (cervikální adenokarcinom), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), a 1 nenádorové buněčné linii, MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty). Buněčné linie byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂. Následně byly k buňkám přidány testované deriváty (v koncentraci 10 μ M) a dále inkubovány 48 hodin při stejné teplotě. Jako standard bylo použito chemoterapeutikum doxorubicin (v koncentraci 1 μ M). Po této době byla vyhodnocena viabilita buněk v procentech a porovnána se standardem. Podrobnosti ohledně stanovení cytotoxicity touto metodou byly publikovány v článku³⁷.

4.2.5. Molekulové dokování

Molekulové dokování bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany.

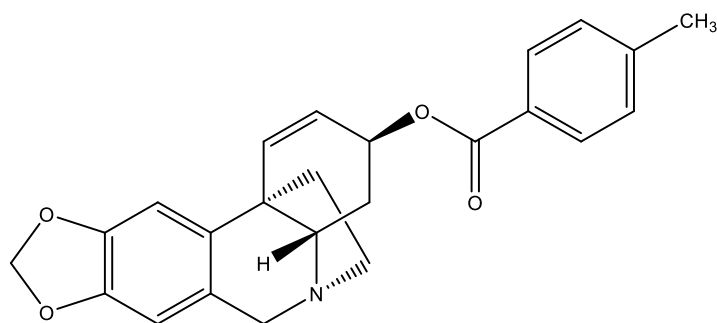
Struktury enzymů lidské AChE a BuChE byly získány z databáze PDB – PDB ID 4EY6 (lidská rekombinantní AChE v komplexu s (-)-galanthaminem, rozlišení 2,3983 Å, žádné mimoležné aminokyseliny dle Ramachandrana⁷⁹) a PDB ID 4BDS (lidská BuChE v komplexu s takrinem, rozlišení 2,1 Å, dvě mimoležné aminokyseliny dle Ramachandrana⁷⁹ mimo vazebnou kavitu). Receptory pro flexibilní molekulové dokování byly připraveny funkcí

DockPrep softwaru Chimera (verze 1.4)⁸⁰ a softwarem Autodock Tools (verze 1.5.6)⁸¹, flexibilní zbytky byly zvoleny dle publikované literatury⁸². Ligandy byly připraveny pomocí softwaru ChemSketch (verze 12.01)⁸³ a pro dokování dále upraveny softwary OpenBabel (verze 2.3.1)⁸⁴, Avogadro (verze 1.1.0)⁸⁵ a AutoDock Tools (verze 1.5.6)⁸¹. Molekulové dokování proběhlo pomocí nástroje AutoDockVina (verze 1.1.2)⁸⁶ s nastavením úplnosti (exhaustiveness) na 8. Výpočet každé kombinace ligand-receptor byl proveden dvacetkrát pro zvýšení šance nalezení optimálního výsledku. K vizualizaci byl využit softwarový balík MacPyMOL (verze 1.7.4)⁸⁷.

5. VÝSLEDKY

5.1. Připravené deriváty vittatinu, jejich strukturní analýza

5.1.1. 3-O-(4-Methylbenzoyl)vittatin (VIT1)



Sumární vzorec: $C_{24}H_{23}NO_4$
Molekulová hmotnost: 389,45

Obrázek 27: Struktura 3-O-(4-methylbenzoyl)vittatinu (VIT1)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24\text{ }^\circ\text{C}} = -108,0^\circ$$

NMR:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.91–7.86 (2H, m, AA'BB'), 7.21–7.16 (2H, m, AA'BB'), 6.88 (1H, s), 6.75 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.05 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.8$ Hz), 5.92 (1H, s), 5.90 (1H, s), 5.62–5.58 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.7$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.7$ Hz), 3.50–3.37 (2H, m), 2.94 (1H, ddd, $J = 13.4$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.8$ Hz), 2.38 (3H, s), 2.23 (1H, ddd, $J = 12.2$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 2.16–2.10 (1H, m), 2.02–1.95 (1H, m), 1.91 (1H, td, $J = 13.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

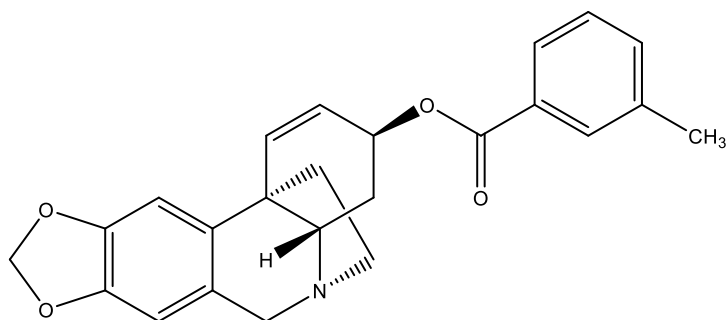
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.0, 146.2, 145.8, 143.5, 138.2, 134.5, 129.7, 128.9, 127.6, 126.5, 123.8, 107.0, 102.8, 100.8, 66.9, 63.4, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 30.1, 21.6

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 390,1707

m/z teoretický (pro $C_{24}H_{23}NO_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 390,1700

5.1.3. 3-O-(3-Methylbenzoyl)vittatin (VIT3)



Sumární vzorec: $C_{24}H_{23}NO_4$
Molekulová hmotnost: 389,45

Obrázek 29: Struktura 3-O-(3-methylbenzoyl)vittatinu (VIT3)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -60,0^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (1H, s, overlapped), 7.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, overlapped), 7.34 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.28 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.89 (1H, s), 6.73 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.55 (1H, s), 6.08 (1H, dd, $J = 10.0$, $J = 5.2$ Hz), 5.94–5.90 (2H, m), 5.62–5.58 (1H, m), 4.51 (1H, d, $J = 16.7$ Hz), 3.89 (1H, d, $J = 16.7$ Hz), 3.57–3.47 (2H, m), 3.04–2.95 (1H, m), 2.38 (3H, s), 2.30–2.21 (2H, m), 2.06–1.99 (1H, m), 1.94 (1H, td, $J = 13.8$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

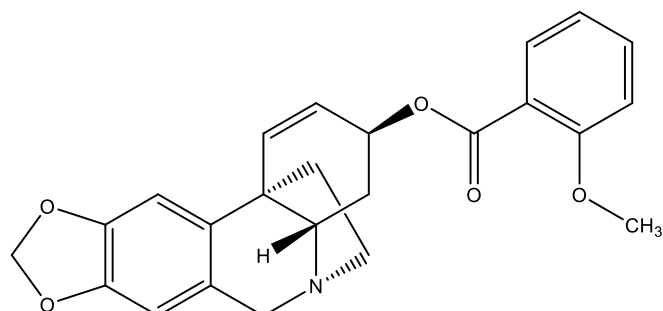
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.1, 146.5, 146.1, 138.0, 137.6, 133.9, 133.7, 130.13, 130.11, 128.1, 126.8, 125.3, 124.1, 107.0, 102.9, 100.9, 66.7, 63.5, 61.9, 53.3, 44.3, 43.9, 29.6, 21.2

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 390,1707

m/z teoretický (pro $C_{24}H_{23}NO_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 390,1700

5.1.4. 3-O-(2-Methoxybenzoyl)vittatin (VIT4)



Sumární vzorec: $C_{24}H_{23}NO_5$
Molekulová hmotnost: 405,45

Obrázek 30: Struktura 3-O-(2-methoxybenzoyl)vittatinu (VIT4)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -120,0^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.71 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.43 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.97–6.89 (2H, m), 6.87 (1H, s), 6.74 (1H, d, $J = 9.9$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.12–6.05 (1H, m), 5.91 (1H, s), 5.89 (1H, s), 5.63–5.57 (1H, m), 4.44 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.85–3.79 (4H, m), 3.53–3.46 (1H, m), 3.45–3.36 (1H, m), 2.99–2.90 (1H, m), 2.27–2.18 (1H, m), 2.17–2.09 (1H, m), 2.03–1.94 (1H, m), 1.89 (1H, td, $J = 13.8$ Hz, $J = 3.9$ Hz)

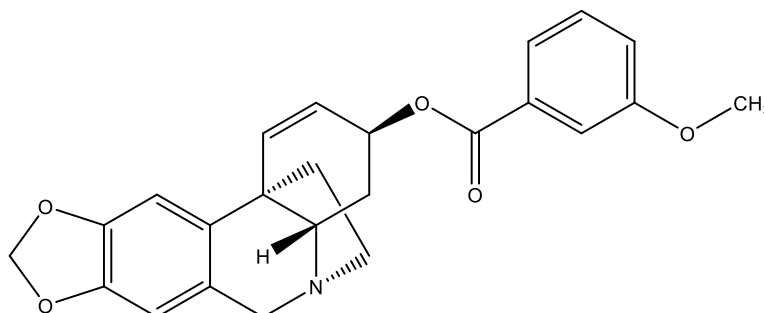
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.5, 159.1, 146.1, 145.8, 138.3, 134.5, 133.3, 131.5, 126.4, 123.9, 120.3, 120.0, 111.9, 106.9, 102.9, 100.8, 66.9, 63.5, 62.4, 55.8, 53.6, 44.3, 44.2, 30.0

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 406,1656

m/z teoretický (pro $C_{24}H_{23}NO_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 406,1649

5.1.5. 3-O-(3-Methoxybenzoyl)vittatin (VIT5)



Sumární vzorec: $C_{24}H_{23}NO_5$
Molekulová hmotnost: 405,45

Obrázek 31: Struktura 3-O-(3-methoxybenzoyl)vittatinu (VIT5)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -36,0^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.52 (1H, s), 7.30 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.07 (1H, dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 6.88 (1H, s), 6.76 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.53 (1H, s), 6.06 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.92 (1H, s), 5.90 (1H, s), 5.62–5.57 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.83 (3H, s, overlapped), 3.82 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, overlapped), 3.52–3.36 (2H, m), 3.00–2.90 (1H, m), 2.28–2.19 (1H, m), 2.18–2.10 (1H, m), 2.04–1.95 (1H, m), 1.92 (1H, td, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.5$ Hz)

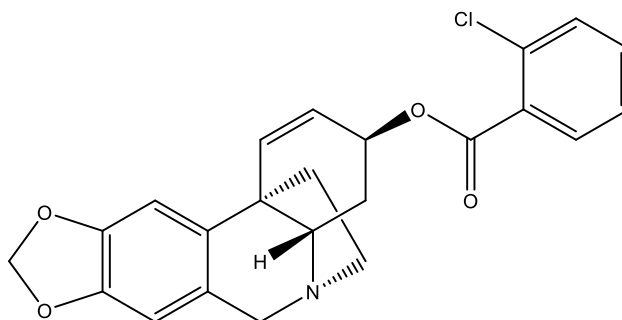
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.9, 159.4, 146.2, 145.8, 138.1, 134.7, 131.7, 129.3, 126.4, 123.7, 122.1, 119.1, 114.4, 107.0, 102.8, 100.8, 67.3, 63.4, 62.4, 55.4, 53.6, 44.3, 44.2, 30.0

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 406,1658

m/z teoretický (pro $C_{24}H_{23}NO_5$ $[M+H]^+$) = 406,1649

5.1.6. 3-O-(2-Chlorobenzoyl)vittatin (VIT6)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{20}ClNO_4$

Molekulová hmotnost: 409,87

Obrázek 32: Struktura 3-O-(2-chlorobenzoyl)vittatinu (VIT6)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24\text{ }^\circ\text{C}} = -84,0^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.74 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.43–7.35 (2H, m), 7.30–7.24 (1H, m), 6.86 (1H, s), 6.77 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.08 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 5.91 (1H, s), 5.89 (1H, s), 5.65–5.61 (1H, m), 4.44 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.48 (1H, dd, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 3.45–3.37 (1H, m), 2.95 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 8.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 2.27–2.14 (2H, m), 2.03–1.95 (1H, m), 1.92 (1H, td, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz)

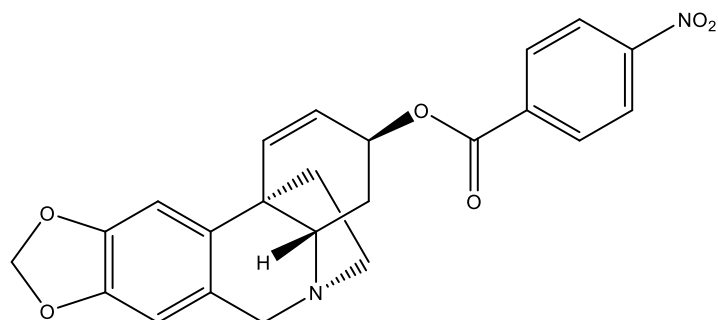
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.2, 146.2, 145.9, 138.0, 135.1, 133.6, 132.4, 131.3, 130.9, 130.4, 126.5, 126.4, 123.4, 107.0, 102.8, 100.8, 68.0, 63.4, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 29.9

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 410,1161

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

5.1.7. 3-O-(3-Nitrobenzoyl)vittatin (VIT7)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{20}N_2O_6$

Molekulová hmotnot: 420,42

Obrázek 33: Struktura 3-O-(3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT7)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -60,0^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.80 (1H, s), 8.39 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 8.33 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.62 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 6.88 (1H, s), 6.81 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.10–6.03 (1H, m), 5.93 (1H, s), 5.90 (1H, s), 5.68–5.61 (1H, m), 4.47 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.84 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.52–3.36 (2H, m), 3.03–2.91 (1H, m), 2.31–1.90 (4H, m)

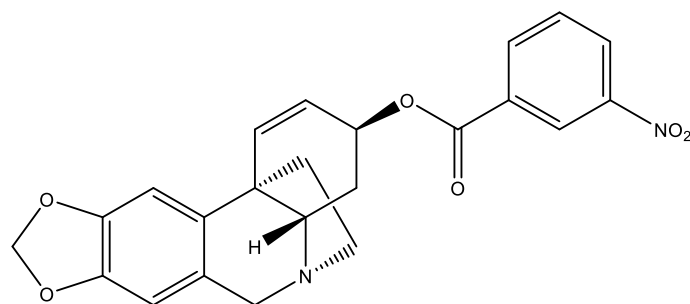
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.0, 148.2, 146.3, 146.0, 137.8, 135.5, 135.4, 132.1, 129.5, 127.3, 126.3, 124.6, 123.0, 107.1, 102.8, 100.8, 68.5, 63.3, 62.3, 53.6, 44.3, 44.2, 29.9

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 421,1402

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

5.1.8. 3-O-(4-Nitrobenzoyl)vittatin (VIT8)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{20}N_2O_6$
Molekulová hmotnost: 420,42

Obrázek 34: Struktura 3-O-(4-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT8)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -195,2^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.27–8.23 (2H, m, AA'BB'), 8.18–8.15 (2H, m, AA'BB'), 6.88 (1H, s), 6.81 (1H, d, $J = 10.1$ Hz), 6.55 (1H, s), 6.06 (1H, dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 5.94–5.92 (1H, m), 5.91–5.90 (1H, m), 5.66–5.62 (1H, m), 4.46 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.84 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.48–3.38 (2H, m), 2.96 (1H, ddd, $J = 12.6$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.25 (1H, ddd, $J = 12.6$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.18–2.12 (1H, m), 2.03–1.91 (2H, m)

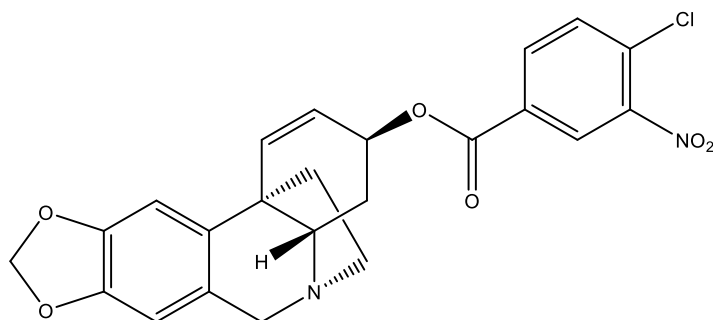
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.1, 150.5, 146.3, 145.9, 137.9, 135.7, 135.6, 130.8, 126.4, 123.4, 123.0, 107.1, 102.8, 100.9, 68.5, 63.4, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 30.0

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 421,1399

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

5.1.9. 3-O-(4-Chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT9)



Sumární vzorec: $C_{23}H_{19}ClN_2O_6$

Molekulová hmotnost: 454,86

Obrázek 35: Struktura 3-O-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT9)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24\text{ }^\circ\text{C}} = -93,9^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.43 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.12 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.9$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.87 (1H, s), 6.81 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.03 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 5.92 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, overlapped), 5.91 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, overlapped), 5.64-5.61 (1H, m), 4.46 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.83 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.45–3.37 (2H, m), 2.96 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 8.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.25 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 8.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.17–2.11 (1H, m), 2.02–1.90 (2H, m)

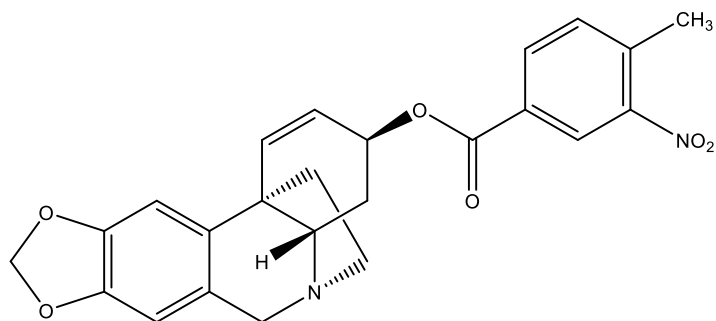
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.2, 148.0, 146.3, 146.0, 137.8, 135.8, 133.6, 132.0, 131.5, 130.3, 126.5, 126.4, 122.8, 107.1, 102.8, 100.9, 68.8, 63.3, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 29.9

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 455,1016

m/z teoretický (pro $C_{23}H_{19}ClN_2O_6 [M+H]^+$) = 455,1004

5.1.10. 3-O-(4-Methyl-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT10)



Sumární vzorec: $C_{24}H_{22}N_2O_6$

Molekulová hmotnost: 434,45

Obrázek 36: Struktura 3-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT10)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -100^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.52 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.10 (1H, dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.88 (1H, s), 6.80 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.54 (1H, s), 6.04 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 5.91 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, overlapped), 5.64–5.60 (1H, m), 4.46 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.83 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.47–3.37 (2H, m), 2.96 (1H, ddd, $J = 12.5$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 2.64 (3H, s), 2.24 (1H, ddd, $J = 12.5$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 2.17–2.11 (1H, m), 2.02–1.89 (2H, m)

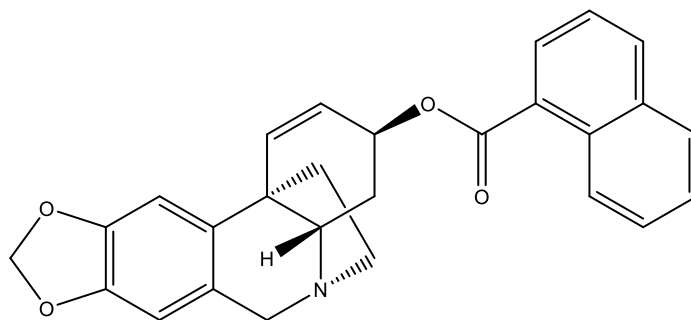
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 164.0, 149.2, 146.3, 145.9, 138.2, 137.9, 135.4, 133.5, 132.9, 129.7, 126.4, 125.8, 123.1, 107.1, 102.8, 100.8, 68.2, 63.3, 62.4, 53.6, 44.3, 44.2, 29.9, 20.5

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 435,1558

m/z teoretický (pro $C_{24}H_{22}N_2O_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 435,1551

5.1.11. 3-*O*-(1-Naphthoyl)vittatin (VIT11)



Sumární vzorec: $C_{27}H_{23}NO_4$
Molekulová hmotnost: 425,48

Obrázek 37: Struktura 3-*O*-(1-naphthoyl)vittatinu (VIT11)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -115,2^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.86 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 8.09 (1H, dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.0$ Hz), 7.99 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.86 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.58–7.50 (2H, m), 7.45 (1H, t, $J = 8.1$ Hz), 6.89 (1H, s), 6.80 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.16 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.5$ Hz), 5.91 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, overlapped), 5.75–5.71 (1H, m), 4.45 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.51 (1H, dd, $J = 13.0$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 3.43 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.96 (1H, ddd, $J = 13.0$ Hz, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.29–2.20 (2H, m), 2.06–1.94 (2H, m)

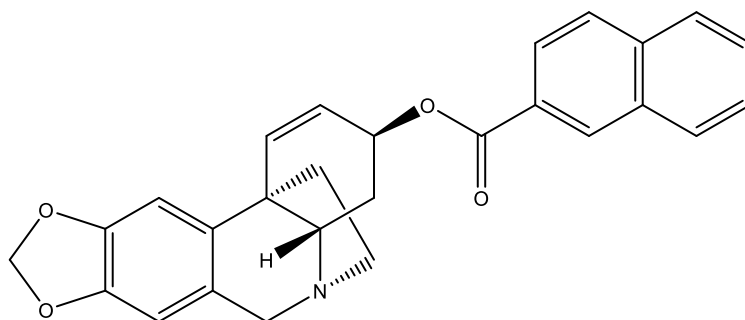
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 167.0, 146.2, 145.8, 138.2, 134.9, 133.8, 133.2, 131.3, 130.1, 128.5, 127.6, 127.4, 126.5, 126.1, 125.8, 124.4, 123.8, 107.0, 102.8, 100.8, 67.3, 63.5, 62.4, 53.6, 44.4, 44.2, 30.1

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 426,1700

m/z teoretický (pro $C_{27}H_{23}NO_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 426,1700

5.1.12. 3-O-(2-Naphthoyl)vittatin (VIT12)



Sumární vzorec: $C_{27}H_{23}NO_4$
Molekulová hmotnost: 425,48

Obrázek 38: Struktura 3-O-(2-naphthoyl)vittatinu (VIT12)

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{24} = -75^\circ$$

NMR:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.56 (1H, bs), 8.02 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.58 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 7.52 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 6.91 (1H, s), 6.80 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.56 (1H, s), 6.11 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 5.94–5.92 (1H, m), 5.91–5.90 (1H, m), 5.70–5.67 (1H, m), 4.49 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.85 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.54 (1H, dd, $J = 12.7$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 3.44 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.97 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.56 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, $J = 9.3$ Hz, $J = 5.0$ Hz), 2.23–2.17 (1H, m), 2.05–2.00 (1H, m), 1.96 (1H, td, $J = 12.7$ Hz, $J = 5.0$ Hz)

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.2, 146.2, 145.9, 138.1, 135.5, 134.7, 132.4, 131.1, 129.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.6, 126.53, 126.50, 125.3, 123.8, 107.0, 102.9, 100.8, 67.3, 63.5, 62.4, 53.6, 44.4, 44.2, 30.1

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 426,1702

m/z teoretický (pro $C_{27}H_{23}NO_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$) = 426,1700

5.2. Výtěžnost reakcí

Z navážky vittatinu, vypočítaného teoretického výtěžku a skutečného výtěžku byla vypočtena skutečná výtěžnost reakce v % pro všech 12 derivátů (Tabulka 4). V následujícím schématu je zobrazen postup včetně příkladu pro výpočet teoretického výtěžku (mg) a následně i pro skutečnou výtěžnost reakce (%).

$$\begin{aligned}\text{Teoretický výtěžek (mg)} &= \text{navážka vittatinu} \times M_r \text{ derivátu} / M_r \text{ vittatinu} \\ &= 40,1 \times 389,45 \text{ (VIT1)} / 271,32 \\ &\doteq 57,56 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Skutečná výtěžnost reakce (\%)} &= \text{výtěžek} / \text{teoretický výtěžek} \times 100 \\ &= 40,9 / 57,56 \times 100 \\ &\doteq 71,06 \%\end{aligned}$$

Tabulka 4: Výtěžky připravených derivátů (mg; %) a hmotnosti hydrochloridů derivátů (mg)

derivát	název	navážka vittatinu (mg)	výtěžek (mg)	skutečná výtěžnost (%)	hydrochloridy (mg)
VIT1	3-O-(4-methylbenzoyl)vittatin	40,10	40,90	71,06	41,10
VIT2	3-O-(2-methylbenzoyl)vittatin	40,20	42,10	72,96	44,10
VIT3	3-O-(3-methylbenzoyl)vittatin	39,90	46,40	81,02	50,40
VIT4	3-O-(2-methoxybenzoyl)vittatin	39,80	45,20	76,00	48,70
VIT5	3-O-(3-methoxybenzoyl)vittatin	40,20	48,90	81,40	50,30
VIT6	3-O-(2-chlorobenzoyl)vittatin	39,70	40,30	67,20	43,20
VIT7	3-O-(3-nitrobenzoyl)vittatin	40,60	46,30	73,60	50,20
VIT8	3-O-(4-nitrobenzoyl)vittatin	40,60	35,80	56,91	37,50
VIT9	3-O-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin	40,70	34,10	49,98	35,20
VIT10	3-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatin	41,10	57,80	87,83	62,40
VIT11	3-O-(1-naphthoyl)vittatin	40,80	52,40	81,90	56,50
VIT12	3-O-(2-naphthoyl)vittatin	40,60	57,20	89,84	60,80

5.3. Biologická aktivita derivátů vittatinu

5.3.1. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

U všech připravených derivátů byla testována inhibice AChE a BuChE, hodnota IC₅₀ byla poté vypočítána pouze u derivátů s více než 50% inhibičním potenciálem. Výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 5), pro srovnání jsou uvedeny hodnoty IC₅₀ standardu galanthaminu (GAL).

Tabulka 5: Procentuální inhibice a hodnoty IC₅₀ připravených derivátů vůči AChE a BuChE

kód	název	AChE (% inhibice)	IC ₅₀ AChE (μM)	BuChE (% inhibice)	IC ₅₀ BuChE (μM)
VIT1	3-O-(4-methylbenzoyl)vittatin	7,55 ± 2,24	> 100	60,17 ± 1,03	57,18 ± 0,25
VIT2	3-O-(2-methylbenzoyl)vittatin	16,60 ± 0,44	> 100	84,41 ± 1,39	7,97 ± 0,02
VIT3	3-O-(3-methylbenzoyl)vittatin	27,56 ± 0,38	> 100	65,07 ± 1,40	44,22 ± 0,55
VIT4	3-O-(2-methoxybenzoyl)vittatin	23,27 ± 1,35	> 100	72,68 ± 1,50	21,87 ± 0,12
VIT5	3-O-(3-methoxybenzoyl)vittatin	35,20 ± 0,78	> 100	58,40 ± 1,80	67,32 ± 0,43
VIT6	3-O-(2-chlorobenzoyl)vittatin	24,74 ± 1,30	> 100	93,00 ± 3,10	5,44 ± 0,06
VIT7	3-O-(3-nitrobenzoyl)vittatin	74,64 ± 1,46	12,44 ± 0,08	60,25 ± 1,67	56,49 ± 0,83
VIT8	3-O-(4-nitrobenzoyl)vittatin	25,90 ± 0,70	> 100	68,02 ± 0,71	22,26 ± 0,30
VIT9	3-O-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin	72,54 ± 0,49	17,01 ± 0,39	29,67 ± 0,94	> 100
VIT10	3-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatin	56,73 ± 0,65	36,98 ± 0,37	37,92 ± 0,36	> 100
VIT11	3-O-(1-naphthoyl)vittatin	6,02 ± 0,48	> 100	53,64 ± 1,43	29,72 ± 0,83
VIT12	3-O-(2-naphthoyl)vittatin	17,40 ± 0,97	> 100	62,53 ± 0,69	15,39 ± 0,35
GAL	galanthamin	-	1,71 ± 0,07	-	42,30 ± 1,3

5.3.2. Schopnost prostupu přes HEB

Schopnost přestupovat přes HEB byla testována pomocí metody PAMPA u dvou derivátů (VIT2 a VIT6), které vykazovaly největší inhibiční potenciál vůči BuChE. Pro porovnání jsou uvedeny výsledky dvou léčiv používaných v léčbě Alzheimerovy choroby, rivastigminu a donepezilu (Tabulka 6).

Tabulka 6: Schopnost VIT2 a VIT6 pasivně přestupovat přes HEB

Sloučenina	Prostupnost přes HEB ($\times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)	CNS (+/-) ^a
VIT2	9,28 \pm 2,21	CNS +
VIT6	8,71 \pm 0,11	CNS +
rivastigmin	20,00 \pm 2,07	CNS +
donepezil	21,93 \pm 2,06	CNS +

^a CNS (+) = předpokládá se vysoká HEB prostupnost, hodnoty $>4,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$; CNS (-) = předpokládá se nízká HEB prostupnost, hodnoty $<2,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$; CNS (+/-) = nejistá HEB prostupnost, hodnoty $2,0 - 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$

5.3.3. Inhibice agregace β -amyloidu

U derivátů VIT2 i VIT6 byla také testována schopnost inhibovat agregaci β -amyloidu. V tabulce 7 jsou uvedeny výsledky měření v %, jako referenční inhibitor byl použit doxycyklin o stejné koncentraci jako testované látky (50 μM).

Tabulka 7: Schopnost VIT2 a VIT6 inhibovat agregaci β -amyloidu (vyjádřená v %, koncentrace 50 μM)

Sloučenina	Inhibice agregace β -amyloidu (%)
VIT2	44,92 \pm 5,03
VIT6	32,58 \pm 3,62
doxycyklin	$\sim 100,00$

5.3.4. Protinádorová aktivita

Cytotoxická aktivita byla testována u všech připravených derivátů na 9 nádorových buněčných liniích a 1 nenádorové buněčné linii (MRC-5). Výsledky jsou zobrazeny v následujících dvou tabulkách (Tabulka 8, Tabulka 9), kde jsou uvedeny hodnoty viability těchto buněk v % po 48 hodinách působení testovaného derivátu v koncentraci 10 μM , a porovnány se standardem doxorubicinem (DOX) v koncentraci 1 μM .

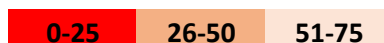
Tabulka 8: Cytotoxická aktivita VIT1–VIT6 testovaná na 10 buněčných liniích (vyjádřená v % viability těchto buněk po 48 hod, koncentrace 10 μ M)

	VIT1	VIT2	VIT3	VIT4	VIT5	VIT6	DOX
Jurkat	89 \pm 80	102 \pm 15	84 \pm 90	90 \pm 90	97 \pm 11	95 \pm 70	2 \pm 10
MOLT-4	81 \pm 20	92 \pm 70	74 \pm 13	77 \pm 15	76 \pm 15	80 \pm 11	2 \pm 20
A549	97 \pm 13	105 \pm 15	104 \pm 14	86 \pm 14	98 \pm 12	99 \pm 16	12 \pm 50
HT-29	73 \pm 50	66 \pm 20	53 \pm 60	79 \pm 90	60 \pm 60	71 \pm 80	34 \pm 30
PANC-1	89 \pm 20	95 \pm 20	99 \pm 22	84 \pm 20	85 \pm 20	99 \pm 27	71 \pm 70
A2780	86 \pm 20	78 \pm 20	87 \pm 14	83 \pm 10	86 \pm 21	75 \pm 14	7 \pm 20
HeLa	101 \pm 17	108 \pm 60	104 \pm 12	99 \pm 14	106 \pm 12	116 \pm 40	9 \pm 10
MCF-7	80 \pm 70	90 \pm 70	81 \pm 90	76 \pm 13	80 \pm 14	83 \pm 12	36 \pm 40
SAOS-2	93 \pm 27	104 \pm 32	117 \pm 39	100 \pm 34	95 \pm 18	99 \pm 15	11 \pm 30
MRC-5	100 \pm 13	108 \pm 18	102 \pm 20	98 \pm 16	100 \pm 13	104 \pm 10	33 \pm 12

Tabulka 9: Cytotoxická aktivita VIT7–VIT12 testovaná na 10 buněčných liniích (vyjádřená v % viability těchto buněk po 48 hod, koncentrace 10 μ M)

	VIT7	VIT8	VIT9	VIT10	VIT11	VIT12	DOX
Jurkat	99 \pm 30	96 \pm 60	84 \pm 80	94 \pm 20	120 \pm 30	99 \pm 12	2 \pm 10
MOLT-4	77 \pm 70	78 \pm 20	61 \pm 11	80 \pm 70	94 \pm 40	94 \pm 10	2 \pm 20
A549	98 \pm 17	90 \pm 80	9 \pm 30	82 \pm 80	123 \pm 20	129 \pm 25	12 \pm 50
HT-29	79 \pm 40	78 \pm 30	7 \pm 40	79 \pm 60	61 \pm 80	32 \pm 30	34 \pm 30
PANC-1	98 \pm 15	91 \pm 11	116 \pm 20	104 \pm 20	145 \pm 15	136 \pm 18	71 \pm 70
A2780	80 \pm 22	87 \pm 29	93 \pm 23	80 \pm 17	96 \pm 19	95 \pm 18	7 \pm 20
HeLa	102 \pm 17	105 \pm 20	3 \pm 30	94 \pm 20	129 \pm 18	134 \pm 20	9 \pm 10
MCF-7	84 \pm 50	83 \pm 70	13 \pm 40	83 \pm 40	94 \pm 30	59 \pm 12	36 \pm 40
SAOS-2	93 \pm 10	85 \pm 14	60 \pm 12	95 \pm 20	107 \pm 21	94 \pm 20	11 \pm 30
MRC-5	102 \pm 80	103 \pm 50	3 \pm 20	102 \pm 90	123 \pm 30	125 \pm 18	33 \pm 12

Vysvětlivka k heatmap udávající % viability buněk po 48 hod působení derivátů v koncentraci 10 μ M

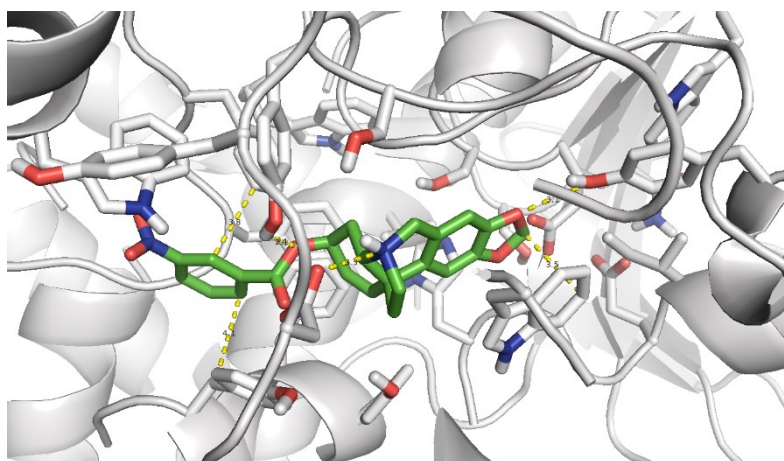


5.4. Molekulové dokování

V této části práce jsou popsány nejlepší dokovací pózy molekul derivátů, které při testování inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE Ellmanovou metodou vykazaly největší inhibiční potenciál.

Nejlepší dokovací pózy ligandů s lidskou AChE a BuChE jsou zobrazeny na obrázcích 39 a 40. Zeleně jsou zobrazeny struktury ligandů, žluté přerušované linie znázorňují specifické intermolekulární interakce (iontové vazby, vodíkové vazby, π - π interakce nebo π -kation interakce), struktury enzymů jsou pak znázorněny šedou barvou.

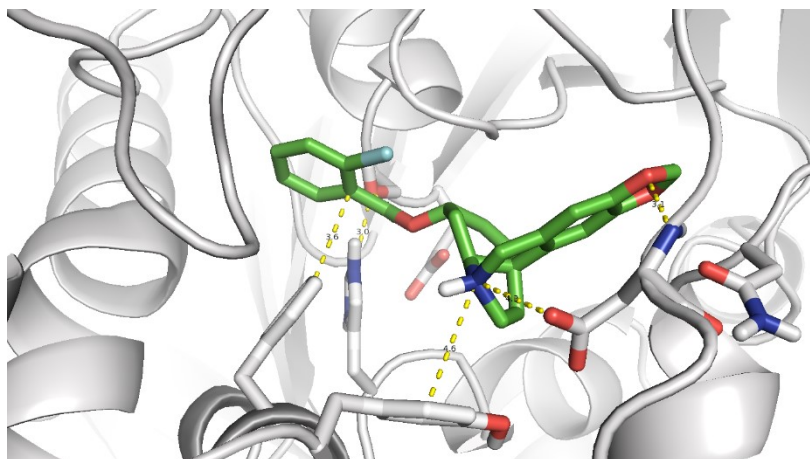
Na obrázku 39 je zobrazena nejlépe hodnocená dokovací póza molekuly VIT7 s lidskou AChE.



Obrázek 39: Nejlépe hodnocená dokovací póza VIT7 a lidské AChE

Tato dokovací póza vykazuje iontovou vazbu mezi Asp74 a protonovaným dusíkem, který je součástí tetrahydroisochinolinové části VIT7. Dále se zde nachází dvě vodíkové vazby, první mezi hydroxylovou skupinou Tyr124 a karbonylem esterové skupiny, druhá mezi hydroxylovou skupinou Tyr133 a kyslíkem, který je součástí dioxolanového kruhu. Také můžeme pozorovat π - π interakce, a to mezi Trp86 a benzendioxolanovým motivem, mezi Tyr341 a 3-nitrobenzoyl strukturou, a π - π interakci tvaru T mezi Phe297 a 3-nitrobenzoyl strukturou.

Na obrázku 40 je dále zobrazena nejlépe hodnocená dokovací póza molekuly VIT6 s lidskou BuChE.



Obrázek 40: Nejlépe hodnocená dokovací póza VIT6 a lidské BuChE

Nejlépe hodnocená dokovací póza této sloučeniny vykazuje také iontovou vazbu, a to mezi Asp70 a protonovaným dusíkem z tetrahydroisochinolinové části VIT6. Vodíkovou vazbu pozorujeme mezi Asp70 a kyslíkem, který je součástí dioxalanového kruhu, dále mezi hydroxylovou skupinou Ser198 a karbonylem esterové skupiny a mezi His438 a tímž karbonylem. Dále se zde nachází kation- π interakce mezi Tyr332 a protonovaným dusíkem tetrahydroisochinolinové části VIT6 a π - π interakce T tvaru mezi Phe329 a 2-chlorobenzoyl strukturou.

6. DISKUZE A ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo připraveno celkem 12 polosyntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidu vittatinu, a to obměnou jeho struktury na hydroxylové skupině v poloze C-3. Podstatou těchto syntéz byla reakce alkaloidu vittatinu s různě substituovanými benzoylchloridy za vzniku příslušných aromatických esterů. Všechny reakce probíhaly v prostředí bezvodého pyridinu a s katalytickým množstvím DMAP. Výtěžek u všech připravených sloučenin přesahoval 49,98 %, jejich strukturní identifikace byla provedena pomocí NMR, ESI-HRMS a změřením optické otáčivosti. Deriváty byly následně převedeny na hydrochloridy a testovány na biologickou aktivitu.

U všech 12 derivátů byl Ellmanovou metodou na rekombinantních enzimech testován potenciál inhibovat AChE a BuChE. Významnější inhibiční aktivitou vůči AChE se vyznačovaly VIT7 ($IC_{50} = 12,44 \pm 0,08 \mu M$), který se prokázal jako mírně aktivní i vůči BuChE, a VIT9 ($IC_{50} = 17,01 \pm 0,39 \mu M$), mírnou inhibiční aktivitou pak VIT10 ($IC_{50} = 36,98 \pm 0,37 \mu M$). Stejně jako u již zmíněných studií, jejichž náplní byla příprava derivátů haemanthaminu^{70,72}, i v této práci vykazala největší inhibiční aktivitu vůči AChE sloučenina obsahující nitroskupinu na benzoylové části struktury v poloze 3.

Naopak u BuChE se kromě VIT9 a VIT10 alespoň mírně potenciálně aktivní jeví všechny ostatní deriváty, především pak VIT6 ($IC_{50} = 5,44 \pm 0,06 \mu M$) a VIT2 ($IC_{50} = 7,97 \pm 0,02 \mu M$). To, že VIT7 vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE, je zejména při léčbě Alzheimerovy choroby velice výhodná vlastnost, jelikož látky schopné inhibovat oba tyto enzymy se v terapii ukazují jako nejúčinnější⁵.

V následujících dvou tabulkách (Tabulka 10, Tabulka 11) jsou porovnány hodnoty IC_{50} připravených derivátů vittatinu vůči AChE a BuChE s deriváty 3 dalších Amaryllidaceae alkaloidů (haemanthamin, ambellin, lykorin). U těchto alkaloidů byly provedeny substituce pomocí stejných benzoylchloridů jako u vittatinu, pouze v odlišných polohách hydroxylové skupiny, a to v poloze C-11 v případě haemanthaminu a ambellinu a v polohách C-1 a C-2 u lykorinu (Obrázek 41). Deriváty lykorinu mají z těchto 4 sérií nejhorší výsledky, kdy ani jeden připravený analog neprokázal inhibiční aktivitu ani vůči jedné z cholinesteras. Deriváty ambellinu také nevykazují významné hodnoty IC_{50} , můžeme zde ale pozorovat jeden zajímavý výsledek, a to u 11-O-(3-methoxybenzoyl)ambellinu vůči BuChE ($IC_{50} = 6,2 \pm 0,4 \mu M$). Nejlepších výsledků z hlediska inhibice cholinesteras dosahují deriváty vittatinu

a haemanthaminu, v případě inhibice AChE jsou na tom o něco lépe deriváty haemanthaminu. Důkazem může být hodnota IC_{50} vůči AChE, která byla v případě 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatinu $12,44 \pm 0,08 \mu\text{M}$ a v případě 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu $4,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ^{12,52,70,73}.

Tabulka 10: Srovnání hodnot IC_{50} derivátů vittatinu, haemanthaminu, ambellinu a lykorinu vůči AChE^{12,52,70,73}

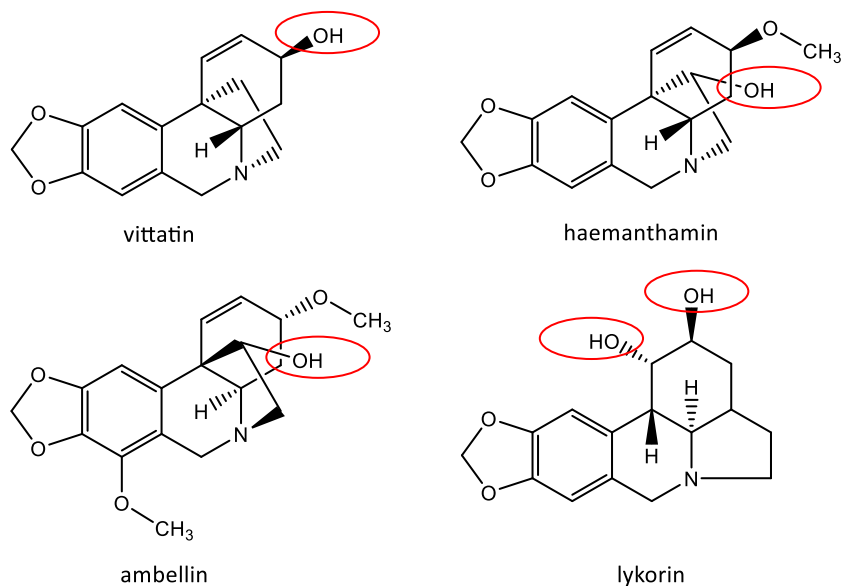
substituce na hydroxylové skupině	IC_{50} (μM) – AChE			
	vittatin	haemanthamin	ambellin	lykorin
4-methylbenzoyl	> 100	> 100	> 100	nt
2-methylbenzoyl	> 100	$18,2 \pm 1,30$	nt	nt
3-methylbenzoyl	> 100	> 100	nt	> 100
2-methoxybenzoyl	> 100	> 100	nt	nt
3-methoxybenzoyl	> 100	> 100	> 100	nt
2-chlorobenzoyl	> 100	$13 \pm 0,80$	nt	> 100
3-nitrobenzoyl	$12,44 \pm 0,08$	$4,0 \pm 0,30$	$48 \pm 20,00$	> 100
4-nitrobenzoyl	> 100	$14,7 \pm 1,80$	> 100	> 100
4-chloro-3-nitrobenzoyl	$17,01 \pm 0,39$	nt	nt	nt
4-methyl-3-nitrobenzoyl	$36,98 \pm 0,37$	nt	$53,67 \pm 4,37$	> 100
1-naphthoyl	> 100	nt	nt	nt
2-naphthoyl	> 100	nt	nt	nt

nt = netestováno

Tabulka 11: Srovnání hodnot IC_{50} derivátů vittatinu, haemanthaminu, ambellinu a lykorinu vůči BuChE^{12,52,70,73}

substituce na hydroxylové skupině	IC_{50} (μM) – BuChE			
	vittatin	haemanthamin	ambellin	lykorin
4-methylbenzoyl	$57,18 \pm 0,25$	> 100	$28 \pm 1,00$	nt
2-methylbenzoyl	$7,97 \pm 0,02$	$6,6 \pm 1,20$	nt	nt
3-methylbenzoyl	$44,22 \pm 0,55$	$26 \pm 2,60$	nt	> 100
2-methoxybenzoyl	$21,87 \pm 0,12$	$3,3 \pm 0,40$	nt	nt
3-methoxybenzoyl	$67,32 \pm 0,43$	$75,5 \pm 12,50$	$6,2 \pm 0,40$	nt
2-chlorobenzoyl	$5,44 \pm 0,06$	$5,6 \pm 0,60$	nt	> 100
3-nitrobenzoyl	$56,49 \pm 0,83$	> 100	$81 \pm 2,00$	> 100
4-nitrobenzoyl	$22,26 \pm 0,30$	> 100	> 100	> 100
4-chloro-3-nitrobenzoyl	> 100	nt	nt	nt
4-methyl-3-nitrobenzoyl	> 100	nt	> 100	> 100
1-naphthoyl	$29,72 \pm 0,83$	nt	nt	nt
2-naphthoyl	$15,39 \pm 0,35$	nt	nt	nt

nt = netestováno



Obrázek 41: Struktury alkaloidů s vyznačením hydroxylových skupin, na nichž byly provedeny substituce^{12,52,70,73}

Všechny sloučeniny využívané k léčbě Alzheimerovy choroby musí být schopné distribuce do centrálního nervového systému, proto byla u dvou neaktivnějších derivátů (VIT2 a VIT6) testována schopnost prostupovat přes HEB za využití metody PAMPA. Dle získaných výsledků se u obou derivátů předpokládá potenciál pasivně přestupovat přes HEB.

VIT2 a VIT6 byly dále podrobeny testování na inhibici agregace β -amyloidu. Hromaděním a agregací této látky v extracelulárním prostoru v mozku vznikají senilní plaky, což je jeden ze symptomů, který se objevuje u pacientů s Alzheimerovou chorobou⁸⁸. Výsledné hodnoty testování byly $44,92 \pm 5,03$ % pro VIT2 a $32,58 \pm 3,62$ % pro VIT6. V porovnání s referenčním inhibitorem doxycyklinem, jehož inhibiční aktivita byla kolem 100 %, jsou tyto deriváty pouze mírnými inhibitory agregace β -amyloidu.

Poznatky ohledně inhibice cholinesteras získané *in vitro* byly následně doplněny dokovacími studii, díky kterým tak můžeme předpokládat určitou orientaci ligandu v aktivním místě lidské AChE a BuChE a u jednotlivých derivátů identifikovat části struktur, které jsou výhodné pro navázání do aktivního místa těchto enzymů souvisejících s Alzheimerovou chorobou. Co se týká výsledků tohoto molekulového dokování, při interakci protonovaného dusíku VIT7 s Asp74 lidské AChE předpokládáme silnější iontovou vazbu, jejíž délka byla 3,3 Å, zatímco při interakci protonovaného dusíku VIT6 s Asp70 BuChE byla délka iontové vazby 4,3 Å. V případě AChE dochází k vazbě ligandu pouze do periferního anionického místa, přičemž aktivní místo není vyplněno. Naopak u BuChE se ligand váže

přímo do aktivního místa. Tyto rozdíly lze vysvětlit odlišnou strukturou enzymů AChE a BuChE, kdy kavita BuChE je širší a nenachází se zde zúžené hrdlo, které by bránilo vstupu ligandu do aktivního místa, jako je tomu v případě AChE. Rozdílem ve velikosti kavit mezi AChE a BuChE lze také vysvětlit odlišnou orientaci ligandu v receptoru. V případě AChE byl pozorován vstup ligandu dioxolanovým kruhem napřed směrem do kavity enzymu a orientace benzoylové části ven. U BuChE naopak ligand vstupoval do kavity enzymu nejprve benzoylovou částí. V tomto srovnání hraje roli i lipofilita substituentů testovaných derivátů, kdy hydrofilní nitroskupina v případě VIT7 se přednostně orientuje směrem ven z enzymu, zatímco lipofilní 2-chlorobenzoyl substituent v případě VIT6 přednostně směrem dovnitř. Celkově lze hodnotit velmi dobré vyplnění kavity BuChE molekulou VIT6, naopak u AChE nedošlo ke kompletnímu vyplnění aktivního místa, což může být předmětem pro další modifikace struktury.

U všech připravených derivátů vittatinu byla rovněž testována cytotoxická aktivita, a to na 9 nádorových buněčných liniích (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a 1 nenádorové (MRC-5). Po 48 h působení VIT9 v koncentraci 10 μ M byla pozorována nízká hodnota viability hned u 4 nádorových buněčných linií, konkrétně A549 ($9 \pm 3 \%$), HT-29 ($7 \pm 4 \%$), HeLa ($3 \pm 3 \%$) a MCF-7 ($13 \pm 4 \%$). Bohužel ale nepůsobí selektivně pouze na nádorové buňky. Hodnota viability u nenádorové buněčné linie MRC-5 je pouze $3 \pm 2 \%$, a kvůli silnému cytotoxickému účinku na zdravé buňky se tato sloučenina stává prakticky nepoužitelnou pro terapii nádorových onemocnění. Kromě VIT9 byl cytotoxický potenciál pozorován také u VIT12. Ten vykázal významnější cytotoxické účinky pouze vůči jedné nádorové buněčné linii (HT-29) s hodnotou viability $32 \pm 3 \%$. Velkou výhodou je v tomto případě právě selektivní působení vůči nádorovým buňkám. Hodnota viability u MRC-5 je zde $125 \pm 18 \%$ a tato látka by tak potenciálně mohla být předmětem dalších studií ohledně cytotoxických účinků a možností využití v léčbě nádorových onemocnění.

Co se týká srovnání s polosyntetickými deriváty dalších Amaryllidaceae alkaloidů, ani jeden z derivátů lykorinu a ambellinu připravených v rámci diplomových prací nevykazoval významnou cytotoxickou aktivitu. U derivátů ambellinu, které ve struktuře obsahují β -5,10*b*-ethano můstek, se nejedná o překvapivý výsledek vzhledem k tomu, že již v dřívějších studiích byla pro cytotoxické účinky potvrzena nutnost α orientace 5,10*b*-ethano můstku u alkaloidů krinanového typu. Na Katedře farmaceutické botaniky již bylo připraveno několik desítek analog haemanthaminu, bohužel ale ani u těchto sloučenin nebyla

zaznamenána významná cytotoxická aktivita. Jedinou zajímavou látkou je derivát LC-70 připravený v rámci diplomové práce Viery Bodoríkové, avšak jeho struktura dosud nebyla zveřejněna kvůli plánovanému podání patentové přihlášky. Negativní cytotoxická aktivita sloučenin na nádorové a zejména na nenádorové buňky může být naopak výhodná při využití těchto látek k léčbě Alzheimerovy choroby, která tak má méně nežádoucích účinků^{12,52,71,72,73}.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ Petrovska B. B.: Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **6**, 1 (2012).
- ² Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha 2016.
- ³ <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics> (cit. 6. 1. 2020)
- ⁴ Nair J. J., van Staden J.: The Amaryllidaceae as a source of antiplasmodial crinane alkaloid constituents. *Fitoterapia* **134**, 305-313 (2019).
- ⁵ Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékáren.* **7**, 39-41 (2011).
- ⁶ Jiráček R.: Galanthamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Česká a Slovenská Psychiatrie* **111** (2015).
- ⁷ Evidente A., Andolfi A., Abou-Donia A. H., Touema S. M., Hammoda H. M., Shawky E., Motta A.: (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **65**, 2113-2118, (2004).
- ⁸ De Andrade J. P., Pigni N. B., Torras-Claveria L., Guo Y., Berkov S., Reyes-Chilpa R., el Amrani A., Zuanazzi J. A. S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. Latinoam. Quim.* **40**, 83-98 (2012).
- ⁹ Ortiz J. E., Berkov S., Pigni N. B., Theoduloz C., Roitman G., Tapia A., Bastida J., Feresin G. E.: Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules* **17**, 13473-13482 (2012).
- ¹⁰ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/BioCyc:META_PWY-7826 (cit. 9. 1. 2020)
- ¹¹ Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chem. Biodiversity* **10**, 1120-1127 (2013).
- ¹² Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., Martínez González L., Hrabínová M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L.: Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. *Molecules* **24**, 1307 (2019).

- ¹³ McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., Brennan J. D., Bastida J.: Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 5290-5294 (2010).
- ¹⁴ Sabiu S., Madende M., Ajao A. A. N., Aladodo R. A., Nurain I. O., Ahmad J. B., v knize: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (Watson E., Preedy V., ed.), kap. 9. Academic Press, druhé vydání, 2019.
- ¹⁵ Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., Breiterová K., Blunden G., Hulcová D., Opletal L.: The genus *Nerine* herb. (Amaryllidaceae): ethnobotany, phytochemistry, and biological activity. *Molecules* 24, 4238 (2019).
- ¹⁶ Cedrón J. C., Del Arco-Aguilar M., Estévez-Braun A., Ravelo Á. G., v knize: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, sv. 68, kap. 1. Academic Press, 2010.
- ¹⁷ Torras-Claveria L., Tallini L., Viladomat F., Bastida J., v knize: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII* (Muñoz-Torrero D., Riu M., Feliu C., ed.), kap. 5. Research Signpost, Kerala 2017.
- ¹⁸ Marková J.: *Syntéza derivátů haemanthaminu*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.
- ¹⁹ Jánská L.: *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod Zephyranthes*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
- ²⁰ http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p3156546.jpg (cit. 7. 1. 2020)
- ²¹ http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p5152477.jpg (cit. 7. 1. 2020)
- ²² <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:66177-1#image-gallery> (cit. 7. 1. 2020)
- ²³ <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2> (cit. 6. 1. 2020)
- ²⁴ He M., Qu C., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv.* 5, 16562-16574 (2015).
- ²⁵ Mišáková K.: *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita 1*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2014.
- ²⁶ Gábrlová L.: *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.

- ²⁷ Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F., v knize: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (Muñoz-Torrero D., ed.), kap. 3. Transworld Research Network, Kerala 2011.
- ²⁸ Takos A., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11713-11741 (2013).
- ²⁹ Kilgore M. B., Kutchan T. M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochem. Rev.* **15**, 317-337 (2016).
- ³⁰ Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* **107**, 701-708 (2013).
- ³¹ Hulcová D.: *Biologická aktivita alkaloidů Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae)*, Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- ³² Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., Majorošová M., Opletal L., Hošťálková A., Jenčo J., Řezáčová M., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *Narcissus L. cv. Professor Einstein* and their cytotoxic activity. *Plants* **9**, 137 (2020).
- ³³ Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Hošťálková A., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Opletal L., De Simone A., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master* as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* **165**, 112055 (2019).
- ³⁴ Krejčí A.: *Alkaloidy vybraných druhů čeledi Amaryllidaceae, jejich toxicita a biologická aktivita (in vitro studie) I*, Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2014.
- ³⁵ Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudencio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L.: Alkaloids from *Narcissus poeticus cv. Pink Parasol* of various structural types and their biological activity. *Arch. Pharmacol. Res.* **41**, 208-218 (2018).
- ³⁶ Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefrane F., Mathieu D., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.* **73**, 1223-1227 (2010).

- ³⁷ Havelek R., Muthna D., Tomšík P., Královec K., Seifrtová M., Cahlíková L., Hošťálková A., Šafratová M., Perwein M., Čermáková E., Řezáčová M.: Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem.-Biol. Interact.* **275**, 121-132 (2017).
- ³⁸ McNulty J., Nair J. J., Bastida J., Pandey S., Griffin C.: Structure activity studies on the crinane alkaloid apoptosis-inducing pharmacophore. *Nat. Prod. Commun.* **4** (2009).
- ³⁹ Shawky E.: In-silico profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *J. Pharm. Pharmacol.* **69**, 1592-1605 (2017).
- ⁴⁰ <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf> (cit. 13. 1. 2020)
- ⁴¹ Josef M.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí: 4., zcela přepracované a doplněné vydání.* Grada Publishing as., Praha 2010.
- ⁴² Hejmadi M.: *Introduction to cancer biology.* Bookboon, 2014.
- ⁴³ Breiterová K.: *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění,* Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- ⁴⁴ Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochem. Lett.* **13**, 394-398 (2015).
- ⁴⁵ Vlček J.: *Klinická farmacie I.* Grada Publishing as., Praha 2010.
- ⁴⁶ Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 212-214 (2004).
- ⁴⁷ Elgorashi E. E., Stafford G. I., van Staden J.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **70**, 260-262 (2004).
- ⁴⁸ Boit H. G.: Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chem. Ber.* **89**, 1129-1134 (1956).
- ⁴⁹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vittatine> (cit. 9. 1. 2020)
- ⁵⁰ Kornienko A., Evidente A.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem. Rev.* **108**, 1982-2014 (2008).

- ⁵¹ Uyeo S., Kotera K., Okada T., Takagi S., Tsuda Y.: Occurrence of the alkaloids vittatine and haemanthamine in *Lycoris radiata* HERB. Chem. Pharm. Bull. 14, 793-794 (1966).
- ⁵² Lipovská K.: *Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
- ⁵³ <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/HippeastrumSpeciesTwo#> (cit. 8. 1. 2020)
- ⁵⁴ Aboul-Ela M. A., El-Lakany A. M., Hammoda H. M.: Alkaloids from the bulbs of *Crinum bulbispermum*. Pharmazie 59, 894-896 (2004).
- ⁵⁵ Bastida J., Contreras J., Codina C., Wright C. W., Phillipson J. D.: Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. Phytochemistry 40, 1549-1551 (1995).
- ⁵⁶ Kihara M., Koike T., Imakura Y., Kida K., Shingu T., Kobayashi S.: Alkaloidal constituents of *Hymenocallis rotata* HERB. (Amaryllidaceae). Chem. Pharm. Bull. 35, 1070-1075 (1987).
- ⁵⁷ Wagner J., Pham H. L., Döpke W.: Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. – 5. Circular dichroism studies. Tetrahedron 52, 6591-6600 (1996).
- ⁵⁸ Hoshino O.: *The Alkaloids*, sv. 51. Academic Press, 1998.
- ⁵⁹ Kreh M., Matusch R.: *O*-Methyloduline and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. Phytochemistry 38, 1533-1535 (1995).
- ⁶⁰ Aniszewski T.: *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*. Elsevier, 2015.
- ⁶¹ http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p9029728.jpg (cit. 8. 1. 2020)
- ⁶² <https://botany.cz/foto3/crinbulbisherb5.jpg> (cit. 8. 1. 2020)
- ⁶³ <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:65959-1#image-gallery> (cit. 8. 1. 2020)
- ⁶⁴ http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/paraman1/r/Amaryllidaceae_Hymenocallis_rotata_109391.html (cit. 8. 1. 2020)
- ⁶⁵ Bohno M., Sugie K., Imase H., Yusof Y. B., Oishi T., Chida N.: Total synthesis of Amaryllidaceae alkaloids, (+)-vittatine and (+)-haemanthamine, starting from D-glucose. Tetrahedron 63, 6977-6989 (2007).
- ⁶⁶ Silva A. F. S., De Andrade J. P., Machado K. R. B., Rocha A. B., Apel M. A., Sobral M. E. G., Henriques A. T., Zuanazzi, J. A. S.: Screening for cytotoxic activity of extracts

- and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine* 15, 882-885 (2008).
- ⁶⁷ Cedrón J. C., Ravelo Á. G., León L. G., Padrón J. M., Estévez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 20, 13854-13863 (2015).
- ⁶⁸ <https://www.who.int/ith/diseases/malaria/en/> (cit. 12. 1. 2020)
- ⁶⁹ Cahlíková L., Kawano I., Řezáčová M., Blunden G., Hulcová D., Havelek R.: The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochem. Rev.*, accepted 2020.
- ⁷⁰ Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Kohelová E., De Simone A., Al Mamun A., Hulcová D., Marková J., Kučera T., Jun D., Šafratová M., Maříková J., Andrisano V., Jenčo J., Kuneš J., Martinez A., Nováková L., Cahlíková L.: Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, revision processing 2020.
- ⁷¹ Bodoríková V.: *Syntéza derivátů haemanthaminu a jejich biologická aktivita*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- ⁷² Homolková L.: *Deriváty Amaryllidaceae alkaloidu haemanthaminu jako potenciální léčiva*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- ⁷³ Ritomská A.: *Derivatives of Amaryllidaceae alkaloids as drugs*, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- ⁷⁴ Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., Kučera T., Šafratová M., Nováková L., Shmith M., Janoušek J., Kuneš J., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum cv. Ferrari*, and their semisynthetic derivatives as potential drugs for treatment of Alzheimer's disease. *S. Afr. J. Bot.*, submitted manuscript 2020.
- ⁷⁵ Zeman J., Vetchý D., Franc A., Pitschmann V.: Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. *Chem. Listy* 112, 434-439 (2018).
- ⁷⁶ Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95 (1961).
- ⁷⁷ Cahlíková L., Valterová I., Macáková K., Opletal L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 575-580 (2011).

- ⁷⁸ Chalupová K., Korábečný J., Bartolini M., Monti B., Lamba D., Caliandro R., Pesaresi A., Brazzolotto X., Gastellier A., Nachon F., Pejchal J., Jarošová M., Hepnarová V., Jun D., Hrabínová M., Doležal R., Žďárová Karasová J., Mžík M., Křištofiková Z., Misík J., Múčková L., Jost P., Soukup O., Benková M., Setnička V., Habartová L., Chvojková M., Kletečková L., Valeš K., Mezeiová E., Uliassi E., Vališ M., Nepovimová E., Bolognesi M. L., Kuča K.: Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **168**, 491-514 (2019).
- ⁷⁹ Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V.: Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99 (1963).
- ⁸⁰ Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E.: UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612 (2004).
- ⁸¹ Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J.: AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2791 (2009).
- ⁸² Kučera T.: *Interakce malých molekul s proteiny in silico*, Doktorská disertační práce. Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, 2019.
- ⁸³ Advanced Chemistry Development, Inc.: *Chemsketch*, Toronto 2007.
- ⁸⁴ O'Boyle N. M., Banck M., James C. A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G. R.: Open babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* **3**, 33 (2011).
- ⁸⁵ Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G. R.: Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.* **4** (2012).
- ⁸⁶ Trott O., Olson A. J.: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461 (2009).
- ⁸⁷ Schrodinger, LLC: *The PyMOL molecular graphics system*, verze 1.7.4., 2015.
- ⁸⁸ Chen G. F., Xu T. H., Yan Y., Zhou Y. R., Jiang Y., Melcher K., Xu H. E.: Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 1205-1235 (2017).

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Galanthus nivalis</i> ²⁰ , <i>Leucojum aestivum</i> ²¹ a <i>Narcissus pseudonarcissus</i> ²²	11
Obrázek 2: Schéma biosyntézy <i>O</i> -methylnorbelladinu, prekursoru Amaryllidaceae alkaloidů ²⁸	13
Obrázek 3: Schéma biosyntézy základních struktur Amaryllidaceae alkaloidů ^{15,30}	14
Obrázek 4: Struktura lykorinu	15
Obrázek 5: Struktura homolykorinu	16
Obrázek 6: Struktura galanthaminu	17
Obrázek 7: Struktura krininu a haemanthaminu	18
Obrázek 8: Struktura pankratistatinu	19
Obrázek 9: Struktura tazettinu	19
Obrázek 10: Struktura montaninu	20
Obrázek 11: Struktura belladinu	21
Obrázek 12: Struktura vittatinu	24
Obrázek 13: Schéma biosyntetické cesty vittatinu ²⁹	26
Obrázek 14: <i>Hippeastrum vittatum</i> (Hvězdník proužkovaný) ⁵³	27
Obrázek 15: Příklady druhů čeledi Amaryllidaceae, v nichž se vyskytuje alkaloid vittatin; zleva <i>Amaryllis belladonna</i> ⁶¹ , <i>Crinum bulbispermum</i> ⁶² , <i>Narcissus cantabricus</i> ⁶³ , <i>Hymenocallis rotata</i> ⁶⁴	27
Obrázek 16: Struktury Amaryllidaceae alkaloidů testovaných na cytotoxickou aktivitu ³⁸	28
Obrázek 17: Závislost apoptózy Jurkat buněk (%) na koncentraci vittatinu ³⁸	29
Obrázek 18: Struktura vittatinu a jeho enantiomeru krininu	29
Obrázek 19: Struktura haemanthaminu	33
Obrázek 20: Příprava alifatických a aromatických esterů haemanthaminu ¹²	34
Obrázek 21: Příprava aromatických derivátů haemanthaminu ⁷⁰	35
Obrázek 22: Příprava derivátů ambellinu ⁷³	36
Obrázek 23: Příprava derivátů VIT1–VIT12 z alkaloidu vittatinu	40
Obrázek 24: Detekce na TLC desce pomocí UV lampy při 254 nm	40
Obrázek 25: Detekce na TLC desce postřikem Dragendorffovým činidlem	41
Obrázek 26: Průběh hydrolytické reakce za použití substrátu a Ellmanova činidla (DTNB) ⁷⁵	45
Obrázek 27: Struktura 3- <i>O</i> -(4-methylbenzoyl)vittatinu (VIT1)	48
Obrázek 28: Struktura 3- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)vittatinu (VIT2)	49
Obrázek 29: Struktura 3- <i>O</i> -(3-methylbenzoyl)vittatinu (VIT3)	50
Obrázek 30: Struktura 3- <i>O</i> -(2-methoxybenzoyl)vittatinu (VIT4)	51
Obrázek 31: Struktura 3- <i>O</i> -(3-methoxybenzoyl)vittatinu (VIT5)	52
Obrázek 32: Struktura 3- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)vittatinu (VIT6)	53
Obrázek 33: Struktura 3- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT7)	54
Obrázek 34: Struktura 3- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT8)	55
Obrázek 35: Struktura 3- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT9)	56
Obrázek 36: Struktura 3- <i>O</i> -(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatinu (VIT10)	57

Obrázek 37: Struktura 3- <i>O</i> -(1-naphthoyl)vittatinu (VIT11)	58
Obrázek 38: Struktura 3- <i>O</i> -(2-naphthoyl)vittatinu (VIT12)	59
Obrázek 39: Nejlépe hodnocená dokovací póza VIT7 a lidské AChE	64
Obrázek 40: Nejlépe hodnocená dokovací póza VIT6 a lidské BuChE	65
Obrázek 41: Struktury alkaloidů s vyznačením hydroxylových skupin, na nichž byly provedeny substituce ^{12,52,70,73}	68

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty IC ₅₀ [μg/ml] alkaloidního extraktu a izolovaných alkaloidů z <i>H. vittatum</i> ⁶⁶	30
Tabulka 2: Inhibiční aktivita vittatinu a dalších alkaloidů vůči AChE a BuChE ¹¹	31
Tabulka 3: Výsledky hodnocení antibakteriální a antitumorigenní aktivity alkaloidů izolovaných z <i>A. belladonna</i> L. (uvedené jako inhibiční zóna v mm a MIC [μg/ml]) ⁷	32
Tabulka 4: Výtěžky připravených derivátů (mg; %) a hmotnosti hydrochloridů derivátů (mg)	60
Tabulka 5: Procentuální inhibice a hodnoty IC ₅₀ připravených derivátů vůči AChE a BuChE..	61
Tabulka 6: Schopnost VIT2 a VIT6 pasivně přestupovat přes HEB	62
Tabulka 7: Schopnost VIT2 a VIT6 inhibovat agregaci β-amyloidu (vyjádřena v %, koncentrace 50 μM)	62
Tabulka 8: Cytotoxická aktivita VIT1–VIT6 testovaná na 10 buněčných liniích (vyjádřena v % viability těchto buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM)	63
Tabulka 9: Cytotoxická aktivita VIT7–VIT12 testovaná na 10 buněčných liniích (vyjádřena v % viability těchto buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM)	63
Tabulka 10: Srovnání hodnot IC ₅₀ derivátů vittatinu, haemanthaminu, ambellinu a lykorinu vůči AChE ^{12,52,70,73}	67
Tabulka 11: Srovnání hodnot IC ₅₀ derivátů vittatinu, haemanthaminu, ambellinu a lykorinu vůči BuChE ^{12,52,70,73}	67

10. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Iva Valachová

Školitel: Pharm.Dr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů jako látky potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění

V rámci této diplomové práce bylo acylací hydroxylové skupiny vittatinu v poloze C-3 různě substituovanými benzoylchloridy připraveno 12 odpovídajících esterů. Strukturní identifikace byla provedena pomocí NMR, ESI-HRMS a změřením optické otáčivosti. Výtěžek všech reakcí byl více než 60 %. Po převedení těchto derivátů na hydrochloridy byla testována jejich biologická aktivita.

Vzhledem k cytotoxickým účinkům vittatinu byla u těchto derivátů testována cytotoxicita na 9 nádorových a 1 nenádorové buněčné linii. Největší cytotoxickou aktivitu vykazoval 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin, který ale bohužel nepůsobí selektivně pouze na nádorové buňky. U 3-*O*-(2-naphthoyl)vittatinu bylo naopak pozorováno selektivní působení vůči nádorové buněčné linii HT-29 (kolorektální karcinom) s hodnotou viability $32 \pm 3 \%$, tato sloučenina by tak potenciálně mohla být předmětem dalších studií ohledně cytotoxicity a možného využití v léčbě nádorových onemocnění. Nicméně, negativní výsledky cytotoxické aktivity na nádorové a zejména na nenádorové buňky mohou být výhodné při léčbě Alzheimerovy choroby, která tak má méně nežádoucích účinků.

U všech těchto sloučenin byla Ellmanovou metodou za použití rekombinantních enzymů stanovena také inhibiční aktivita vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BuChE). Nejvýznamnější aktivitu vůči AChE vykazaly 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatin a 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin s hodnotami IC_{50} $12,44 \pm 0,08 \mu\text{M}$ a $17,01 \pm 0,39 \mu\text{M}$. Vůči BuChE se kromě 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatinu a 3-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatinu jako potenciálně účinné jeví všechny ostatní deriváty, především pak 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatin ($IC_{50} = 5,44 \pm 0,06 \mu\text{M}$) a 3-*O*-(2-methylbenzoyl)vittatin ($IC_{50} = 7,97 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Tyto poznatky získané *in vitro* byly

následně doplněny i o dokovací studie nejaktivnějších derivátů.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, vittatin, polosyntetické deriváty, cytotoxicita, Alzheimerova choroba

11. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Iva Valachová

Supervisor: Pharm.Dr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Derivatives of Amaryllidaceae alkaloids as potential drugs in the treatment of tumor diseases

Twelve aromatic derivatives were prepared. The substitutions were performed on the hydroxyl group at C-3. This was acylated with differently substituted benzoyl chlorides affording the corresponding esters. Structural identification was performed by 1D- and 2D-NMR, ESI-HRMS spectroscopic techniques and optical rotation measurement. The yield of all reactions was more than 60 %. After converting these derivatives to hydrochlorides, their biological activity was tested.

The Amaryllidaceae alkaloid vittaine itself exhibits cytotoxic activity and therefore its derivatives have been investigated in this respect. It has been tested against 9 cancerous and 1 non-cancerous cell lines. 3-*O*-(4-Chloro-3-nitrobenzoyl)vittatine showed the highest cytotoxic activity, unfortunately, it does not selectively affect only cancerous cells. Conversely, 3-*O*-(2-naphthoyl)vittatine has a selective effect on the HT-29 cancerous cell line (colorectal carcinoma) with a viability value of 32 ± 3 %, potentially being the subject of further studies of cytotoxicity and possible use in cancer treatment. Negative results of cytotoxic activity of cancer and mainly noncancer cells can be of benefit in the treatment of Alzheimer's disease, they can reduce the side effects.

All of these compounds were tested for acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activity by the Ellman method using recombinant enzymes. 3-*O*-(3-Nitrobenzoyl)vittatine and 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatine showed the most significant inhibitory activity against AChE with IC_{50} values $12,44 \pm 0,08$ μ M and $17,01 \pm 0,39$ μ M, respectively. Except 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatine and 3-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatine, all other derivatives, especially 3-*O*-(2-chlorobenzoyl)vittatine ($IC_{50} = 5,44 \pm 0,06$ μ M) and 3-*O*-(2-methylbenzoyl)vittatine

($IC_{50} = 7,97 \pm 0,02 \mu\text{M}$), appeared to be potentially active against BuChE. These *in vitro* findings were subsequently complemented by docking studies of the most active derivatives.

Keywords: Amaryllidaceae, vittatine, semisynthetic derivatives, cytotoxicity, Alzheimer's disease