

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus* a jeho polosyntetické deriváty

Isolation of alkaloids from *Narcissus poeticus recurvus* and its semi-synthetic derivatives

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

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

Hradec Králové, srpen 2023

Matěj Lojkásek

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

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 662.

OBSAH

ÚVOD	9
1 CÍL PRÁCE	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Čeleď Amaryllidaceae	12
2.1.1 Charakteristika	12
2.1.2 Rod <i>Narcissus</i>	13
2.1.2.1 Taxonomie a charakteristika rodu <i>Narcissus</i>	13
2.1.2.1.1 Obsahové látky rodu <i>Narcissus</i>	14
2.1.3 Biosyntéza alkaloidů rodu <i>Narcissus</i>	14
2.1.4 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich deriváty	15
2.1.4.1.1 Lykorinový typ.....	16
2.1.4.1.1.1 Deriváty lykorinu	17
2.1.4.1.2 Homolykorinový typ.....	18
2.1.4.1.3 Haemanthaminový a krininový typ.....	19
2.1.4.1.3.1 Deriváty haemanthaminu.....	20
2.1.4.1.3.2 Deriváty vittatinu	21
2.1.4.1.3.3 Deriváty ambellinu	22
2.1.4.1.4 Galanthaminový typ.....	23
2.1.4.1.5 Tazettinový typ.....	23
2.1.4.1.6 Pankratistatinový typ	24
2.1.4.1.7 Montaninový typ.....	25
2.1.4.1.8 Mesembranový typ	25
2.2 Amaryllidaceae alkaloidy v terapii AD a nádorových onemocnění	26
2.2.1 Alzheimerova choroba	26

2.2.1.1	Projevy Alzheimerovy choroby.....	26
2.2.1.2	Rizikové faktory	26
2.2.1.3	Patofyziologie	27
2.2.1.3.1	Cholinergní teorie	27
2.2.1.3.2	Amyloidová teorie.....	28
2.2.1.3.3	Teorie τ -proteinu.....	28
2.2.1.3.4	Glutamátergní systém.....	29
2.2.1.4	Terapie Alzheimerovy choroby.....	29
2.2.1.4.1	Inhibitory cholinesteras	29
2.2.1.4.2	Inhibitory β -sekretasy	32
2.2.1.4.3	Inhibitory glykogen synthasy kinasy 3β	33
2.2.1.4.4	Antagonisté NMDA receptorů	34
2.2.2	Nádorová onemocnění.....	34
2.2.2.1	Látky přírodního původu v terapii nádorových onemocnění.....	35
2.2.2.1.1	Vinkristin a vinblastin	36
2.2.2.1.2	Taxany	36
2.2.2.1.3	Deriváty kamptotecinu	36
2.2.2.1.4	Deriváty podofylotoxinu	36
2.2.2.1.5	Přírodní chemoprotektiva	36
2.2.2.1.6	Amaryllidaceae alkaloidy	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
3.1	Použitý materiál.....	38
3.1.1	Rozpouštědla, chemikálie, činidla	38
3.1.2	Rostlinný materiál	39
3.2	Izolace alkaloidů	39
3.3	Metody použity při syntéze derivátů galanthinu	40

3.3.1	Příprava derivátů galanthinu.....	40
3.3.2	Tenkvrstvá chromatografie (TLC).....	41
3.3.2.1	Stacionární fáze	41
3.3.2.2	Mobilní fáze	41
3.3.2.3	Analytická TLC.....	41
3.3.2.4	Preparativní TLC.....	41
3.3.3	Eluce	42
3.3.4	Odpařování.....	42
3.4	Strukturní analýza.....	42
3.4.1	Optická otáčivost.....	42
3.4.2	Analýza látek pomocí GC-MS	43
3.4.3	ESI-HRMS analýza	43
3.4.4	NMR analýza.....	43
3.4.5	Měření toxicity na jaterní buňky (MMT test).....	44
3.4.6	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	45
4	VÝSLEDKY	46
4.1	Izolované alkaloidy	46
4.1.1	Cheryllin.....	46
4.1.2	Galanthin	46
4.2	Syntetizované deriváty galanthinu	47
4.2.1	2-chlorobenzoylgalanthin (G1).....	47
4.2.2	2-nitrobenzoylgalanthin (G2)	48
4.2.3	3-nitrobenzoylgalanthin (G3)	48
4.2.4	Oktanoylgalanthin (G4)	49
4.2.5	Benzoylgalanthin (G5)	50
4.2.6	Acetylgalanthin (G6).....	51

4.3	Výtěžnost reakcí	51
4.4	Výsledky měření toxicity na jaterní buňky (MMT test)	52
4.5	Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči AChE/BuChE	53
5	DISKUZE A ZÁVĚR	54
6	ABSTRAKT	57
7	ABSTRACT	58

SEZNAM ZKRATEK

A549 – Plicní adenokarcinom

A β – Beta amyloid

ACh – Acetylcholin

AChE – Acetylcholinesterasa

AChEI – Inhibitory acetylcholinesterasy

AD – Alzheimerova choroba

AMK – Aminokyselina

ApoE4 – Apolipoprotein E4

APP – Amyloidový prekurzorový protein

BACE – β -sekretasa

Bcl-2 – B-buněčný lymfom-2

BuChE – Butyrylcholinesterasa

CDCl₃ – Deuterovaný chloroform

CDK-5 – Cyklin-dependentní kinasa 5

ChE – Cholinesterasa

ChAT – Cholinacetyltransferasa

CYP96T1 – Cytochrom P96T1

DMSO – Dimethylsulfoxid

DTNB – Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová

GSK – Glykogen synthasa kinasa

HeLa – Cervikální adenokarcinom

HT-29 – Kolorektální karcinom

IC₅₀ – Inhibiční koncentrace

LRP – Low-density lipoprotein receptory

M receptor – Muskarinový receptor

MCF-7 – Adenokarcinom prsu

MeCN – Acetonitril

N receptor – Nikotinový receptor

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NBS – Norbelladin syntasa

NMDA – N-methyl-D-aspartátový receptor

NR – Noroxomaritidin reduktasa

N4OMT – Norbelladin 4'-*O*-methyltransferasa

PAL – Fenylalanin amonná lyasa

PDE-4 – Fosfodiesterasa-4

RAGE – Receptor pro glykované produkty

TLC – Tenkovrstvá chromatografie

TYDC – L-tyrosin dekarboxylasa

WHO – Světová zdravotnická organizace

3,4-DHBA – Dihydroxybenzaldehyd

ÚVOD

Příroda již od dávných dob nabízela pomoc nemocným v podobě rostlinných drog. Jelikož v minulosti lidé neměli dostatečné znalosti a informace o tom, jak která rostlina působí, bylo použití jednotlivých drog více či méně na základě pokus omyl. Jak čas plynul, tak díky lepšímu poznání nemocí i rostlin byly objeveny důvody pro použití specifických rostlin k léčbě konkrétních onemocnění. Postupem času byly znalosti o rostlinách předávány z generace na generaci, které následně dosud známé poznatky doplňovali o nově získané informace¹.

Co se týče alkaloidů a alkaloidních rostlin, tak na jejich využití ve starodávném léčitelství odkazuje hliněná deska z Nagpuru ze starověké oblasti Sumer, jako příklad by se dalo uvést využití máku, blínu nebo mandragory¹. Ačkoliv jsou alkaloidy doménou hlavně vyšších rostlin, tak určitý výskyt byl dokázán u kapraďorostů, a to v plavuních (*Lycopodium spp.*) nebo přesličkách (*Equisetum spp.*). Alkaloidy byly nalezeny také u hub, a to například u rodu *Claviceps purpurea*, výjimkou nejsou ani živočichové, u nichž byly alkaloidy prokázány ve žláze mloka (*Salamandra salamandra*) nebo u stonožky (*Glomeris marginata*). Ovšem alkaloidy jsou v říši živočichů spíše vzácností. Struktura alkaloidů je odvozena od aminokyselin a tvoří ji heterocyklus, do kterého je zabudován dusík. Jsou případy, kdy dusík není součástí heterocyklu (protoalkaloidy), nebo naopak dusík je ve struktuře přítomen, ale aminokyselina není výchozí látkou biosyntézy alkaloidu (pseudoalkaloidy). Důvod, pro který jsou alkaloidy rostlinami syntetizovány není zcela jasný, jednou z možností je, že poskytují rostlinám ochranu vzhledem k jejich toxickému účinku. Ovšem není tomu tak u všech rostlin, ku příkladu rulík či chinovník jsou cílem a potravou některých druhů hmyzu. Terapeutické použití u některých nemocí umožňuje selektivní toxicita alkaloidů, což znamená, že například chinin na člověka toxicky prakticky nepůsobí, ale naopak protozoa už jsou k působení chininu citlivější. Mezi jednotlivými skupinami alkaloidů je několik strukturálních odlišností, což se podepisuje i na rozdílných účincích. Mezitím co morfin má analgetické a narkotické účinky, tak již zmíněný chinin má zase antiparazitický účinek. Dalším příkladem je antiarytmické působení chinidinu, námelové alkaloidy s uterotonickým účinkem, atropin jakožto mydriatikum nebo anestetické působení kokainu².

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae zase vykazují cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. Jejich cílem jsou také enzymy acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BuChE), které inhibují, a právě tato inhibice je klíčová při terapii Alzheimerovy choroby (AD). Jako příklad

inhibitoru AChE se uvádí galanthamin nebo jeho derivát sanguinin, jenž vykázal desetkrát větší aktivitu. Slabou aktivitu vůči AChE mají i alkaloidy norbelladinového typu, větší aktivitu však ukázaly proti BuChE³. Mezi další aktivity patří protizánětlivý efekt, který byl dokázán při in vitro studiích, antiparazitický, antivirotický, antibakteriální^{3,4}, anxiolytický a antidepressivní efekt⁴.

Přírodní látky nejsou vždy dokonalé, mají špatnou biodostupnost a nežádoucí účinky, proto jsou připravovány deriváty pro zlepšení vlastností a účinku. Z používaných látek například rivastigmin, docetaxel, irinotekan atd.

Cílem této diplomové práce, byla izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus* a syntéza derivátů galanthinu a následné měření jejich aktivity. Vzhledem k předešlým pracím lze tvrdit, že stanovená inhibiční aktivita galanthinu vůči cholinesterasám (ChE) je slabá⁵.

1 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus*, syntéza derivátů galanthinu a stanovení jejich biologické aktivity.

Dílčí cíle:

1. Provedení literární rešerše na téma Izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus* a jejich biologická aktivita
2. Izolace alkaloidu galanthaminu
3. Analýza izolovaných látek
4. Příprava derivátů odvozených od Amaryllidaceae alkaloidu galanthinu
5. Analýza připravených derivátů a stanovení jejich biologické aktivity vůči lidským cholinesterasám
6. Sepsání diplomové práce

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Čeleď Amaryllidaceae

2.1.1 Charakteristika

Zástupci čeledi amarylkovité jsou jednoděložné, krytosemenné rostliny, které se nejčastěji vyskytují v oblastech od mírného přes subtropické až tropické pásmo^{7,8}. Nalézt je můžeme v jižní Africe, Jižní Americe, Asii, střední Evropě nebo Středomoří⁸. Rozmanité je i prostředí, které obývají, najít je můžeme jak v jehličnatých, tak listnatých lesech, na loukách, u břehů řek nebo na skalnatém povrchu. Tato čeleď pokrývá zhruba 1 100 druhů a okolo 85 rodů.

Byliny vyrůstají z cibulí, hlíz nebo také oddenků. Listy mohou mít přízemní, ale také lodyžní, s čepelí, která bývá čárkovitá. Květy amarylkovitých bývají stavěné podle čísla 3, typicky jsou oboupohlavné a obvykle jednotlivé, ale mohou tvořit šroubelovitá květenství. Jako plody tato čeleď tvoří tobolky nebo bobule^{10,11}.

Mezi nejznámější zástupce řadíme rod sněženka (*Galanthus*), narcis (*Narcissus*) nebo bledule (*Leucojum*), které se běžně vyskytují i v České republice. Mezi další zástupce této čeledi patří rostliny rodu *Clivia*, *Amaryllis* nebo *Hippeastrum*, které často plní okrasnou funkci¹².



Obrázek 1: *Leucojum vernum*¹³, *Galanthus nivalis*¹⁴, *Hippeastrum striatum*¹

Hlavním důvodem, proč si amarylkovité rostliny vysloužily tak velkou pozornost, je obsah biologicky významných alkaloidů, zejména pak galanthaminu. Jako první zdroj galanthaminu byl použit rod *Galanthus* (sněženka), momentálně se k izolaci využívají narcisy⁹.

2.1.2 Rod *Narcissus*

2.1.2.1 Taxonomie a charakteristika rodu *Narcissus*

ŘÍŠE – Planteae – Rostliny

ODDĚLENÍ – Magnoliophyta – Krytosemenné rostliny

TŘÍDA – Liliopsida – Jednoděložné

ŘÁD – Asparagales – Chřestotvaré

ČELEĎ – Amaryllidaceae – Amarylkovité

PODČELEĎ – Amaryllidoideae – Amarylkové

ROD – *Narcissus* – Narcis¹⁶

Stejně jako zbytek amarylkovitých rostlin se i zástupci rodu *Narcissus* řadí mezi jednoděložné rostliny¹⁷. Vzhledem ke snadnému křížení, a tedy vzniku mezidruhových variant je složité určit přesnější počet druhů^{18,19}. Jeden zdroj uvádí 60²⁰ druhů, některý 87¹⁸ a další až 100¹⁷ druhů. Mezi oblasti s největším výskytem narcisů se řadí Pyrenejský poloostrov, středomoří, hojně rostou také v Jižní Africe. Najít je však můžeme také v Asii či u nás v mírném Evropském pásu. Stejně jako zbytek čeledi Amaryllidaceae tak i rod *Narcissus* obývá různá prostředí ať už lesy, skály, louky nebo břehy řek¹⁹.

Výška narcisu se uvádí v rozmezí 20-40 cm. Rostlina samotná vyrůstá z 2-3 cm velké cibule, listy mají typický dlouhý a úzký tvar s našedivělou barvou. Květy narcisu jsou jak u dalších zástupců této čeledi oboupohlavné, počet okvětních lístků je šest, stejně tak i tyčinek, dále v květu najdeme tři pestíky tvořící gyneceum. Významným znakem je pak pakorunka. Jednotlivé druhy se liší v barevnosti, velikosti a tvaru květů^{17,19}.

Vzhledem k tomu, že diplomová práce se týká izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus* bude v následujících větách blíže charakterizován. *Narcissus poeticus recurvus* je charakteristický pro jižní Evropu včetně Pyrenejí, běžný je však také pro Alpy. Květ je typický svou vůní, bílým zbarvením okvětních lístků a žlutou pakorunkou, která má na svém okraji červený lem. U druhu *recurvus* se uvádí dorůstá až do 35 cm a květ do šířky až 4 cm, přičemž ostatní hybridy *Narcissus poeticus* dorůstají do větších rozměrů, a to až do výšky 60 cm. Kvést tyto rostliny začínají v období od dubna do května, což je ve srovnání s ostatními narcisy

později. Stejně jako ostatní druhy i tento se snadno kříží. Pro svůj vzhled je často využíván jako okrasná rostlina v zahradnictví^{21,22}.



Obrázek 2: Květ *Narcissus poeticus*²⁵

2.1.2.1.1 Obsahové látky rodu *Narcissus*

Nejdůležitějšími obsahovými látkami jsou alkaloidy, ovšem těm je věnována až následující kapitola. Z dalších látek narcisy obsahují fenolové sloučeniny, flavonoidy, terpeny, karotenoidy, nebo z řad dalších metabolitů aminokyseliny, mono, di a trisacharidy a alifatické karboxylové kyseliny¹⁹. Z flavonoidů byly i přes nedostatek literatury, která by identifikovala přesné složení flavonoidů, popsány v narcisech isorhamnetin, kvercetin a kempferol, které se vyznačují antioxidačními schopnostmi. Mezi deseti karotenoidy, tedy sloučeninami, které se podílejí výraznou mírou na barvě květu, stanovených a předběžně charakterizovaných pomocí HPLC byly identifikovány trans-violaxanthin, trans-lutein, trans-zeaxanthin, trans- β -kryptoxanthin nebo trans- β -karoten²³. U některých druhů byly identifikovány také monoterpeny, flavany, seskviterpeny, a benzenoidy^{20,24}.

2.1.3 Biosyntéza alkaloidů rodu *Narcissus*

Výchozími látkami biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů jsou aromatické aminokyseliny, fenylalanin a tyrosin. Fenylalanin reaguje za přítomnosti fenylalanin amonné lyasy (PAL) za vzniku dihydroxybenzaldehydu (3,4-DHBA). Tyrosin je dekarboxylován na tyramin s pomocí L-tyrosin dekarboxylasy (TYDC). Následně proběhne kondenzace tyraminu s aldehydem kyseliny protokatechové za vzniku Schiffovy báze. Dalším krokem biosyntézy je tvorba norbelladinu. V tomto kroku mají důležitou roli norbelladin syntasa (NBS) a noroxomaritidin reduktasa (NR). Následně je za pomoci norbelladin 4'-O-methyltransferasy (N4OMT) norbelladin methylován. Přičemž z reakce vystupuje 4'-O-methylnorbelladin^{26,27,28,29}.

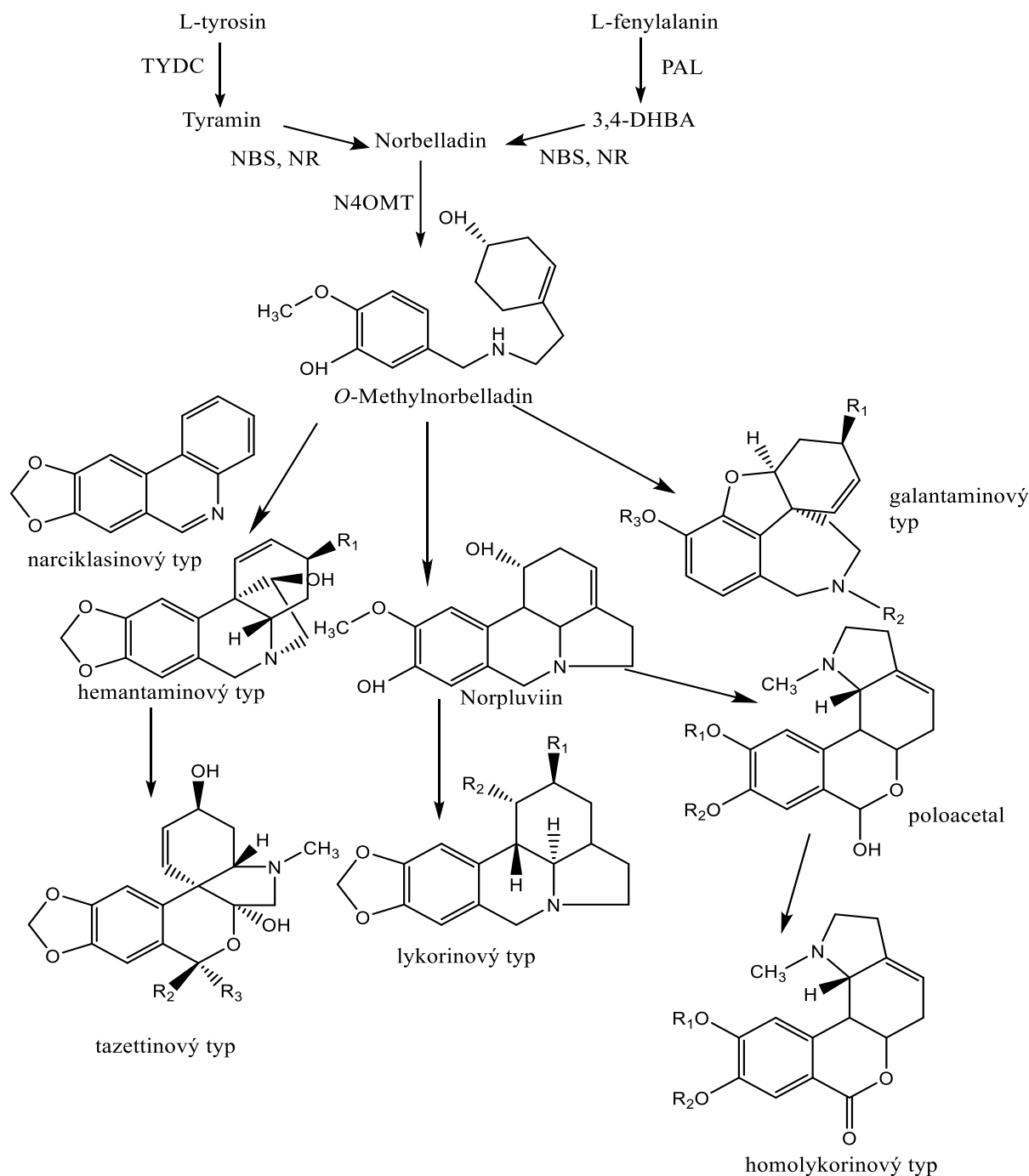
Důvodem rozmanitosti Amaryllidaceae alkaloidů jsou pak přesmyky, oxidační a redukční reakce, které probíhají právě na 4'-*O*-methylnorbelladinu²⁸.

Dalším cílem je oxidativní spojení 4'-*O*-methylnorbelladinu, k čemuž může dojít těmito způsoby. Buď dojde k cyklizaci *ortho-para*, *para-para* a *para-ortho*, dle poloh spojení v molekule. Cyklizace *para-para* dává za pomoci cytochromu P96T1 (CYP96T1) vzniknout montaninového a haemanthaminového typu alkaloidů, krininu, narciklassinu či tazettinu. Na druhou stranu vznik lykorinového a homolykorinového typu je umožněn kondenzací *ortho-para*. Do třetice galanthaminový typ je zprostředkován vazbou v poloze *para-ortho*^{30,31}.

Do souvislosti s biosyntézou galanthaminu se uvádí genové inženýrství. Jelikož při dostatečné znalosti biosyntetických drah, lze zvýšit produkci galanthaminu v rostlinách. Vhodným cílem pro inženýrství mohou být enzymy N4OMT nebo NBS, ale jako funkční se jeví také geny pro PAL1 a TYDC2, jejichž utlumením naroste produkce alkaloidů²⁹.

2.1.4 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich deriváty

U čeledi Amaryllidaceae bylo zjištěno 9 strukturních typů alkaloidů od kterých jsou odvozeny další alkaloidy. Mezi základní se řadí galanthaminový, haemanthaminový, lykorinový, krininový, narciklassinový, tazzetinový, homolykorinový, montaninový a norbelladinový strukturní typ^{5,32}. Nově se mezi tyto struktury zařazuje také plicamin a gracilin, nicméně ty pravděpodobně vycházejí z již známých typů, a to tazzetinu respektive haemanthaminu³². Rozdělení do devíti základních strukturních typů je u rodu *Narcissus*, vzácněji i u dalších amarylkovitých, obohaceno o cheryllinový, mesenbranový a galanthindolový typ¹⁹. Alkaloidem nového strukturního typu je například narcimatulin, který společně se znaky galanthindolového typu obsahuje také rysy alkaloidů galanthaminové skupiny^{5,19}.



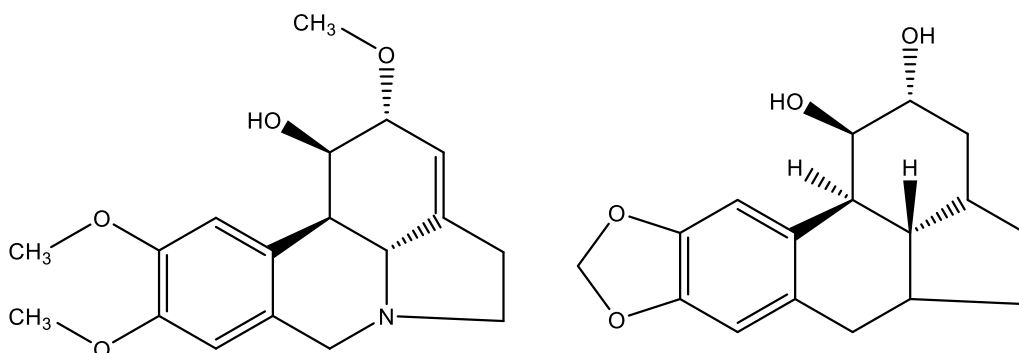
Obrázek 4: Strukturální typy alkaloidů rodu *Narcissus*³³

2.1.4.1.1 Lykorinový typ

Předlohou alkaloidů lykorinového typu je struktura pyrrol[de]fenanthridinu³⁵. Hlavním zástupcem a prvním izolovaným alkaloidem této skupiny byl roku 1877 lykorin. Mimo lykorin se mezi zástupce těchto alkaloidů řadí galanthin, pseudolykorin, karanin, pluviin, norpluviin, narcisidin, assoanin, oxoassoanin, amaerbellisin a hippeastrin^{19,36,37}. Alkaloidy lykorinového typu se řadí k nejstarším známým amarylkovitým alkaloidům⁷.

Kromě výrazné cytotoxické aktivity lykorinu vůči nádorovým buňkám myšího melanomu, leukémii, nebo Lewisovu plicnímu karcinomu, je lykorin účinný proti virům, kvasinkám, nebo jako antiparazitikum vůči *Trypanosoma brucei*. Dále byl lykorin zkoumán v souvislosti s analgetickým a herbicidním účinkem. Lykorin samotný není aktivní vůči cholinesterasám. U některých lykorinových alkaloidů však byla inhibiční aktivita vůči AChE zjištěna, podmínkou pro tento účinek je substituce na C-1 a C-2. Jedná se například o 2-O-terc-butyldimethylsilyl-1-O-(methylthio) methyllykorin, 1-O-acetyllykorin a 1-O-acetyl-2-O-terc-butyldimethylsilyllykorin. Další alkaloid lykorinového typu galanthin inhibiční aktivitu k ChE nevykazuje, avšak jeho derivát (+)-11-hydroxygalanthin aktivitou vůči AChE disponuje. Amarbellisin stejně jako pseudolykorin vykazují cytotoxickou aktivitu^{6,7,34,35,38}.

Alkaloidy lykorinového typu jsou z narcisů obsaženy v *N. nevadensis*, *N. assoanus*, *N. tazetta*, *N. bulbocodium*³³, *N. leonensis* Pugsley, *N. pseudonarcissus*, *N. poeticus*, *N. canaliculatus*, *N. jacetanus*^{36,37}.



Obrázek 5: Struktura galanthinu a lykorinu⁴¹

2.1.4.1.1.1 Deriváty lykorinu

Alkaloidy jsou s cílem změny profilu účinku převáděny vhodnými reakcemi na příslušné deriváty. Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové na Katedře farmaceutické botaniky byly v rámci diplomové práce Lipovské K. syntetizovány deriváty lykorinu a následně byla zjišťována jejich biologická aktivita. K screeningu biologické aktivity nebyly použity monoderiváty lykorinu, ale di-deriváty. Důvodem použití di-derivátů byla syntéza v dostatečném množství pro testování biologické aktivity oproti monoderivátům, jejichž screening aktivit znemožnilo právě minimální připravené množství. Konkrétně se jednalo o 1,2-di-O,O'-propionyllykorin (L1), 1,2-di-O,O'-isobutanoyllykorin (L2), 1,2-di-O,O'-benzoyllykorin (L3), 1,2-di-O,O'-(3-methyl)benzoyllykorin (L4), 1,2-di-O,O'-pentanoyllykorin (L5), 1,2-di-O,O'-hexanoyllykorin (L6), 1,2-di-O,O'-(2-nitro)benzoyllykorin (L7), 1,2-di-O,O'-(4-

ethyl)benzoyllykorin (L8), 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorin (L9), 1,2-di-*O,O'*-(4-metyl-3-nitro)benzoyllykorin (L10), 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorin (L11) a 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorin (L12). Jediný z testovaných derivátů, který prokázal schopnost inhibovat BuChE byl 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin. Ostatní deriváty vůči cholinesterasám neprokázaly inhibiční aktivitu. Bohužel u testovaných derivátů výsledky nepotvrdily ani cytotoxickou aktivitu. Momentálně jsou tyto deriváty testovány pro antimalarickou aktivitu³⁹

Tabulka č. 1: Hodnoty inhibiční koncentrace, tedy koncentrace inhibitoru, která způsobí pokles aktivity enzymu na 50 % (IC₅₀) derivátů lykorinu³⁹

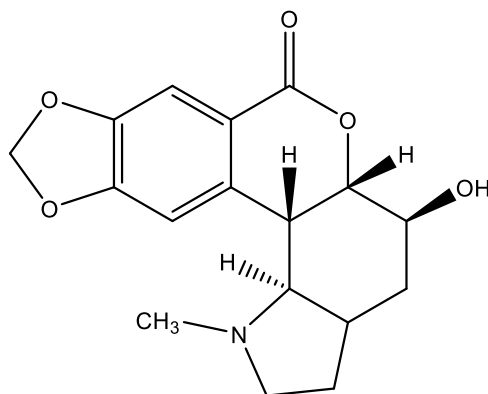
Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
Lykorin	> 1000	> 1000
L1	935 ± 227	511 ± 71
L2	301 ± 22	36 ± 4
L3	171 ± 16	29 ± 7
L4	150 ± 21	>1000
L5	nt	nt
L6	nt	nt
L7	146 ± 6	117 ± 7
L8	nt	nt
L9	149 ± 8	116 ± 7
L10	191 ± 16	264 ± 32
L11	357 ± 10	466 ± 82
L12	nt	nt
Referenční látka		
Galanthamin	2 ± 0	42 ± 1

nt = netestováno

2.1.4.1.2 Homolykorinový typ

Předlohou pro homolykorinové alkaloidy je 2-benzopyrano-[3,4-g]indol. Hlavním zástupcem je homolykorin. Z dalších zástupců se uvádí homolykorin, 8-*O*-demethylhomolykorin, masonin, hippeastrin, odulin a lykorenin^{19,36}. Vzhledem k nedostatku informací je biologická aktivita většiny alkaloidů této skupiny neznámá. Přes to že homolykorin, lykorenin, 8-*O*-dimethylhomolykorin a hippeastrin vykazují určitou cytotoxickou aktivitu, tak ta není selektivní a působí tak i na nenádorové buňky. V předešlých studiích byl dokázán jejich efekt na buňky karcinomu jater, jejichž růst potlačovaly, nebo leukémii⁷. Hippeastrin vykazoval navíc aktivitu vůči *Candida albicans*, antivirový⁷ a insekticidní účinek³². Podáváním homolykorinu a 8-*O*-demethylhomolykorinu krysám byl zjištěn efekt na snížení krevního tlaku³².

Obsaženy jsou v *N. nevadensis*, *N. pseudonarcissus*, vysoký obsah homolykorinových alkaloidů byl dokázán u *N. Jonquilla*, *N. tazetta*, *N. bulbocodium*, *N. bicolor*, *N. eugeniae*, *N. papyraceus* i *N. poeticu*^{19,33,36}.



Obrázek 6: Struktura hippastrinu⁴²

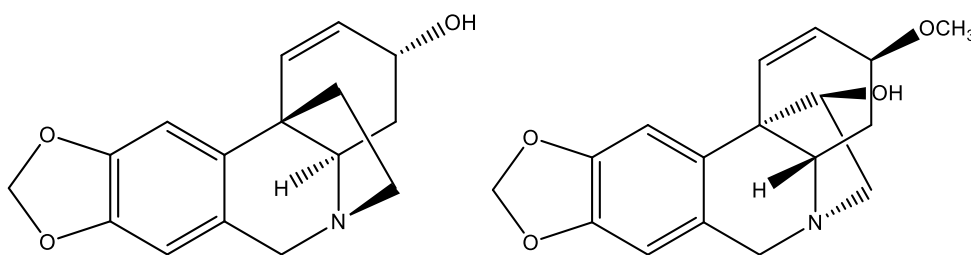
2.1.4.1.3 Haemanthaminový a krininový typ

U těchto strukturních typů je výchozí strukturou ethanofenanthridin⁷. K haemanthaminovému typu se řadí haemanthin, haemanthidin, maritidin, seko-isopowellaminon, 8-*O*-demethylmaritidin nebo vittatin a krinin, ambellin k typu krininovému^{19,33,36}. Rozdíl mezi těmito dvěma typy je v prostorové orientaci na 5,10b-ethanovém můstku (haemanthaminový typ má β -orientaci a krininový typ má α -orientaci). Haemanthamin a vykazuje cytotoxickou aktivitu. Mechanismus účinku pravděpodobně souvisí se zastavením buněčného cyklu ve fázi G2. Účinnost haemanthaminu byla prokázána proti potkanímu jaternímu karcinomu, myšímú lymfomu, jehož podstatou je vazba haemanthaminu na RNA a tvorba komplexu, nebo T-lymfoblastové leukémii. Haemanthamin byl testován také pro antiparazitickou, antiretrovirovou aktivitu, sledován byl i účinek na snížení krevního tlaku³². U haemanthidinu, což je hydroxy derivát haemanthaminu, byl prokázán cytotoxický dále i analgetický a antiflogistický efekt⁷. Co se týče aktivity vůči ChE, výsledky u haemanthaminových alkaloidů byly slabší než u galanthaminu, nicméně mohou být zajímavou možností při dalších studiích terapie Alzheimerovy choroby^{43,44}.

Stejně jako alkaloidy haemanthaminového typu jsou i krininové odvozeny od ethanofenanthridinu, což se odráží i na jejich cytotoxickém potenciálu. Jako účinný proti nádorovým buňkám se ukázal hlavně distichamin⁷. Dalším alkaloidem krininového typu, který ukázal účinnost vůči nádorovým buňkám ledvin, plic nebo tlustého střeva je vittatin³². Studie prováděná na *Crinum jagus* poukázala na možný neuroprotektivní účinek vittatinu. Jelikož se

jednalo o extrakt, uvádí se, že může také jít o synergický účinek dalších krininových a haemanthaminových alkaloidů, které jsou v rostlině obsaženy v menším množství⁴⁵. Mezi krininový typ se řadí také alkaloid ambellin, ovšem ten nevykazuje cytotoxickou aktivitu¹⁹.

Mezi druhy narcisů obsahující alkaloidy haemanthaminového a krininového typu se řadí *N. pseudonarcissus*, *N. tazetta*, *N. bulbocodium*, *N. poeticus*, *N. papyraceus*, *N. primigenius*, *N. cantabricus*³³.



Obrázek 7: Struktura krininu⁴⁶ (vlevo) a haemanthaminu⁴⁷ (vpravo)

2.1.4.1.3.1 Deriváty haemanthaminu

V rámci studie Kohelová E., et al. na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové na Katedře farmaceutické botaniky syntetizovány deriváty haemanthaminu. Šlo o 11-*O*-acetylhaemanthamin (H1), 11-*O*-propionylhaemanthamin (H2), 1-10-isobutanoylhaemanthamin (H3), 11-*O*-pentanoylhaemanthamin (H4), 11-*O*-hexanoylhaemanthamin (H5), 11-*O*-butanoylhaemanthamin (H6), 11-*O*-benzoylhaemanthamin (H7), 11-*O*-(3-chlorobenzoyl)haemanthamin (H8), 11-*O*-(3-bromobenzoyl)haemanthamin (H9), 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (H10), 11-*O*-(3-methoxybenzoyl)haemanthamin (H11) a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin (H12). Deriváty byly testovány na cytotoxickou aktivitu a účinek proti ChE. Bohužel ani jeden z derivátů nevykazoval cytotoxickou aktivitu. Inhibiční aktivitu vůči ChE vykazovalo posledních 6 jmenovaných derivátů. Zejména tedy 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin, které prokázaly nejvyšší aktivitu proti AChE. U třech derivátů, konkrétně H7, H10 a H12, proběhlo testování účinku inhibovat glykogen syntasasu kinasu 3β (GSK-3β). Nejvyšší účinek prokázal H12 s hodnotou IC₅₀ 34.8 ± 0.01⁴³.

Tabulka č. 2: Hodnoty IC₅₀ derivátů haemanthaminu⁴³

Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
Haemanthamin	> 500	> 500
H1	> 500	> 500
H2	> 500	437 ± 38
H3	> 500	203 ± 8

Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
H4	> 500	> 500
H5	> 500	273 ± 18
H6	> 500	140 ± 21
H7	294 ± 25	6 ± 0
H8	85 ± 6	80 ± 10
H9	112 ± 21	129 ± 25
H10	18 ± 1	7 ± 1
H11	180 ± 17	76 ± 13
H12	15 ± 2	> 500
Referenční látka		
Galanthamin	2 ± 0	42 ± 1
Huperzin A	0 ± 0	> 500

2.1.4.1.3.2 Deriváty vittatinu

Na Katedře farmakognozie bylo v rámci diplomové práce Valachové I. připraveno 12 derivátů vittatinu. A to 3-*O*-(4-methylbenzoyl)vittatin (VIT1), 3-*O*-(2-methylbenzoyl)vittatin (VIT2), 3-*O*-(3-methylbenzoyl)vittatin (VIT3), 3-*O*-(2-methoxybenzoyl)vittatin (VIT4), 3-*O*-(3-methoxybenzoyl)vittatin (VIT5), 3-*O*-(3-chlorobenzoyl)vittatin (VIT6), 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT7), 3-*O*-(4-nitrobenzoyl)vittatin (VIT8), 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT9), 3-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)vittatin (VIT10), 3-*O*-(1-naphthoyl)vittatin (VIT11), 3-*O*-(2-naphthoyl)vittatin (VIT12). Stejně jako deriváty lykorinu a haemanthaminu byly testovány na inhibiční aktivitu vůči ChE a cytotoxickou aktivitu. Z těchto 12 derivátů pouze VIT9 a VIT7 vykazovaly výraznější aktivitu vůči AChE. VIT9 prokázal neselektivní protinádorové působení vůči 4 buněčným liniím konkrétně se jednalo o kolorektální karcinom (HT-29), cervikální adenokarcinom (HeLa), plicní adenokarcinom (A549), adenokarcinom prsu (MCF-7). Z pohledu cytotoxické aktivity byl testován i VIT12 a vykazoval vysokou cytotoxickou aktivitu proti 1 linii nádorových buněk HT-29. Oba deriváty vittatinu by tak mohly být do budoucna předmětem výzkumů v rámci terapie nádorových onemocnění. VIT2 a VIT6 byly podrobeny zkoušce na inhibici agregace β-amyloidu, jenž je zodpovědný za tvorbu plaků, s výslednými hodnotami 44,92 ± 5,03 % (VIT2) respektive 32,58 ± 3,62 % (VIT 6), což jsou velice nízké hodnoty¹¹.

Tabulka č. 3: Hodnoty IC₅₀ derivátů vittatinu¹¹

Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
Vittatin	> 100	> 100
VIT1	> 100	57 ± 0
VIT2	> 100	8 ± 0
VIT3	> 100	44 ± 1

Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
VIT4	> 100	22 ± 0
VIT5	> 100	67 ± 0
VIT6	> 100	5 ± 0
VIT7	12 ± 0	57 ± 1
VIT8	> 100	22 ± 0
VIT9	17 ± 0	> 100
VIT10	37 ± 0	> 100
VIT11	> 100	30 ± 1
VIT12	> 100	15 ± 0
Referenční látka		
Galanthamin	2 ± 0	42 ± 1

2.1.4.1.3.3 Deriváty ambellinu

V rámci diplomové práce Ritomské A. na Katedře farmaceutické botaniky bylo syntetizováno 11 derivátů ambellinu: 11-*O*-acetylabellin (A1), 11-*O*-propionylambellin (A2), 11-*O*-pentanoylabellin (A3), 11-*O*-isobutanoylabellin (A4), 11-*O*-benzoylabellin (A5), 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)ambellin (A6), 11-*O*-(4-methylbenzoyl)ambellin (A7), 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)ambellin (A8), 11-*O*-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)ambellin (A9), 11-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)ambellin (A10), 11-*O*-(3-methoxybenzoyl)ambellin (A11). Ani jeden z derivátů nevykazoval zajímavou protinádorovou aktivitu. Z pohledu inhibiční aktivity na cholinesterasy konkrétně na BuChE se jako zajímavé jeví zejména A5 a A11. Navíc se testovala i aktivita na glykogen syntas kinasu 3β (GSK-3β), z tohoto pohledu se jako nejzajímavější jevil A3 s inhibiční aktivitou 99,58 ± 0,42 %. Stejně tak i ostatní deriváty ambellinu prokázaly zajímavou inhibiční aktivitu vůči GSK-3β, která bude předmětem výzkumů v budoucnu. Momentálně jsou deriváty ambellinu testovány pro jejich účinek jako antimalarikum⁴⁰.

Tabulka č. 4: Hodnoty IC₅₀ derivátů ambellinu⁴⁰

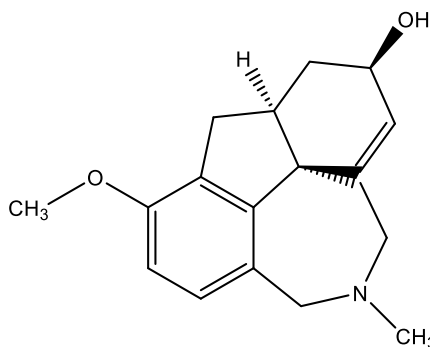
Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
Ambellin	> 100	> 100
A1	> 100	> 100
A2	> 100	> 100
A3	> 100	> 100
A4	> 100	> 100
A5	> 100	4 ± 0
A6	> 100	> 100
A7	> 100	28 ± 1
A8	48 ± 2	81 ± 2
A9	> 100	> 100
A10	54 ± 4	> 100

Látka	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)
A11	> 100	6 ± 0
Referenční látka		
Galanthamin	2 ± 0	42 ± 1

2.1.4.1.4 Galanthaminový typ

Základem struktury těchto alkaloidů je dibenzofuran. Mezi zástupce galanthaminového typu patří galanthamin, narwedín, sanguinin, lykoramin, norlykoramin, epinorgalanthamin, lykoraminon^{19,33,36}. Nejvýznamnějším zástupcem je galanthamin, jehož prvním zdrojem, byly cibule *Galanthus woronowii*. Význam galanthaminu je zejména v terapii Alzheimerovy choroby, kde se uplatňuje inhibiční efekt galanthaminu na AChE, s cílem zlepšení kognitivních funkcí. Silný účinek galanthaminu na AChE je vlastnost, kterou se odlišuje od ostatních strukturních typů. Typická je absence cytotoxického účinku⁷. Studie A. L. Harveyho spojuje galanthamin s účinkem na nervosvalovou blokádu, stimulačním efektem na CNS, analgetickým účinkem, pozitivním ovlivněním stavů u schizofreniků, dále uvádí bradykardizující účinek, snížení nitroočního tlaku, nebo zvýšení hladiny hydrokortizonu⁴⁸. Sanguinin, který má na C9 methoxy skupinu nahrazenou hydroxy skupinou vykázal až desetkrát vyšší aktivitu oproti galanthaminu. Na druhou stranu lykoramin, nejspíš z důvodu hydrogenace dvojné vazby, aktivitu vůči AChE postrádá³².

Alkaloidy galanthaminového strukturního typu lze najít v těchto narcisech: *N. pseudonarcissus*, *N. Jonquilla*, *N. poeticus* a *N. cyclamineus*^{19,33,36}.



Obrázek 8: Struktura galanthaminu⁴⁹

2.1.4.1.5 Tazettinový typ

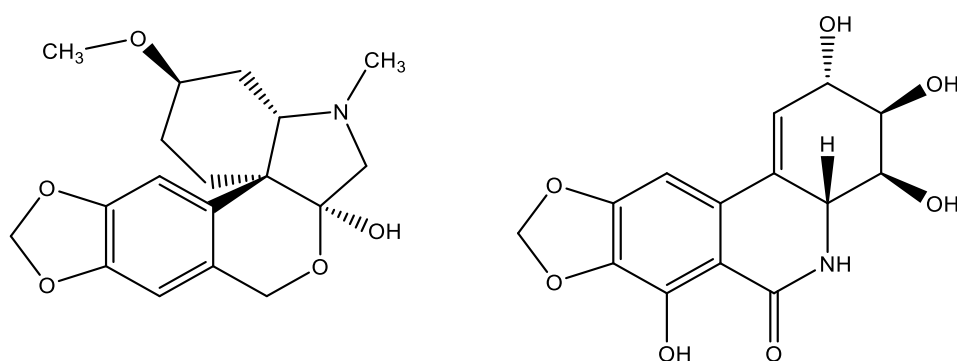
2-benzopyrano-[3,4-c]indol tvoří základ struktury, od které jsou alkaloidy tazettinového typu odvozeny. K zástupcům tazettinového strukturního typu patří tazettin, pretazettin a také 3-epimakronin^{19,33,36}. Samotný tazettin nemá výraznou cytotoxickou aktivitu. Nicméně

pretazettin, což je prekurzor tazettinu, se vyznačuje významnou aktivitou proti leukémii a Lewisovu karcinomu⁷. Velkou výhodou pretazettinu je, že studie provádějí se na zvířatech ukázaly, že je poměrně bezpečný⁵⁰. U pretazettinu byla prokázána i aktivita vůči *Herpes simplex* virům a flavivirům⁷. Navíc byl pretazettin testován na schopnost inhibovat AChE, ovšem bez většího úspěchu³².

Tazettinové alkaloidy jsou obsaženy v *N. pseudonarcissus*, *N. Jonquilla*, *N. tazetta*, *N. bulbocodium*, *N. confusus*, *N. panizzianus*, *N. obesus*, *N. pallidiflorus* a *N. bicolor*³³.

2.1.4.1.6 Pankratistatinový typ

Pankratistatinový typ alkaloidů je odvozen od fenthridinu. Hlavními zástupci jsou pankratistatin, narciklasin a narcistatin. Pankratistatin vykazuje cytotoxickou aktivitu, a to zejména vůči melanomu a leukémii. Obrovskou výhodou pankratistaninu je selektivní účinek vůči nádorovým buňkám. Narciklasin taktéž prokázal protinádorovou aktivitu. Dobrých výsledků narciklasin dosahoval při studii účinnosti proti adenokarcinomu prsu a karcinomu prostaty. Bylo zjištěno, že narciklasin působí skrze inhibici peptidyltransferasy na ribosomech, interakcí s dvoušroubovicí DNA a dále byl u něj popsán antimitotický účinek. Mimo apoptózy u nádorových buněk byl u narciklasinu prokázán také antibakteriální, antimykotický účinek či aktivita proti virům. Konkrétně bylo zjištěno že působí proti *Corynebacterium fascians*, *Candida albicans*, RNA virům nebo flavivirům⁷. Studie Rong Tang et al. dokázala protizánětlivý účinek narciklasinu proti zánětu buněk srdečního svalstva u myší, vyvolaném endotoxickými lipopolysacharidy⁵¹. Narcistatinu, který je prekurzorem narciklasinu, studie prováděna na potkanech přisuzuje antiflogistický⁵². Jak narciklasin tak pankratistatin byly izolovány z cibulí rodu *Narcissus* respektive *Hymenocallis littoralis*. Zastoupeny jsou v druzích *N. tazetta*, *N. pseudonarcissus*, *N. bicolor*^{33,36}.



Obrázek 9: Struktura tazettinu⁵³ (vlevo) a narciklasinu⁵⁴ (vpravo)

2.1.4.1.7 Montaninový typ

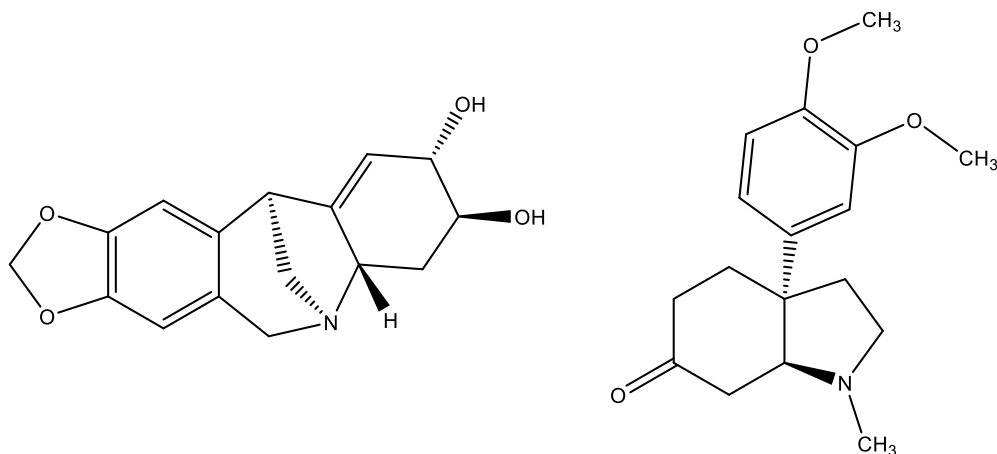
N. poeticus obsahuje navíc alkaloidy montaninového strukturního typu odvozené od 5,11-methanomorphanthridinu, konkrétně tedy pankracin a montanin⁵⁵. U pankracinu byla pozorována aktivita proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Aktivita byla sledována i na *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* a *Plasmodium falciparum*, bohužel ta nebyla dostatečně silná³². Mezi další spektrum účinku pankracinu se řadí antiproliferativní účinek proti rakovinným buňkám vaječníků, tlustého střeva, plic nebo prsu. Montanin byl také testován pro cytotoxickou aktivitu, která je vyšší než u pankracinu⁵⁵.

Dnes je tato skupina předmětem mnoha výzkumů s cílem pochopení mechanismů antiproliferativního působení⁵⁵.

2.1.4.1.8 Mesembranový typ

Mesembranový typ je odvozen od aryloktahydroindolu⁵⁸. Tento strukturní typ zahrnuje hlavně mesembrin a mesembrenon. Svou biologickou aktivitou se poměrně liší od již dříve zmíněných alkaloidů, jelikož mesembrin a mesembrenon inhibují PDE-4 navíc blokují zpětné vychytávání serotoninu. Z toho vyplývá efekt na úzkosti, poruchy CNS nebo antidepresivní účinek^{56,57}.

Typický je tento strukturní typ pro rod *Scelletium*, ale zastoupení má i u rodu *Narcissus* a to *Narcissus pallidulus* a *Narcissus triandrus*⁵⁷.



Obrázek 10: Struktura pankracinu⁵⁹ (vlevo) a mesembrinu⁶⁰ (vpravo)

2.2 Amaryllidaceae alkaloidy v terapii AD a nádorových onemocnění

2.2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které se neprojevívá hned, ale postupně. Často se projevuje postupnými výpadky paměti, úzkostmi, podrážděností až depresemi. Mechanismus patogeneze není stoprocentně známý, ale s velkou pravděpodobností je za to zodpovědná tvorba β -amyloidu. Obrovskou roli hraje i narušení acetylcholinergního a glutamatergního systému. Léčba tohoto onemocnění není kauzální, jelikož kauzální terapie není k dispozici a je zaměřena spíše na mírnění potíží⁶¹.

Stejně jako spousta dalších onemocnění, tak i pravděpodobnost výskytu AD stoupá rapidně s věkem. Uvádí se že mezi 65 až 85 rokem života vzrůstá incidence ze 3 % až na 47 %. V současnosti v ČR trpí až 150 000 lidí určitou formou demence⁶¹.

2.2.1.1 Projevy Alzheimerovy choroby

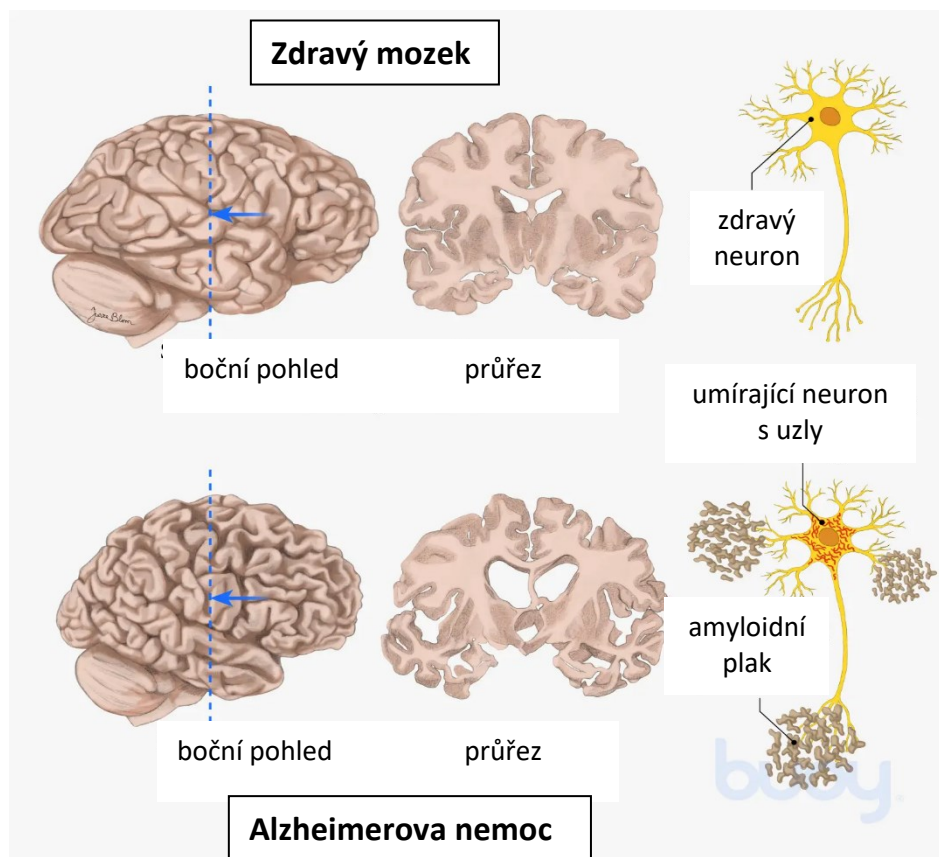
První fází projevu AD je lehká demence, jenž se projevuje mírnými kognitivními poruchami, kdy dochází k zapomínání, ztrátě logického posudku a uvažování. Při středně těžké demenci postupně dochází k poruchám orientace v časoprostoru. Následně nemoc často dospívá až do fáze těžké demence, kdy pacient není schopen rozeznat okolí svého bydliště. V pozdní fázi nemocní zapomínají i na své blízké, jejich jména i tváře. Ne zřídka může dojít k zastavení progresu onemocnění, která poté opětně postupuje, a do 10 let v závislosti na několika faktorech končí smrtí^{62,63}.

2.2.1.2 Rizikové faktory

Jak bylo zmíněno hlavním rizikovým faktorem je věk, dále hladina apolipoproteinu E4 (ApoE4). Absence alel pro tento faktor zvyšuje riziko AD u homozygotů až o 84 %, protože dojde ke zvýšení tvorby β -amyloidu. Velkou roli hraje také vzdělání jedince, genetický faktor, ženské pohlaví nebo Downův syndrom. Výše zmíněné jsou neovlivnitelné rizikové faktory, z těch ovlivnitelných lze uvést obezitu, diabetes, hypertenze, hypercholesterolemie, kouření, alkoholismus, úrazy hlavy. Uvádí se, že existuje i souvislost mezi délkou nohou, velikostí lebky a mírou výskytu AD, tedy jedinci s menší lebkou a kratšíma nohama mají větší riziko⁶¹.

2.2.1.3 Patofyziologie

Hlavním patologickým projevem AD je atrofie mozku. Tato atrofie je spojená s různými patologickými změnami jako tvorba a ukládání patologických proteinů β -amyloidu, τ -proteinu nebo postižení acetylcholinergního a glutamatergního systému⁶¹.



Obrázek 11: Porovnání zdravého mozku a neuronu s postiženým⁶⁷

2.2.1.3.1 Cholinerní teorie

Alzheimerova choroba je spojována s poruchou celého cholinergního systému, je tedy způsobená sníženou aktivitou cholinacetyltransferasy (ChAT), poklesem re-uptake cholinu a syntézy acetylcholinu (ACh). Díky čemuž je pak v rané fázi AD narušena syntéza ACh³⁶.

Součástí tohoto systému jsou i enzymy AChE a BuChE. Tyto enzymy fungují na principu odbourávání ACh. Obě formy cholinesteras se liší v cílové molekule, na kterou působí. Pro AChE je cílem acetylcholin, kdežto BuChE tak selektivní není a ovlivňuje větší škálu molekul. Hlavním hydrolyticky působícím enzymem je AChE. BuChE má při hydrolýze spíše sekundární funkci. Přesto, že AChE je rozšířenější, tak se BuChE hojně vyskytuje například v amygdale, thalamu nebo hippokampu. AChE se může vyskytovat až ve třech různých

globulárních formách s jednou až čtyřmi katalytickými podjednotkami. V odlišných částech mozku se obsazení podjednotek mění, ale převážně jde o první a čtvrtou podjednotku^{64,66}.

Cesta acetylcholinu začíná syntézou enzymem ChAT. Výchozími látkami jsou acetylkoenzym A a cholin. Po syntéze začíná působit na post- a presynaptické muskarinové (M) a nikotinové (N) receptory, kam se uvolní z neuronů. Typická je pro AD redukce počtu N receptorů, zatímco M receptory jsou víceméně beze změny. Po vyplavení ACh k synaptické štěrbině, je pomocí AChE hydrolyzován. Rozkladné produkty cholin a kyselina octová jsou zpětně vychytávány do presynaptického neuronu, aby mohly opět tvořit Ach. Tento mechanismus je předmětem zájmu v terapii AD, jelikož se zablokováním AChE a BuChE se zvýší i hladina ACh a s tím selepší nebo alespoň zachovají kognitivní funkce⁶⁵.

2.2.1.3.2 Amyloidová teorie

Tato teorie popisuje vznik amyloidového plaku, tvořeného β -amyloidem, jakožto jeden z mechanismů vedoucích ke vzniku Alzheimerovy choroby. Imunitní systém proti tomuto plaku bojuje aktivací mikroglíí a uvolňováním protizánětlivých cytokinů. Tato reakce pak končí odumíráním nervových buněk a jejich smrtí⁶⁸.

Základem teorie je amyloidní prekurzorový protein. Tento protein je štěpen α , β a γ -sekretasou. Za normálních okolností vzniká rozštěpením APP produkt, který je rozpustný. Při AD však vzniká štěpením APP nerozpustný $A\beta$. Tento nerozpustný produkt se následně shlukuje, poškozuje neurony a tvoří tzv. Alzheimerovy plaky. Následkem kumulace amyloidních plaků ve stěnách mozkových cév dochází k odumírání dalších neuronů. Jedním z možných míst, na které je možné se zaměřit v terapii AD jsou receptory pro glykované produkty (RAGE receptory). Jedná se o receptory, které vychytávají $A\beta$ z krve, transportují jej do mozku a zvyšuje tak tvorbu plaků. Dalším terapeutickým cílem je β -sekretasa. Možností jsou i low-density lipoprotein receptory (LRP receptory) fungující na opačném principu jak RAGE receptory a γ -sekretasa, ovšem klinická studie léčiv zaměřených na tyto cíle byla zastavena z důvodu závažných nežádoucích účinků^{36,68,75}.

2.2.1.3.3 Teorie τ -proteinu

Hypotéza τ -proteinu je další teorií patologie AD. Vypovídá o klubkách tvořených hyperfosforylovaným τ -proteinem. Jedná se o neuronální proteiny, které se vážou na mikrotubuly a stabilizují je. Za fyziologických podmínek se fosforylovaný protein defosforyluje, přičemž na procesu fosforylace a defosforylace se podílí kinasy a fosfatasy,

zejména tedy GSK-3 β a cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK-5). Při AD dochází k hyperfosforylaci τ -proteinu a narušení jeho funkce. Zároveň dochází ke změně konformace a sníží se jeho rozpustnost. Následně tvoří vlákna, která agregují v toxická neurofibrilární klubka, což vede k poškození metabolismu neuronů, zároveň k jejich odumírání a tvorbě lézí^{19,36,68,75}.

2.2.1.3.4 Glutamátergní systém

Jedním ze systému, který je při AD postižen je glutamátergní systém, a to snížením zpětného vychytávání glutamátu v hipokampu nebo zvýšeným uvolňováním glutamátu, který působí excitačně na *N*-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA receptory). Prostřednictvím těchto receptorů se po stimulaci glutamátem otevrou iontové kanály a následuje influx Ca²⁺ iontů do neuronu. Díky nadměrnému dráždění NMDA receptorů glutamátem dochází k excitotoxicitě. Tento děj má za následek zvýšený průnik Ca²⁺ iontů do neuronů a následně buněčnou smrt. Glutamát se navíc svým výdejem realizuje i v procesu učení, a to mechanismem dlouhodobé potenciace NMDA receptorů, který je AD narušen^{19,36,65}.

2.2.1.4 Terapie Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba se nedá vyléčit, a tak je cílem terapie zmírnit a potlačit příznaky a zachovat kognitivní funkce. Z řad kognitiv, která jsou v ČR registrovány k terapii AD se řadí inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) a antagonisty na NMDA receptorech. Terapie AD je tak zaměřená na zlepšení cholinergní transmise a zabránění nadměrné excitace NMDA receptorů^{69,70,71}.

2.2.1.4.1 Inhibitory cholinesteras

Tato skupina léčiv účinkuje mechanismem inhibice cholinesteras. Dojde tak k zabránění degradace acetylcholinu a zvýšení jeho hladiny v neuronech. Výsledkem je pak působení ACh na cholinergní receptory, zachování nebo dokonce zlepšení kognitivních funkcí a funkce neuronů. Nadějí do budoucna mohou být léčiva, která by působila na cholinové receptory. Zvýšila by se tak produkce cholinu, který jak bylo zmíněno je esenciální pro syntézu acetylcholinu. Mezi registrované AChEI patří galantamin, donepezil a rivastigmin^{72,74}.

Je třeba brát v úvahu nežádoucí účinky těchto léčiv, které vychází z účinku na cholinergní receptory. Mezi nejčastěji se vyskytujícími jsou bradykardie, třes, nevolnost, zvracení, průjem nebo bolest svalů^{70,71}.

Donepezil

Donepezil je u AD užíván ke zlepšení kognitivních poruch. Afinitou má blíže k AChE než k BuChE. Jedná se tedy o selektivní inhibitor AChE, ke které má až 1000x větší aktivitu. U mírných kognitivních poruch v rámci AD je tento derivát indanonbenzylpiperidinu, pokládán za lék první volby. Nežádoucí účinky donepezilu souvisí s jeho mechanismem. Nejčastěji se objevuje průjem, nevolnost, bolest hlavy, únava a vyrážka^{36,72}.

Rivastigmin

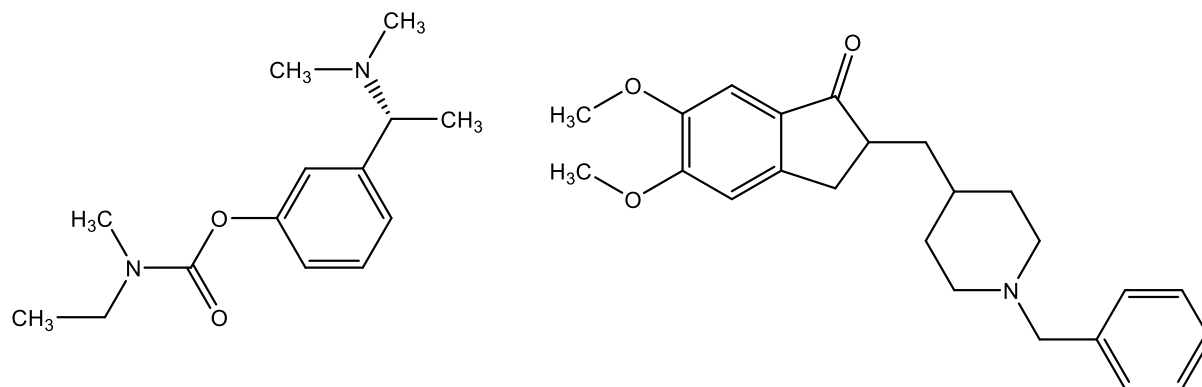
Rivastigmin blokuje degradaci ACh vazbou na aniontové a stearové místo AChE, ale taky BuChE. Lékem volby je u středně těžké AD. Krom perorální formy je dostupný také ve formě náplastí. To může být výhodou právě u pacientů s AD a kognitivními poruchami, kteří mohou mít problémy s nežádoucími účinky. Z nichž se nejčastěji vyskytuje bolest hlavy, zvracení, noční můry, anxieta a průjem^{72,73}.

Galantamin

Galantamin je Amaryllidaceae alkaloid galantaminového strukturního typu indikován u mírné a středně těžké demence. Nejedná se jen o inhibitor AChE, ale také moduluje N receptory, přesněji jejich α -podjednotku. Dá se tedy říci, že se řadí mezi látky s duálním mechanismem účinku. Nežádoucí účinky galanthaminu jsou totožné s donepezilem, navíc se může vyskytnout kolísání krevního tlaku^{36,72}.

Inhibiční účinek byl zkoušen mimo galanthamin i u řady dalších Amaryllidaceae alkaloidů. Například sanguinin, který je alkaloidem galanthaminového typu, při studiích prokázal až 10x vyšší aktivitu vůči AChE než samotný galanthamin. Homolykorin (IC_{50} , AChE = $64 \pm 4 \mu M$) je alkaloidem se střední inhibiční aktivitou vůči AChE. Dalšími látkami inhibující ChE jsou struktury odvozené od alkaloidu haemanthaminu. Nicméně haemanthamin účinný není. Konkrétně se jedná o 11-O-benzoylhaemanthamin (IC_{50} , BuChE = $5,9 \pm 0,31 \mu M$), 11-O-(2-methylbenzoyl) haemanthamin (IC_{50} , AChE = $18,2 \pm 1,3 \mu M$; IC_{50} , BuChE = $6,6 \pm 1,2 \mu M$) a 11-O-(4-nitrobenzoyl) haemanthamin (IC_{50} , AChE = $14,7 \pm 1,8 \mu M$). Jak již bylo zmíněno u alkaloidů lykorinového typu u struktur odvozených od lykorinu nebo galanthinu byla zjištěna inhibiční aktivita k AChE. Ovšem lykorin ani galanthin tento účinek neprokázaly. Konkrétně se jedná o 2-O-terc-butyldimethylsilyl-1-O-(methylthio) methyllykorin, 1-O-acetyllykorin a 1-O-acetyl-2-O-terc-butyldimethylsilyllykorin a (+) -11-hydroxygalanthin. Zajímavá aktivita

vůči BuChE byla naměřena u narcimatullinu (IC_{50} , BuChE = $5,90 \pm 0,23 \mu M$) nicméně nevýhodou je, že byl prozatím izolován v malém množství^{6,19,38}.



Obrázek 12: Struktura rivastigminu (vlevo), donepezilu (vpravo)⁷⁶

Huperzin A

V ČR žádný přípravek s tímto lykodinovým alkaloidem izolovaným z plavuně *Huperzia serrata* není registrován, ale například Čína jej již k terapii AD schválila. Nicméně mimo vrance pilovitého je k nalezení i u vrance jedlového (*Huperzia selago*) z čeledi Lycopodiaceae^{77,78}.

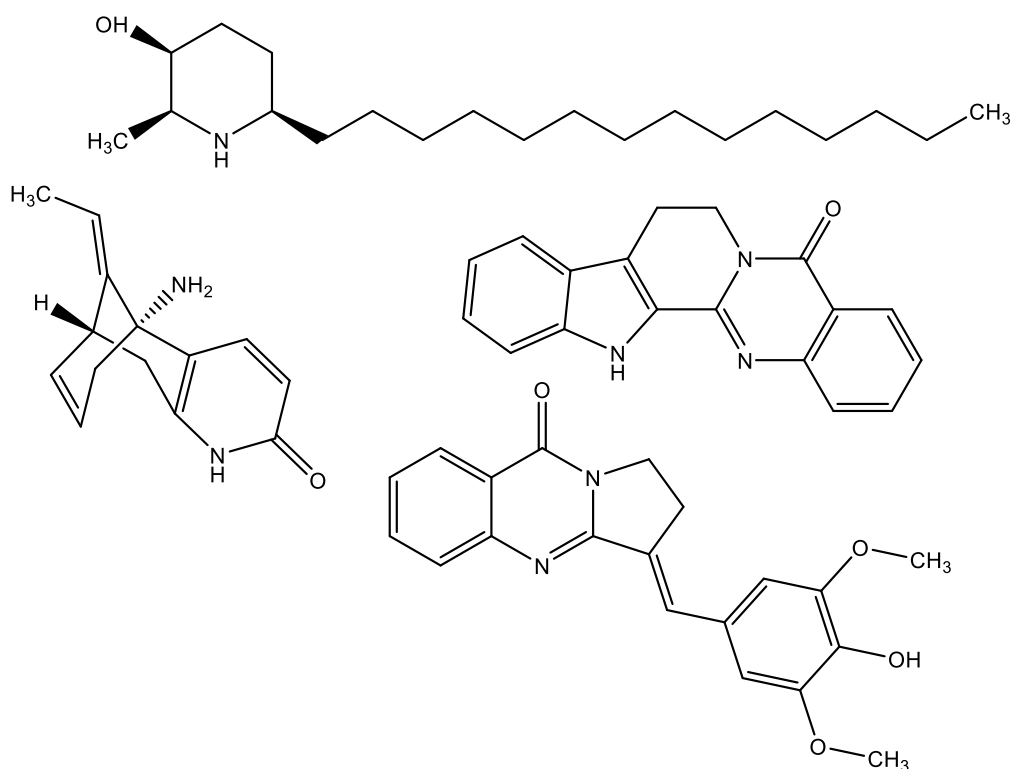
Součástí čínské medicíny je *Huperzia serrata* mimo jiné i pro své antipyretické a protizánětlivé účinky, ovšem za tyto aktivity není zodpovědný huperzin A, ale byly přiřazeny chinolizidinovým alkaloidům obsaženým v této rostlině. Huperzin A je pro svůj mechanismus účinku, který je totožný s AChEI, užíván jako kognitivum, některé studie dokonce tvrdí, že s lepším účinkem jak rivastigmin nebo donepezil. Jeho účinek jako kognitivum umožňuje schopnost procházet hematoencefalickou bariérou. Mimo to u huperzinu A byla prokázána antioxidační aktivita. Tento účinek je dán zvýšením aktivity antioxidačních enzymů jako glutathion-peroxid reduktasa. Je tak schopen snížit produkci reaktivních forem kyslíku β -amyloidem. Navíc snižuje ukládání amyloidních plaků, o to zajímavější huperzin A pro výzkum do budoucna je. Jeho efekt na snížení Alzheimerových plaků je popsán zvýšením uvolňování α -sekretasou štěpených fragmentů APP^{77,78,79}.

Rutekarpin

Rutekarpin je obsažen v rostlině *Evodia rutaecarpa* z čeledi Rutaceae. Jedná se o zástupce karbolinových derivátů se silným inhibičním účinkem vůči AChE, navíc je k této ChE vysoce selektivní. Vzhledem k tomuto faktu se dnes využívá jako předloha pro syntézu nových potenciálně funkčních látek. K dalším účinkům se řadí antiflogistická, antitrombotická a vasodilatační aktivita⁷⁷.

Další látky přírodního původu

Inhibiční efekt na AChE byl zjištěn u spektalinu, obsaženého v rostlině *Senna spectabilis*, a jeho derivátu 3-O-acetylspektalinu. Jedná se o piperidinový alkaloid, jehož velkou výhodou je vysoká selektivita. Z tohoto důvodu je využíván jako výchozí látka v syntéze nových struktur inhibujících AChE. Další výhodou, která se týká i derivátů je, že nevykazují téměř žádné nežádoucí účinky v jiných orgánových systémech, a to díky selektivitě k CNS⁷⁷. Další látkou zkoumanou ve smyslu výchozí látky pro syntézu derivátů je alkaloid isaindigoton. V tomto případě se jedná o selektivní inhibitor BuChE. Rostlina *Menispermum dauricum* je zdrojem oxoisoaporphinových alkaloidů, které se staly předlohou pro syntézu látek s vysokou selektivitou a účinkem vůči AChE. Významnou inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE se vyznačovaly i deriváty berberinu z rostliny *Coptis chinensis*⁷⁷.



Obrázek 13: Struktura spektalinu (nahore), huperzinu A (vlevo uprostřed), rutekarpinu (vpravo uprostřed), isaindigoton (dole)⁸⁰

2.2.1.4.2 Inhibitory β-sekretasy

Jak již bylo zmíněno β-sekretasa (BACE1) má důležitou roli při rozvoji AD a tvorbě amyloidního plaku. BACE1 je enzym zodpovědný za štěpení APP, na nerozpustné fragmenty AMK. Tyto fragmenty se posléze shlukují v Alzheimerovy plaky. Mechanismem inhibitorů

β -sekretasy je blokáce tohoto enzymu, což má za následek snížení hladiny $A\beta$ a tvorby amyloidních plaků. U řady potenciálních léčiv této skupiny byl ukončen klinický výzkum z důvodu vážných nežádoucích účinků, nebo absence pozitivního účinku na kognitivní funkce. Jmenovitě se jedná o atabecestat, verubecestat a lanabecestat. Důvodem negativních výsledků je s největší pravděpodobností neselektivní inhibice izoenzymů BACE. Žádanou selektivní inhibici BACE1 oproti BACE2 prokázal umibecestat, což má za následek nižší výskyt nežádoucích účinků. Jeho klinický výzkum byl však pro neúčinnost zastaven. Mezi přírodní látky schopny inhibovat BACE1 se řadí kurkuminoidy, furanokumariny, stilbenoidy, deriváty resveratrolu nebo protoberberinové alkaloidy *Coptis chinensis*. Sekretasy jsou předmětem mnoha výzkumů s cílem hledat nová léčiva v terapii AD. Strukturně jsou tyto zkoumané látky odvozeny od aminohydantoinu, aminooxazolinu, aminothiazolinu, iminopyrimidinonu, aminothiazinu, iminothiadiazinanu dioxidu nebo iminohydantoinu^{19,36,74}.

2.2.1.4.3 Inhibitory glykogen synthasy kinasy 3 β

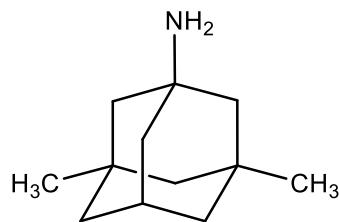
GSK-3 je serin-threonin kinasa, která se vyskytuje ve dvou isoformách a to GSK-3 α a GSK-3 β . Zároveň se účastní mnoha procesů v mozku souvisejících například s neurogenézí nebo tvorbou paměti. Tento enzym má důležitou roli v patologii AD, a to zejména z důvodu tvorby $A\beta$ nebo hyperfosforylace τ -proteinu. Jak již bylo zmíněno GSK-3 β je zodpovědná za fosforylaci τ -proteinu, což kaskádou dalších dějů končí až smrtí neuronů. Zkoumaná léčiva tlumící GSK-3 β potlačují tuto hyperfosforylaci a tvorbu neurotoxických klubek, snižují neurodegeneraci, zlepšují kognitivní funkce a udržují normální hladiny fosforylovaného τ -proteinu. Jako bezpečný se jeví inhibitor tideglusib, u něj je však nutné potvrdit zlepšení kognitivních poruch dalšími studiemi. Neuroprotektivní účinek byl prokázán dále u derivátů maleimidu¹⁹. Z přírodních zdrojů jsou schopny GSK-3 β inhibovat alkaloidy karanin a masonin z čeledi Amaryllidaceae, alkaloidy hymenialdisin, obsažen v mořských houbách, murrayfolin A, a agelastin A. Dalšími přírodními látkami jsou dibromocantarellin, manzamin, meridiamin, indirubin, nebo furanoseskviterpeny palinurin a trikanthin¹⁹. Kromě zmíněného karaninu ($IC_{50} = 30,8 \pm 0,3 \mu M$) a masoninu ($IC_{50} = 27,9 \pm 0,8 \mu M$) disponuje inhibičním účinkem na GSK-3 β i derivát haemanthaminu 11-O-(4-nitrobenzoyl) haemanthamin ($IC_{50} = 34,8 \pm 0,01 \mu M$)¹⁹.

2.2.1.4.4 Antagonisté NMDA receptorů

Cílem těchto léčiv je zabránit nadměrné excitaci a následné buněčné smrti. Memantin je prozatím jediným schváleným zástupcem. Ve stádiu vývoje je momentálně látka (3,4,8,9-tetramethyltetracyclo dec-1-yl) methylamin hydrochlorid, která prozatím vykazuje slibnou aktivitu, a proto by mohla být v budoucnu přínosem pro pacienty s kognitivními poruchami⁷²

Memantin

Memantin je lékem volby u středně těžkých a těžkých demencí, kdy se užívá v kombinaci s AChEI nebo samostatně. Jeho mechanismus spočívá v antagonizaci NMDA receptorů a následnému zabránění nadměrnému přílivu Ca^{2+} iontů, hyperexcitabilitě a neurotoxicitě⁷².



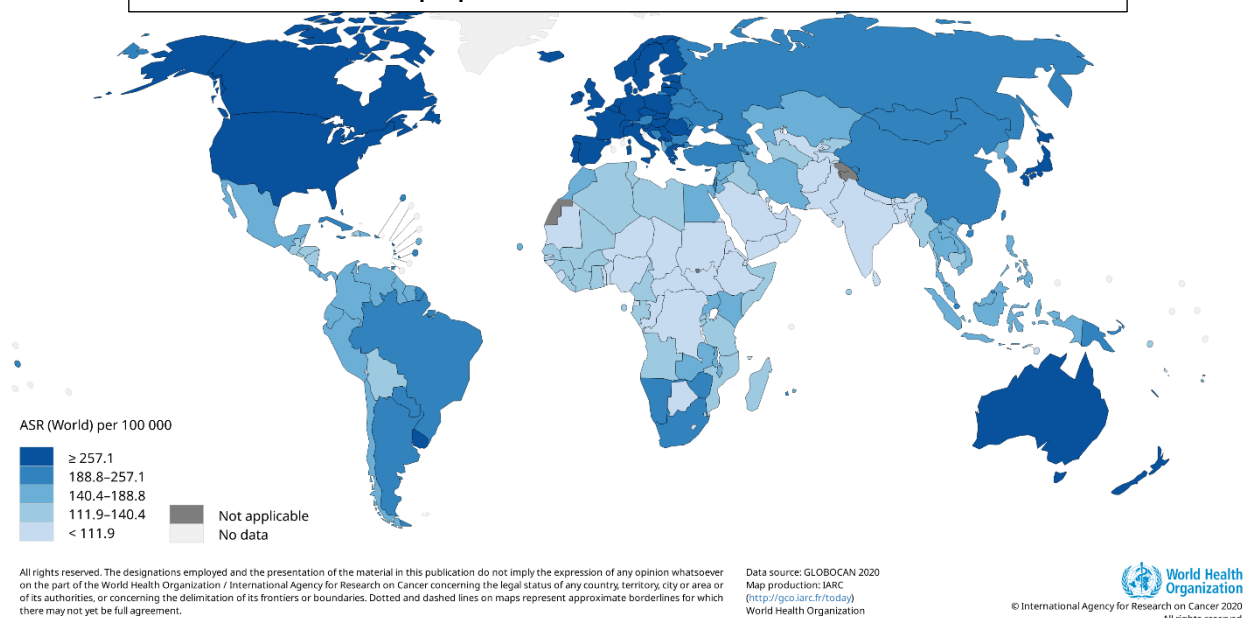
Obrázek 14: Struktura memantinu⁷⁶

2.2.2 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí, dle statistik WHO v roce 2020 zemřelo na tohle onemocnění téměř 10 milionů nemocných. Zároveň jsou nádorová onemocnění zodpovědná až za každé šesté úmrtí. World Cancer Research Fund International uvádí, že ve stejném roce přibylo až na 18 094 716 případů s nádorovým onemocněním, zejména tedy ve vyspělých zemích^{83,84}.

Vznik nádoru může být podmíněn geneticky, ale i věkem. Tyto faktory se řadí mezi neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné rizikové faktory se zařazuje konzumace tabáku, nadměrné užívání alkoholu, znečištění vzduchu, špatné stravovací návyky, obezita nebo také infekční onemocnění způsobené například *Helicobacter pylori*, papilomavirem nebo hepatitidou B a C^{82,84}.

Podíl populace s rakovinou v roce 2020



Obrázek 15: Procentuální výskyt nádorových onemocnění⁸⁶

Nádorové onemocnění je charakterizováno nekontrolovatelným dělením změněných tělu vlastních buněk různých tkání, přičemž dělení není regulováno. Následkem nekontrolovatelného členění buněk vzniká tumor. Příčin, které vedou ke vzniku tohoto onemocnění je mnoho od karcinogenních látek, ozařování, přes viry, zvýšené hladiny hormonů, až po genetickou zátěž. Právě mutace protoonkogenů, což jsou regulační geny v procesu dělení a růstu, způsobí jejich přeměnu na onkogen a rozjede kaskádu nekontrolovaného dělení. Tato přeměna může být blokována supresorovými geny⁸¹.

Nádory se dělí na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Pro maligní nádory je typický rychlý růst a invaze do ostatních tkání, které destrukují, a tvoří v těchto místech metastázy. Naproti tomu benigní nádory nemetastazují, jsou ohraničené a jejich růst je pomalý. Díky těmto skutečnostem jsou benigní nádory mnohem snadněji léčitelné^{36,81}.

Existují tři hlavní způsoby terapie. Mezi ně patří chemoterapie, chirurgické odstranění nádoru a radioterapie. Cílem chemoterapie, kdy jsou pacientovi podávány cytostatika, je destrukce nádorových buněk. Nevýhodou je však vysoká frekvence nežádoucích účinků, souvisejících s efektem na zdravé buňky. Mezi ty nejčastěji popsané řadíme nevolnost, poruchy kostní dřeně, potlačení imunitního systému, vypadávání vlasů atd^{36,81}.

2.2.2.1 Látky přírodního původu v terapii nádorových onemocnění

Již od pradávna jsou léčiva přírodního původu součástí terapie nádorových onemocnění. Mnoho rostlin, ale i živočichů a hub je zdrojem látek s protinádorovou aktivitou, které se po chemické identifikaci a klinických studiích dostaly do terapeutické praxe⁸⁷.

2.2.2.1.1 Vinkristin a vinblastin

Tyto alkaloidy jsou obsaženy v rostlině barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*), jsou označovány jako tzv. vinca alkaloidy. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici polymerace mikrotubulů. Následkem toho dojde k zastavení mitózy, invaze a tvorbě metastáz⁸⁷.

Jak vinkristin tak vinblastin mají neodmyslitelnou roli v terapii akutní leukémie, Hodgkinova syndromu, vícečetného myelomu, lymfomu u vinkrastinu^{87,88} respektive lymfomů, Hodgkinova syndromu či karcinomu varlat a prsu v případě vinblastinu^{87,89}. Své využití mají i jejich deriváty vinorelbin nebo vinflunin. Vinorelbin je účinný proti karcinomu prsu, plic a vaječníků, naopak vinflunin je efektivní u karcinomu močového měchýře⁸⁷.

2.2.2.1.2 Taxany

Tyto látky jsou nejvíce obsaženy v kůře *Taxus brevifolia* a jehličí *Taxus baccata*. Stejně jako vinca alkaloidy i taxany působí na mikrotubuly, ovšem naopak blokuje jejich depolymeraci⁸⁷.

Taxany jsou jednou z možností při terapii karcinomu prsu, ovaria a plic. Mezi taxany se řadí hlavně paklitaxel a docetaxel, který je polosyntetickým derivátem deacetylbatatinu. Dále tetesetaxel, který může být nadějí v terapii melanomů a karcinomu žaludku^{87,90}.

2.2.2.1.3 Deriváty kamptotecinu

Kůra kamptoteky ostrolisté (*Camptotheca accuminata*) je hlavním zdrojem kamptotecinu, ze kterého jsou semisynteticky získávány deriváty topotekan a irinotekan. Jejich mechanismem účinku je inhibice topoisomerasy I⁸⁷.

Indikací u topotekanu jsou karcinom děložního hrdla, plic a vaječníků, kdežto u irinotekanu to je kolorektální karcinom a glioblastomy^{87,91}.

2.2.2.1.4 Deriváty podofylotoxinu

Zdrojem lignanu podofylotoxinu je noholist štítnatý (*Podophyllum peltatum*). V terapii nádorových onemocnění jsou využívány jeho deriváty etoposid a teniposid. Mechanismus derivátů podofylotoxinu je inhibice topoisomerasy II⁸⁷.

Etoposid je indikován u karcinomu varlat, vaječníků a plic, Hodgkinova i non-Hodgkinova lymfomu, akutní myeloidní leukémie⁹².

2.2.2.1.5 Přírodní chemoprotektiva

Z hlediska chemoprotektivního účinku byl prokázán efekt na progresi a prevenci vzniku nádoru u zeleného čaje (*Camellia sinensis*). Za zmíněný účinek je zodpovědný zejména epigalokatechin-3-galát⁸⁷.

2.2.2.1.6 Amaryllidaceae alkaloidy

V rámci lykorinových alkaloidů je z pohledu protinádorové aktivity nejzajímavější lykorin. Mechanismus indukce apoptózy lykorinu spočívá v inhibici galaktodehydrogenasy, čímž zabrání finálnímu kroku syntézy kyseliny askorbové. Na lykorinem indukované apoptóze se dále podílí i zvýšená aktivita kaspas. K tomu je spojena i s regulací Bcl-2 proteinů. Tyto proteiny se podílejí na procesu apoptózy regulací propustností mitochondriální membrány^{7,19}. Zajímavá protinádorová aktivita byla zjištěna i u dalších alkaloidů lykorinového typu. Konkrétně se jedná o amarbellisin a pseudolykorin. Zatímco mechanismus účinku amarbellisinu není zcela prozkoumán, tak pseudolykorin působí skrze inhibici proteosyntézy při tvorbě peptidových vazeb. Lykorin prokázal silnou cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám myšího melanomu, leukémii nebo Lewisovu plicnímu karcinomu⁷.

Z alkaloidů homolykorinového typu byla protinádorová aktivita zjištěna u hippeastrinu, jehož účinek spočívá v inhibici topoisomerasy I., dále lykoreninu, homolykorinu a 8-O-dimethylhomolykorinu. Jak bylo zmíněno jejich nevýhodou je cytotoxická aktivita i k nenádorovým buňkám myších fibroblastů. U hippeastrinu i lykoreninu byl sledován efekt na inhibici proliferace buněk jaterního karcinomu a leukémie^{7,19}.

Haemanthamin, haemanthidin a krinamin jsou alkaloidy haemanthaminového typu se slibnou cytotoxickou aktivitou. Znalosti o mechanismu působení haemanthaminových derivátů jsou však minimální. Studie z roku 2012 uvádí schopnost vittatinu zamezit proliferaci nádorové buněčné linie tlustého střeva, ledvin nebo karcinomu plic. Z alkaloidů krininového typu je cytotoxická aktivita popsána zejména u vzácného distichaminu. Haemanthamin se ukázal jako účinný proti buněčným liniím potkaního jaterního karcinomu, myšího lymfomu, nebo T-lymfoblastové leukémie. U distichaminu byla sledována cytotoxická aktivita vůči akutní T-lymfoblastické leukémii, melanomu, karcinomu prsu a karcinomu děložního čípku^{7,19,32}.

Zástupcem alkaloidů tazettinového strukturního typu, u kterého byla sledována cytotoxická aktivita, je pretazettin. Tento alkaloid je prekurzorem tazettinu. Zajímavé je, že na rozdíl od svého prekurzoru samotný tazettin se nevyznačuje významnou aktivitou. V literatuře se uvádí, že pretazettin je schopen inhibovat P-glykoprotein a proteosyntézu^{7,19}.

Posledním strukturním typem s protinádorovou aktivitou je pankratistatinový typ. Z těchto alkaloidů byla cytotoxická aktivita popsána u narciklasinu a pankratistatinu. Mechanismus účinku narciklasinu spočívá v inhibici peptidyltransferasy na ribozomální podjednotce 60S a v antimitotickém efektu⁷.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Rozpouštědla, chemikálie, činidla

- acetanhydrid, $\geq 99\%$ (Acros)
- acetonitril, (Penta) (AcCN)
- amoniak, (Penta) (NH_3)
- benzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- cyklohexan, (Penta) (cHx)
- diethylamin, (Penta) (Et_2NH)
- dimethylaminopyridin, (Penta) (DMAP)
- ethanol 95 %, (Penta) (EtOH)
- ethylacetát, (Penta) (EtOAc)
- chloroform, (Penta) (CHCl_3)
- methanol, (Penta) (MeOH)
- oktanoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- pyridin, p. a. (Penta)
- toluen, p. a. (Penta) (To)
- 2-chlorobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 2-nitrobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 3-nitrobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- Dragendorffovo činidlo (detekční roztok)

Dragendorffovo činidlo jako zásobní roztok se připravuje smísením roztoku, který obsahuje 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého, 20 g kyseliny vinné, 80 g destilované vody a roztoku obsahujícího 32 g jodidu draselného, 80 g destilované vody. Roztok pro detekční činidlo, se připraví z 5 ml Dragendorfova zásobního roztoku, 50 g destilované vody a 10 g kyseliny vinné.

3.1.2 Rostlinný materiál

Alkaloid galanthin, který byl použit jako výchozí látka pro syntézu derivátů, byl izolován z cibulí rostliny *Narcissus poeticus recurvus* na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Cibule byly zakoupeny od firmy Lukon Glands se sídlem v Lysé nad Labem. Po zakoupení byla provedena botanická identifikace prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Příprava alkaloidního extraktu a jednotlivých podfrakcí je součástí náplně jiné diplomové práce, a proto zde není podrobně rozepsána.

Celkově se vycházelo z cca 29 kg čerstvých cibulí narcisů, které byly po rozdrobnění na menší částice extrahovány varem v ethanolu na vodní lázni. Výsledný extrakt byl následně přečištěn liquid-liquid extrakcí. Po odpaření na vakuové odparce vzniklo přibližně 35 g alkaloidního extraktu. Extrakt zbavený organické fáze byl dále dělen s pomocí flash chromatografie. Pro účel rozdělení byl jako stacionární fáze použit oxid hlinitý a jako mobilní fáze směs EtOH a CHCl₃. Získáno tak bylo celkem 19 podfrakcí, přičemž v rámci této diplomové práce byla zpracovávána podfrakce 7, ze které byl alkaloid galanthin izolován.

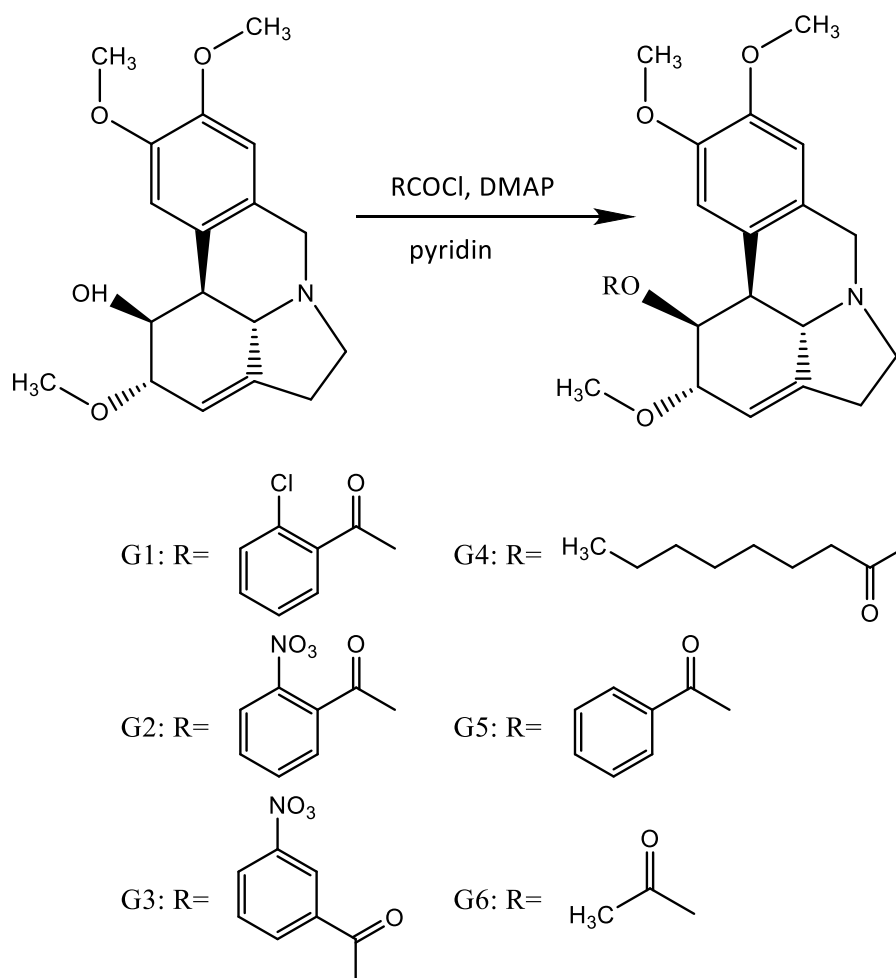
3.2 Izolace alkaloidů

Izolace alkaloidů z podfrakce 7, které bylo celkově 27,019 g, bylo provedeno pomocí tenkovrstvé chromatografie na skleněných chromatografických deskách. Pro separaci byl jako stacionární fáze použit silikagel a jako mobilní fáze To: Et₂NH v poměru 9:1. Extrakt byl rozpuštěn ve směsi CHCl₃: EtOH (1:1) a nanesen na 10 desek chromatografickým perem v několika vrstvách, v množství cca 35 mg/ deska, 1 cm od spodního a bočních okrajů. Po jednonásobném vyvíjení v chromatografických komorách byly desky vysušeny. Přítomnost alkaloidů byla detekována pomocí UV lampy a Dragendorffova činidla. Jednotlivé alkaloidní zóny byly separovány a následně eluovány přes vrstvu vaty v kolonách směsí CHCl₃ a EtOH. Jednotlivé frakce byly následně odpařeny na rotační vakuové odparce. Izolací byly získány celkem dvě frakce, přičemž první frakce byla identifikována jako alkaloid cheryllin, kterého bylo získáno 250 mg. Druhá frakce nebyla čistá a musela být chromatograficky dočištěna, kdy jako mobilní fáze byl použit To: MeOH v poměru 2:1 + 0,1 ml NH₃. Byly tak získány 3 frakce a izolováno bylo celkem 200 mg galanthinu. Strukturní identifikace galanthinu a cheryllinu pak byla potvrzena GC-MS a NMR analýzou a dále byla měřena optická otáčivost. Galanthin byl po krystalizaci použit na přípravu polosyntetických derivátů.

3.3 Metody použity při syntéze derivátů galanthinu

3.3.1 Příprava derivátů galanthinu

Navážka 30 mg galanthinu byla nejprve rozpuštěna ve 2 ml pyridinu. Následně bylo přidáno vypočítané množství chloridu, který byl přidán v mírném nadbytku, a katalyticky účinné množství DMAP. Reakce směsi probíhala v uzavřené zkumavce s magnetickým míchadlem, která byla umístěna v parafinové lázni na elektromagnetické míchačce s ohřevem. Teplota reakce byla v rozmezí 70-80 °C a probíhala asi 16 h. Jako kontrola zreagování galanthinu bylo po uplynutí této doby provedeno analytické TLC.



Obrázek 16: Syntéza derivátů galanthinu

3.3.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

3.3.2.1 Stacionární fáze

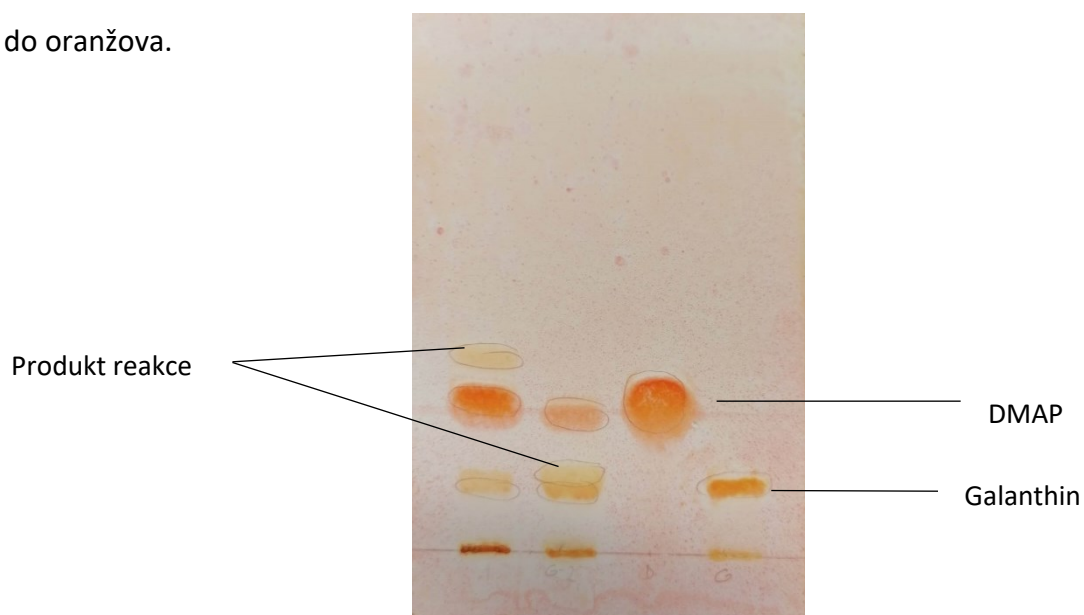
Pro analytickou i preparativní TLC byly použity komerčně vyráběné hliníkové desky Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ o velikosti 10 x 20 cm.

3.3.2.2 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla použita směs To: Et₂NH (9:1)

3.3.2.3 Analytická TLC

Jak bylo zmíněno, analytická TLC slouží jako kontrola proběhnutí reakce. Na TLC desku byly 1 cm od spodního a krajních okrajů postupně naneseny galanthin, jakožto výchozí látka, derivát a DMAP. Desky byly následně umístěny do chromatografické komory s mobilní fází a vyvíjeny. Po vyvíjení byly desky detekovány pod UV světlem při 254 nm. Jako poslední krok analytické TLC byla detekce postříkem Dragendorffovým činidlem, který zbarvil alkaloidní zóny do oranžova.



Obrázek 17: TLC deska po postříku Dragendorffovým činidlem

3.3.2.4 Preparativní TLC

Rozpuštěné produkty reakce byly nanášeny pomocí chromatografického pera na 5 komerčních TLC desek. Nanášeny byly 1 cm od spodního a bočních okrajů desek. Následně se desky nechaly vyvíjet v chromatografických komorách s mobilní fází. Po ukončení vyvíjení se nechaly desky vysušit v digestoři. Nakonec jednotlivé zóny na deskách byly detekovány pomocí UV světla a vyznačeny separační jehlou. Tyto zóny byly seškrábány a eluovány.

Deriváty G1 a G4 bylo nutné nechat vyvinout v komorách opakovaně (2x) z důvodu lepšího oddělení DMAP od produktu reakce. Jako mobilní fáze byla určena směs MeOH: AcCN: NH₃ (50:50:1).

3.3.3 Eluce

Promývání jednotlivých zón probíhalo v kolonách přes vrstvu vaty pomocí směsi EtOH: CHCl₃ v poměru 1:1. Kontrola, zda bylo veškeré množství alkaloidu eluováno, byla prováděna odebráním kapky kapilárou. Odebraná kapka byla nanesena na malý kousek TLC desky a postříkána Dragendorffovým činidlem. Pokud se v místě kapky neobjevila oranžová skvrna byla eluce považována za ukončenou.

3.3.4 Odpařování

Eluovaná směs byla odpařována na rotační vakuové odparce ve vodní lázni o teplotě 40 °C a rychlosti otáček zhruba 80 otáček za minutu.

3.4 Strukturní analýza

3.4.1 Optická otáčivost

Optická otáčivost se měřila v polarimetru Kruss Optronic. Před samotným měřením vzorků se provedlo ředění derivátů, aby koncentrace byla do 0,1g/100ml. Následně před samotným měřením bylo provedeno měření slepého vzorku CHCl₃. Každé měření se opakovalo celkem pětkrát. Naměřené hodnoty byly zaznamenány včetně teploty měření. Následně u každého vzorku byla vypočítána specifická optická otáčivost dle níže uvedeného vzorce.

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

α ... optická otáčivost vzorku (°)

t ... teplota měření (°C)

D ... vlnová délka D-linie sodíkového světla (nm)

c ... koncentrace vzorku v roztoku (g/100 ml)

l ... délka kyvety (dm)

3.4.2 Analýza látek pomocí GC-MS

Měření provedl RNDr. J. Jenčo, Ph.D. na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. GC-MS byla použita k předběžnému určení totožnosti cheryllinu a galanthinu. K měření byl využit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C inert MSD, který pracuje s ionizačním potenciálem 70 eV. K separaci byla využita kolona HP-5MS s rozměrem 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm a teplotní program 100-180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180-300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min). Jako nosný plyn bylo použito helium s rychlostí průtoku 0,8 ml/min. Nástřik vzorku (1 μl methanického roztoku o koncentraci 1 mg/ml) byl proveden za teploty 180 °C při splitu 1:10. Měření hodnot probíhalo v rozsahu 40-600 m/z.

3.4.3 ESI-HRMS analýza

ESI-HRMS spektra byla změřena na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové Prof. PharmDr. L. Novákovou, Ph.D.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením je identifikační metoda, realizována při strukturní identifikaci v literatuře dosud nepopsaných sloučenin. Struktury jsou identifikovány na základě iontů podle poměrů jejich hmotnosti a náboje (m/z). ESI-HRMS spektra byla změřena za pomoci Synapt G2-Si Q-TOF (Waters) spektrometru. Jedná se o hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací, který je navíc opatřen analyzátozem typu kvadrupól-analyzátor doby letu. Jako prostředí pro měření vzorků byl použit acetonitril (MeCN). Teoretické poměry hmotnosti a náboje byly následně srovnávány s experimentálně zjištěnými. V ideálním případě by tyto dvě hodnoty měly být totožné alespoň do druhého desetinného místa a neměly by se tedy výrazně lišit.

3.4.4 NMR analýza

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. J. Kunešem, CSc. a PharmDr. J. Křoustkovou, PhD.

NMR spektra byla změřena za pomoci NMR S500 spektrometru. Což je spektrometr, jenž pro ^1H a ^{13}C jádra pracuje při frekvenci 500 MHz respektive 125 MHz. Vzorky byly měřeny při teplotě 25 °C. Jako prostředí pro měření vzorků byl použit deuterovaný chloroform (CDCl_3). Jako detektor signálu a zároveň k ozařování byla použita sonda OneNMR. Jedná se o širokopásmovou dvoukanálovou gradientní sondu, která zároveň disponuje schopností

tepelné regulace. Ke změření chemických posunů δ byly použity hodnoty pars per milion (ppm). Hodnoty ppm byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jakožto standardu pomocí zbytkového rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu jsou pro atomy ^1H $\delta = 7,26$ ppm respektive $\delta = 77,0$ ppm pro atomy ^{13}C . Naměřená data jsou uvedena v tomto pořadí: chemický posun δ (ppm), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, dd = dublet dubletu, ddd = dublet dubletu dubletu, td = triplet dubletu, m = multiplet, bs = široký singlet), integrační konstanta J (Hz).

3.4.5 Měření toxicity na jaterní buňky (MMT test)

MMT test slouží jako indikátor ke zjištění životaschopnosti a cytotoxicity, jehož hlavním principem je redukce žluté tetrazoliové soli za vzniku formazanu ve formě purpurového krystalu. Hlavním enzymem zodpovědným za zmíněnou reakci je oxidoreduktasa nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) nacházející se v mitochondriích. V návaznosti na reakci probíhá solubilizace krystalů formazanu, které tak přechází na barevný roztok.

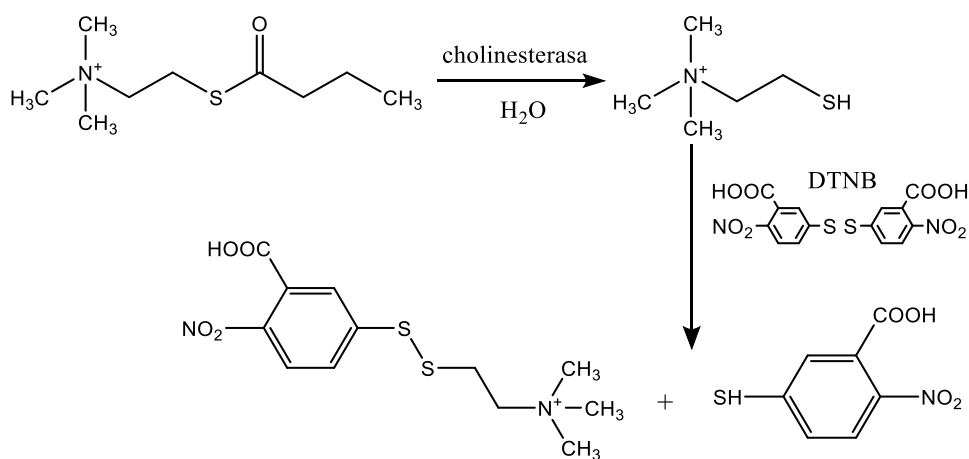
Nejprve se připraví zásobní roztoky testovaných extraktů s pomocí dimethylsulfoxid (DMSO). Tyto zásobní roztoky mají koncentraci 1 mM. Při použití se ředí na odpovídající koncentraci, která činí 50 μM respektive 10 μM . Koncentrace DMSO činí maximálně 0,5 %. Měření probíhá tedy při koncentracích vzorku 10 a 50 μM , přičemž standardem je doxorubicin hydrochlorid. Kultivace buněk buněčné linie jaterního karcinomu HepG2 probíhá v médiu Minimum Essential Eagle. Před samotnou inkubací buněk, která nejprve probíhá 5 minut za teploty 37 $^{\circ}\text{C}$ byly buňky propláchnuty fosfátovým pufrům. Následně byly buňky inkubovány v 96jamkové destičce při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Densita buněk v jednotlivých jamkách činila 10^4 . Po uplynutí 24 hodin se odstranilo kultivační médium. K buňkám se do každé jedné jamky přidalo 100 μl testovaného extraktu v roztoku. Zároveň se provedla i negativní kontrola jako referenční hodnota. K negativní kontrole se nepřidávaly testované extrakty, pouze byl použit DMSO v koncentraci 0,5 %. Následovala další 24hodinová inkubace při 5% koncentraci oxidu uhličitého a teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$. Po odstranění testovaných látek se k buňkám přidal roztok 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu v objemu 110 μl s Roswell Park Memorial Institute médiem. Následovala další inkubace. Po uplynutí 3 hodin proběhla solubilizace formazanu 100 μl DMSO. Zkoumaným roztokům byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru. Mezi odstínem barvy roztoku a množstvím životaschopných buněk platí úměra, že čím tmavší je barva roztoku tím je větší počet životaschopných buněk.

U testovaných látek se nakonec spočítala aktivita stanovením viability. U látek se zjištěnou aktivitou menší než 50 % při koncentraci 10 μM je následně stanovena hodnota IC_{50} .

3.4.6 Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Inhibiční potenciál připravených derivátů vůči AChE a BuChE byl změřen na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Měření provedla PharmDr. Daniela Suchánková, Ph.D.

Enzymy jsou připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Stanovení aktivity připravených derivátů probíhalo Ellmanovou spektrofotometrickou metodou. Jedná se o metodu, jejíž principem je reakce thiocholinu s Ellmanovým činidlem (DTNB), vznik produktů a následné měření absorbance. Metoda se provádí v mikrotitrační destičce se 6 jamkami, do kterých je napipetováno 8,3 μl roztoku enzymu, 283 μl 5mM DTNB a 8,3 μl roztoku testovaného derivátu o dané koncentraci (případně lze použít DMSO jako slepý vzorek). Po dobu 5 minut za 37 $^{\circ}\text{C}$ je potřeba destičku inkubovat v přístroji Reader SynergyTM. Ke vzorku bylo přidáno buď 33,3 μl acetylthiocholin jodidu nebo butyrylthiocholin jodidu (v koncentraci 10 μM) jakožto substrát. Substrát následně podlehl hydrolýze na příslušnou kyselinu a thiocholin. Reakcí DTNB s thiocholinem vznikl žlutě zbarvený produkt. Následně bylo u vzorků v průběhu 1 minuty měřeno zvýšení absorbance. U jednotlivých vzorků byla vypočítána % inhibice. Pro látky, které vykazují % inhibice převyšující 50 % je změřena hodnota IC_{50} . Hodnota IC_{50} je následně vypočítána v programu GraphPad Prism 8. Procentuální inhibice ChE byly spočítány s pomocí naměřených hodnot rozdílu absorbance. Jako referenční látky byly použity galanthamin a eserin s jejichž hodnotami byly srovnávány výsledné hodnoty derivátů.

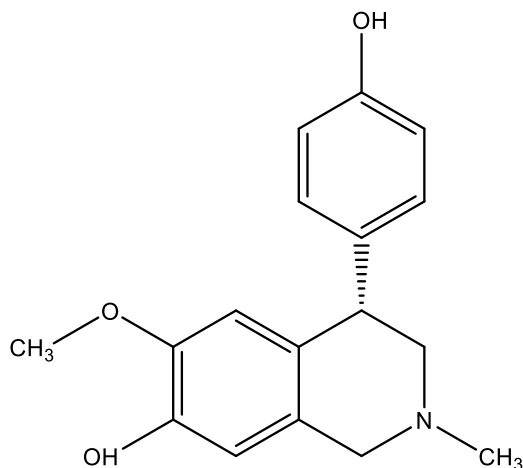


Obrázek 18: Hydrolytická reakce za použití DTNB⁹³

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolované alkaloidy

4.1.1 Cheryllin



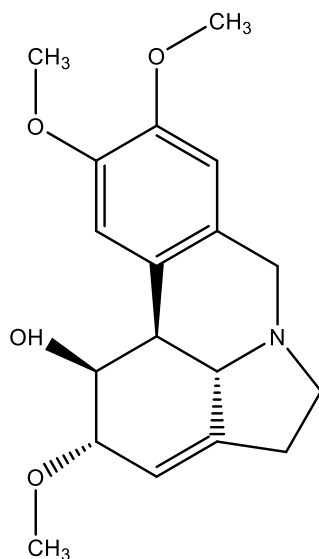
Obrázek 24: Struktura cheryllinu

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27,8^\circ C} = 16^\circ \text{ (c = 0,05 g/100ml; CHCl}_3\text{:EtOH 1:1)}$$

Vzorek byl identifikován jako cheryllin, kdy NMR data se shodovala s daty publikovanými v článku Raja et al.⁹⁴

4.1.2 Galanthin



Obrázek 25: Struktura galanthinu

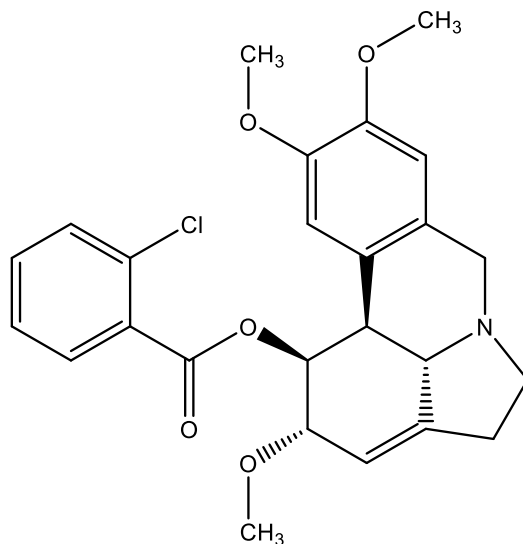
Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27,8^\circ C} = -32^\circ \text{ (c = 0,1 g/100ml; CHCl}_3\text{)}$$

Vzorek byl identifikován jako galanthin, kdy NMR data se shodovala s daty publikovanými v článku Berkov S. et al.⁹⁵

4.2 Syntetizované deriváty galanthinu

4.2.1 2-chlorobenzoylgalanthin (G1)



Obrázek 18: Struktura 2-chlorobenzoylgalanthinu

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{17,8^\circ C} = 20^\circ \text{ (c = 0,1 g/100ml; CHCl}_3\text{)}$$

NMR:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.58 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 5.72–5.68 (m, 1H), 4.78–4.74 (m, 1H), 4.45 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.85–3.76 (m, překryv, 1H) 3.81 (s, překryv, 3H), 3.58–3.55 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.11–3.05 (m, 1H), 2.93–2.82 (m, 3H), 2.75 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 15.2 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H).

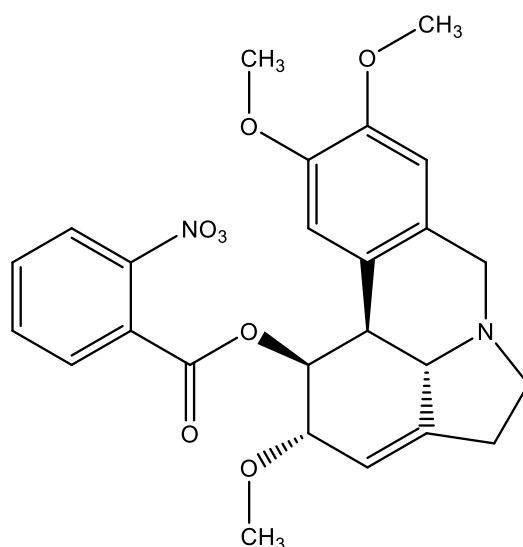
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 171.8, 149.6, 147.9, 142.3, 139.0, 136.8, 131.5, 130.2, 130.2, 129.8, 126.6, 120.0, 119.2, 110.9, 108.1, 80.1, 65.2, 59.4, 58.4, 56.3, 56.1, 54.3, 53.4, 38.2, 30.5.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 456,1572

m/z teoretický = 456,1572

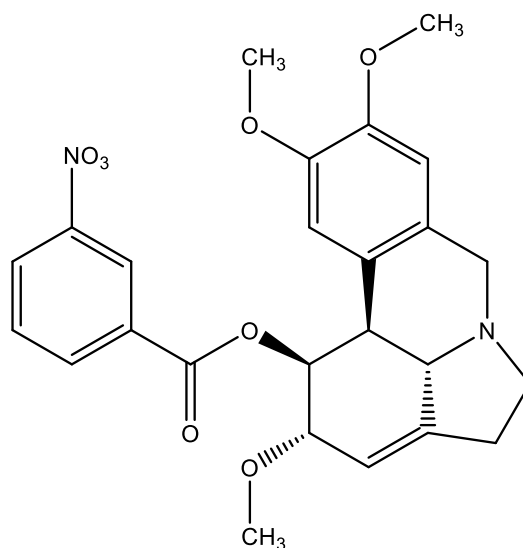
4.2.2 2-nitrobenzoylgalanthin (G2)



Obrázek 19: Struktura 2-nitrobenzoylgalanthinu

Nepodařilo se připravit v dostatečném množství a čistotě.

4.2.3 3-nitrobenzoylgalanthin (G3)



Obrázek 20: Struktura 3-nitrobenzoylgalanthinu

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27,8^\circ C} = -124^\circ \text{ (c = 0,1 g/100ml; CHCl}_3\text{)}$$

NMR

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.62–8.58 (m, 1H), 8.33 (ddd, $J = 7.9$ Hz, $J = 2.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 8.13 (dt, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.20–6.16

(m, 1H), 5.63–5.58 (m, 1H), 4.17 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.85–3.82 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.40 (dt, $J = 9.5$ Hz, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.03–2.96 (m, 2H), 2.92–2.89 (m, 1H), 2.73–2.67 (m, 2H), 2.58–2.48 (m, 1H).

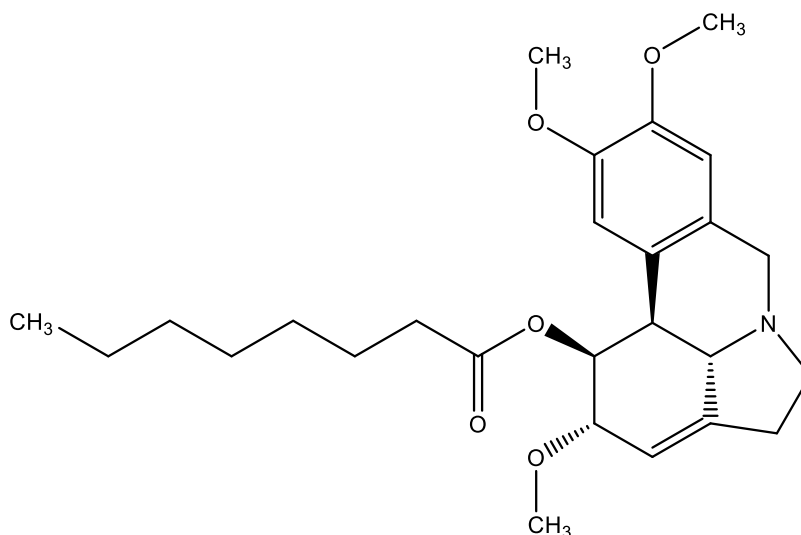
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 164.1, 148.3, 147.7, 147.6, 144.5, 135.3, 131.7, 129.8, 128.3, 127.7, 125.6, 124.7, 115.6, 110.4, 107.7, 79.3, 70.5, 61.7, 58.3, 56.4, 56.0, 55.9, 53.8, 40.4, 28.9.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 467,1822

m/z teoretický = 467,1813

4.2.4 Oktanoylgalanthin (G4)



Obrázek 21: Struktura oktanoylgalanthinu

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{18,8^\circ\text{C}} = -24^\circ$ ($c = 0,1$ g/100ml; CHCl_3)

NMR

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.91 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.66–5.63 (m, 1H), 4.72–4.68 (m, 1H), 4.02–3.96 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.89–3.84 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.27–3.20 (m, 2H), 2.76–2.71 (m, 1H), 2.71–2.61 (m, 1H), 2.28–2.21 (m, 1H), 1.62–1.52 (m, 1H), 1.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.29–1.21 (m, 5H).

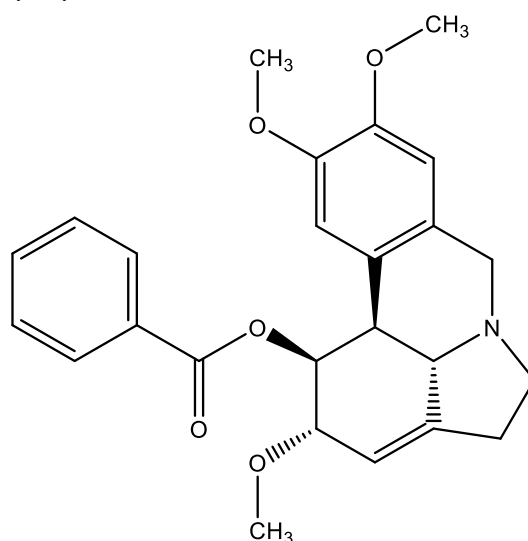
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 178.0, 148.7, 147.9, 134.5, 126.9, 120.3, 117.1, 110.8, 107.8, 67.3, 60.5, 58.0, 56.3, 56.1, 55.3, 54.1, 42.3, 40.2, 34.7, 31.8, 29.2, 29.1, 25.2, 22.7, 14.1, 11.2.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 444,2751

m/z teoretický = 444,2745

4.2.5 Benzoylgalanthin (G5)



Obrázek 22: Struktura benzoylgalanthinu

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{28,1^\circ C} = -60^\circ \text{ (c = 0,1 g/100ml; CHCl}_3\text{)}$$

NMR

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.84–7.78 (m, 2H), 7.51–7.47 (m, 1H), 7.39–7.31 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.15–6.13 (m, 1H), 5.61–5.57 (m, 1H), 4.17 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.85–3.80 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.61 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.38 (ddd, $J = 8.9$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 1H), 2.98–2.91 (m, 2H), 2.71–2.65 (m, 2H), 2.55–2.47 (m, 1H).

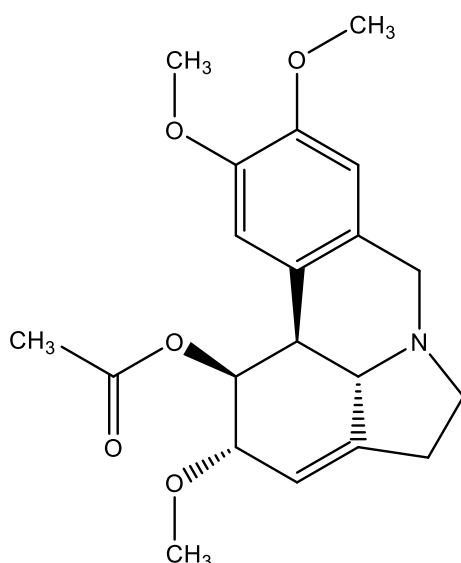
$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 166.1, 147.6, 147.5, 144.4, 133.2, 130.0, 129.7, 128.4, 128.2, 126.2, 115.8, 110.3, 107.9, 79.3, 69.3, 61.7, 58.4, 56.4, 56.0, 55.9, 53.9, 40.3, 28.9

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 422,1970

m/z teoretický = 422,1962

4.2.6 Acetylgalanthin (G6)



Obrázek 23: Struktura acetylgalanthinu

Optická otáčivost:

$$[\alpha]_D^{27,8^\circ C} = -72^\circ \text{ (c = 0,1 g/100ml; CHCl}_3\text{)}$$

NMR

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.74 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 5.89–5.87 (m, 1H), 5.56–5.51 (m, 1H), 4.14 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.69–3.66 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.54 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.34 (ddd, $J = 8.8$, $J = 6.9$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1H), 2.85–2.79 (m, 1H), 2.72 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 2.67–2.57 (m, 2H), 2.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 1.90 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 170.6, 147.6, 147.5, 144.5, 128.3, 126.2, 115.6, 110.3, 107.8, 79.3, 68.7, 61.4, 58.2, 56.5, 56.1, 55.9, 53.8, 40.0, 28.8, 21.2.

ESI-HRMS:

m/z experimentální = 360,1807

m/z teoretický = 360,1806

4.3 Výtěžnost reakcí

Procentuální výtěžnost jednotlivých reakcí byla vypočtena z výtěžku reakce, naváženého množství galanthinu a vypočítaného teoretického výtěžku. Teoretický výtěžek a reálná výtěžnost byly spočítány následujícím způsobem: navážka galanthinu x Mr derivátu / Mr galanthinu a reálná výtěžnost jako výtěžek reakce / teoretický výtěžek x 100.

Jako příklad je uveden výpočet G1:

Teoretický výtěžek = navážka galanthinu x Mr derivátu / Mr galanthinu

$$= 30 \times 455,94 / 317,39$$

$$= 43,10 \text{ mg}$$

Reálná výtěžnost = výtěžek reakce / teoretický výtěžek x 100

$$= 31,4 / 43,10 \times 100$$

$$= 72,85 \%$$

Tabulka č. 5: Výtěžky připravených derivátů

Název derivátu	Navážka (mg)	Teoretický výtěžek (mg)	Výtěžek (mg)	Výtěžnost (%)
G1 2- chlorobenzoylgalanthin	30,00	43,10	31,40	72,85
G2 2-nitrobenzoylgalanthin	30,10	45,76	8,80	19,23
G3 3-nitrobenzoylgalanthin	30,00	45,61	22,60	49,55
G4 oktanoylgalanthin	30,00	41,93	21,80	51,99
G5 benzoylgalanthin	29,90	39,71	15,80	39,79
G6 acetylgalanthin	30,00	33,76	18,70	55,39

4.4 Výsledky měření toxicity na jaterní buňky (MMT test)

Všech šest derivátů galanthinu bylo testováno na toxicitu na jaterní buňky a byla u nich stanovena viabilita.

Tabulka č. 6: Výsledky měření toxicity na jaterní buňky

Látky (c = 50 / 10 μM)	Průměrná viabilita [%]	SD	Výsledek [%]
G-1 50	58,05	4,77	58,00 ± 5,00
G-1 10	67,80	3,01	67,00 ± 3,00
G-3 50	50,34	6,28	50,00 ± 6,00
G-3 10	87,68	0,14	88,00 ± 0,00
G-4 50	59,67	8,63	60,00 ± 9,00
G-4 10	86,44	7,92	86,00 ± 8,00
G-5 50	42,56	0,55	43,00 ± 1,00
G-5 10	62,79	5,52	63,00 ± 6,00
G-6 50	41,44	5,56	41,00 ± 6,00

Látky (c = 50 / 10 μM)	Průměrná viabilita [%]	SD	Výsledek [%]
G-6 10	56,62	6,25	57,00 \pm 6,00

Standard: DOX HCl IC_{50} = 4,42 \pm 0,34

μM

Denzita buněk $1 \cdot 10^4$ /jamka

4.5 Výsledky stanovení inhibiční aktivity vůči AChE/BuChE

Všechny deriváty galanthinu mimo G2, který se nepodařilo připravit v dostatečném množství, byly testovány na inhibiční aktivitu vůči ChE a byla u nich spočítána hodnota IC_{50} .

Tabulka č. 7: Procenta inhibice a hodnoty IC_{50} syntetizovaných derivátů vůči cholinesterasam

Číslo vzorku	AChE (% inhibice) při [10 μM]	IC_{50} AChE [μM]	BuChE (% inhibice) při [10 μM]	IC_{50} BuChE [μM]
G-1	7,45 \pm 1,50	> 10,00	13,01 \pm 0,89	> 10,00
G-3	29,59 \pm 2,09	> 10,00	5,71 \pm 1,22	> 10,00
G-4	4,28 \pm 0,89	>10,00	8,77 \pm 0,53	>10,00
G-5	20,94 \pm 2,11	> 10,00	4,29 \pm 0,75	> 10,00
G-6	23,29 \pm 0,48	> 10,00	9,63 \pm 0,89	> 10,00
Referenční látka				
Galanthamin HBr	79,96 \pm 1,40	2,01 \pm 0,14	29,31 \pm 3,49	33,69 \pm 2,66
Eserin	96,59 \pm 0,55	0,20 \pm 0,01	95,96 \pm 0,31	0,30 \pm 0,01

5 DISKUZE A ZÁVĚR

Galanthin je alkaloid lykorinového typu, který nevykazuje cytotoxickou aktivitu ani inhibiční aktivitu vůči ChE. Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu jeho semisyntetických derivátů s cílem zjistit, zda je možné obměnou hydroxylové skupiny ve struktuře galanthinu dosáhnout lepších účinků. Celkově bylo připraveno 6 polosyntetických derivátů galanthinu. Reakce probíhala s 2-chlorobenzoyl chloridem, 2-nitrobenzoyl chloridem, 3-nitrobenzoyl chloridem, oktanoyl chloridem, benzoyl chloridem a acetanhydridem v prostředí bezvodého pyridinu a malým množstvím DMAP, přičemž vznikaly příslušné estery. Výtěžnost třech derivátů přesahovala 50 % (G1, G4, G6) (Tabulka č. 1). Naopak G2 se nepodařilo připravit v dostatečném množství a čistotě, jeho výtěžnost byla pouhých 19,23 %. Totožnost derivátů byla potvrzena NMR a HRMS a následně byla změřena optická otáčivost.

Syntetizované deriváty byly podrobeny Ellmanově metodě na zjištění potenciálu inhibovat AChE a BuChE. Bohužel ani jeden z derivátů neprokázal výraznou inhibiční aktivitu ku AChE ani BuChE. Vzhledem k tomu, že samotný galanthin k AChE ani BuChE aktivní není, tyto výsledky nejsou překvapující. Nicméně alkaloidy lykorin ani ambellin také nejsou účinné vůči ChE, ale vhodnou derivatizací se v již publikovaných pracích podařilo získaly deriváty se zvýšenou aktivitou k BuChE (L3, A5 a A11)^{39,40}.

V tabulce č. 7 a 8 jsou srovnány inhibiční hodnoty IC_{50} vůči ChE jednotlivých derivátů galanthinu s deriváty dalších alkaloidů. Konkrétně haemanthaminem, ambellinem a vittatinem. K porovnání byly kromě čtyř výjimek vybrány substituenty benzoylchloridy, které byly použity i u derivátů galanthinu. Deriváty čtyř zmíněných alkaloidů se tedy liší pouze polohou hydroxylové skupiny, která je substituována. Z výsledků je zřejmé, že deriváty galanthinu stejně jako lykorinu nevykazují zajímavou inhibiční aktivitu ani k jedné z ChE. Jedinou výjimkou je 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin jehož hodnoty IC_{50} byly $29,6 \pm 6,8$ (μM). Stejně tak u derivátů ambellinu zajímavého výsledku vůči BuChE dosahoval z uvedených pouze 11-*O*-benzoylambellin ($IC_{50} = 4 \pm 0$ μM). Deriváty vittatinu a haemanthaminu jsou na tom z hlediska inhibičních aktivit k ChE o dost lépe. Zvýšené aktivity k AChE bylo docíleno 3-nitrobenzoyl substitucí u vittatinu ($IC_{50} = 12,44 \pm 0,08$ μM) respektive 4-nitrobenzoyl substitucí hydroxylové skupiny haemanthaminu ($IC_{50} = 15 \pm 2$ μM). Důkazem lepších inhibičních vlastností je i hodnota IC_{50} 3-*O*-(3-chlorobenzoyl)vittatinu vůči BuChE, která činí $5,44 \pm 0,06$ μM . Případně benzoyl derivát haemanthaminu dosahoval hodnot $IC_{50} = 6 \pm 0$ μM . OH skupina galanthinu byla navíc

substituována osmi uhlíkatým lineárním řetězcem, ovšem bez výraznější změny aktivity. Stejně tak i ambellin a haemanthamin byly substituovány uhlíkatým alifatickým řetězcem (pěti, respektive šesti uhlíkatým), nicméně také bez výraznější změny v inhibiční aktivitě k ChE. Jako substituent, který nejvíce ovlivnil hodnoty IC₅₀ ambellinu, vittatinu, haemanthaminu, se jeví benzoyl a nitrobenzoyl skupina (NO₂ v poloze 2, 3 a 4). Ovšem ani tyto substituenty nevedly, ke zlepšení hodnot IC₅₀ galanthinu, jenž k AChE ani BuChE nevykazuje aktivitu.

Tabulka č. 8: Hodnoty IC₅₀ (μM) příslušných derivátů u AChE

Substituce	Galanthin	Ambellin	Vittatin	Haemanthamin	Lykorin
2-chlorobenzoyl	>10	nt	>100	nt	nt
3-chlorobenzoyl	nt	nt	nt	85 ± 6	nt
2-nitrobenzoyl	nt	nt	nt	nt	146 ± 6
3-nitrobenzoyl	>10	48 ± 2	12 ± 0	nt	149 ± 8
4-nitrobenzoyl	nt	>100	>100	15 ± 2	357 ± 1
benzoyl	>10	>100	nt	294 ± 25	171 ± 2
acetyl	>10	>100	nt	>500	nt
oktanoyl	>10	nt	nt	nt	nt
hexanoyl	nt	nt	nt	>500	nt
pentanoyl	nt	>100	nt	>500	nt

nt=netestováno

Tabulka č. 9: Hodnoty IC₅₀ (μM) příslušných derivátů u BuChE

Substituce	Galanthin	Ambellin	Vittatin	Haemanthamin	Lykorin
2-chlorobenzoyl	>10	nt	nt	nt	nt
3-chlorobenzoyl	nt	nt	5 ± 0	80 ± 1	nt
2-nitrobenzoyl	nt	nt	nt	nt	117 ± 7
3-nitrobenzoyl	>10	81 ± 2	57 ± 1	nt	116 ± 6,6
4-nitrobenzoyl	nt	>100	22 ± 0	>500	466 ± 8
benzoyl	>10	4 ± 0	nt	6 ± 0	30 ± 7
acetyl	>10	>100	nt	>500	nt
oktanoyl	>10	nt	nt	nt	Nt
hexanoyl	>10	nt	nt	273 ± 2	nt
pentanoyl	>10	>100	nt	>500	nt

nt=netestováno

Deriváty galanthinu byly také podrobeny testování na toxicitu vůči buněčné linii jaterního karcinomu HepG2. Působení ani jednoho z připravených derivátů však nevykazovalo dostatečnou aktivitu, a i z tohoto důvodu nebyly měřeny hodnoty IC₅₀. Z výsledků tohoto měření lze tedy usoudit, že sice látky nejsou cytotoxické, ale lze tedy říci, že nepoškozují buňky lidského těla, což je také velmi důležité u nových potenciálních léčiv. Bohužel ani u derivátů ostatních alkaloidů nebylo dosaženo výrazné cytotoxické aktivity. Výjimkou jsou dva

deriváty vittatinu, které byly připraveny v rámci diplomové práce Valachové I. Konkrétně se jednalo o 3-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)vittatin. Nicméně tento derivát vittatinu nebyl testován na buněčné linii HepG2, ale zajímavých výsledků dosáhl na buněčných liniích HeLa ($3 \pm 3 \%$), HT-29 ($7 \pm 4 \%$), MCF-7 ($13 \pm 4 \%$) a A549 ($9 \pm 3 \%$). Druhým derivátem byl 3-*O*-(2-naphthoyl)vittatin jehož viabilita dosahovala hodnoty $32 \pm 3 \%$ vůči buněčné linii HT-29¹¹.

6 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Matěj Lojkásek

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

Název diplomové práce: Izolace alkaloidů z *Narcissus poeticus recurvus* a jeho polosyntetické deriváty

Klíčová slova: Amaryllidaceae, galanthin, polosyntetické deriváty, Alzheimerova choroba, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, cytotoxicita.

V rámci diplomové práce byly izolovány dvě alkaloidní látky (galanthin a cheryllin) z cibulí matečné rostliny *Narcissus poeticus recurvus* pomocí preparativní TLC chromatografie. Získaný galanthin byl následně použit pro přípravu 6 derivátů tohoto alkaloidu, a to konkrétně esterů. Estery galanthinu byly připraveny acylací hydroxylové skupiny. Deriváty byly identifikovány pomocí NMR, HMRS a byla změřena optická otáčivost. Z připravovaných látek se nakonec podařilo připravit v dostatečném množství a čistotě pouze 5. Derivát G2 se nepodařilo připravit. V případě G1, G4 a G6 byl výtěžek reakce vyšší než 50 % naopak u G3 byl 49,55 %, G2 19,23 % a G5 39,79 %.

U všech připravených derivátů krom G2 byla za použití rekombinantních enzymů testována inhibiční aktivita vůči cholinesterasám Ellmanovou metodou. Bohužel podle hodnot IC_{50} žádný z testovaných derivátů nevykázal významnou inhibiční aktivitu vůči AChE ani BuChE.

Mimo inhibiční účinky na cholinesterasy byla testována cytotoxická aktivita na 1 nádorovou buněčnou linii jaterního karcinomu (HepG2). Bohužel ani zde látky nevykázaly významnou cytotoxickou aktivitu pro potenciální použití v léčbě nádorových jaterních onemocnění, ale naopak je významné, že deriváty výrazně nepoškozují jaterní buňky a lze tedy usuzovat, že jsou netoxické pro lidské buňky.

7 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Candidate: Matěj Lojkásek

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

Title of thesis: Isolation of alkaloids from *Narcissus poeticus recurvus* and its semi-synthetic derivatives

Key words: Amaryllidaceae, galanthin, semi-synthetic derivatives, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cytotoxicity.

As part of the thesis, two alkaloid substances (galanthin and cherylline) were isolated from the bulbs of the mother plant *Narcissus poeticus recurvus* using preparative TLV chromatography. The obtained galanthin was subsequently used for the preparation of 6 derivatives of this alkaloid, namely esters. Galanthine esters were prepared by acylation of the hydroxyl group. The derivatives were identified by NMR, HMRS and the optical rotation was measured. In the end, only 5 of the prepared substances were recovered in sufficient quantity and purity. Derivative G2 could not be retained. In the case of G1, G4 and G6, the yield of the reaction was higher than 50%, whereas for G3 it was 49.55%, G2 19.23% and G5 39.79%.

All prepared derivatives except G2 were tested for inhibitory activity against cholinesterases by the Ellman method using recombinant enzymes. Unfortunately, according to the IC50 values of the tested derivatives, it did not show any inhibitory attitude towards AChE or BuChE.

In addition to the inhibitory effects on cholinesterases, cytotoxic activity was tested on 1 tumor cell line of liver cancer (HepG2). Bohuel also did not show a potential cytotoxic activity for use in the treatment of cancerous liver diseases, but on the contrary, it is significant that the derivatives do not significantly damage liver cells and it can therefore be concluded that they are non-toxic to human cells.

POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ Petrovská B., Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* 6, 2012; 1-5
- ² Spilková J. a kol., *Farmakognozie*; Karolinum: Praha, 2016
- ³ Ka S., Koirala M., Mérindol N., Desgagné-Penix I., Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 25, 2020; 4901
- ⁴ Ding Y., Qu D., Zhang K. M., Cang X. X., Kou Z. N., Xiao W., Zhu J. B., Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 19, 2017; 53-100
- ⁵ Hulcová D., Maříková J., Cahlíková L., et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* 165, 2019; 112055
- ⁶ Karakoyun Ç., Bozkurt B., Çoban G., et al. A comprehensive study on *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L.: Chemo-profiling, isolation, anticholinesterase activity and molecular docking of amaryllidaceae alkaloids, *South African Journal of Botany* 130, 2020, 148-154
- ⁷ Dalecká M., Havelek R., Královec K., et Al. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* 107, 2013; 701–708
- ⁸ Takos A. M., Rook F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 2013;11713-11741
- ⁹ Berkov S., Codina C., Bastida J. The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.* 2012; 235-254
- ¹⁰ Jahodář L. a kol., *Farmakobotanika: semenné rostliny*; Karolinum: Praha, 2006
- ¹¹ Valachová I., Deriváty *Amaryllidaceae* alkaloidů jako látky potenciálně využitelné v terapii nádorových onemocnění; Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2020
- ¹² Kohelová E., *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. II.* Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017

- ¹³<https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/10-leucojum-vernum-bledule-jarni> (citováno 27. 10. 2022)
- ¹⁴<https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/287-galanthus-nivalis-snezenka-podsneznik> (citováno 27. 10. 2022)
- ¹⁵ <https://botany.cz/cs/hippeastrum-striatum/> (citováno 27. 10. 2022)
- ¹⁶ <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id42016/> (citováno 3. 11. 2022)
- ¹⁷ Refaat Boshra Y., Refaat Fahim J., Nageeb Elsayed Hamed A., Yehia Desoukey S., Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): A review, South African Journal of Botany 146, 2022; 437-458
- ¹⁸ Ruch N. *Narcissus recurvus* Haw. (Amaryllidaceae): originaire de Suisse?. Bulletin de la Murithienne 137. 2019; 27-32
- ¹⁹ Hulcová D., *Biologická aktivita alkaloidů Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae); Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018
- ²⁰ Ka-Li F., Xian L., Ji Y., et. Al. Chemical constituents of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and their antioxidant activities, Fitoterapia 113, 2016; 110-116
- ²¹ Štursa J., *Cibulové a hlíznaté rostliny*; Aventinum: Praha, 1997
- ²²[https://www.rhs.org.uk/plants/76534/narcissus-poeticus-var-recurvus-\(13\)/details](https://www.rhs.org.uk/plants/76534/narcissus-poeticus-var-recurvus-(13)/details) (citováno 3. 11. 2022)
- ²³ Li X., Lu M., Tang D., Shi Y. Composition of Carotenoids and Flavonoids in *Narcissus* Cultivars and their Relationship with Flower Color. PLoS ONE 10, 2015; 8
- ²⁴ Li X., Tang D., Shi Y. Volatile compounds in perianth and corona of *Narcissus Pseudonarcissus* cultivars. Nat Prod Res. 33, 2019, 2281-2284
- ²⁵ <https://botany.cz/cs/narcissus-poeticus/> (citováno 3. 11. 2022)
- ²⁶ Wang R., Han X., Xu S., Xia B., Jiang Y., Xue Y., Wang R. Cloning and characterization of a tyrosine decarboxylase involved in the biosynthesis of galanthamine in *Lycoris aurea*. PeerJ. 2019; 6729

- ²⁷ Ferdausi A., Chang X., Hall A., Jones M., Relative expression of putative genes involved in galanthamine and other Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in *Narcissus* field and in vitro tissues, *Gene* 774, 2021; 145424
- ²⁸ Wei L., Chong Q., Jing P., Guolin Z., Yinggang L., The versatile O-methyltransferase LrOMT catalyzes multiple O-methylation reactions in amaryllidaceae alkaloids biosynthesis, *International Journal of Biological Macromolecules* 141, 2019; 680-692
- ²⁹ Georgiev V., Ivanov I., Pavlov A. Recent Progress in Amaryllidaceae Biotechnology. *Molecules* 25. 2020; 4670
- ³⁰ Singh A, Desgagné-Penix I. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today* 1. 2014; 20-114
- ³¹ Ka S., Koirala M., Mérindol N., Desgagné-Penix I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids *Molecules* 25, 2021; 4901
- ³² De Andrade J. P. et al. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. latinoamericana química* 40, 2012; 83-98
- ³³ Berkov S., Martínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S., Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*, *Phytochemistry* 99, 2014; 95-106
- ³⁴ Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., et al. The Genus *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae): Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules*, 2019; 8
- ³⁵ Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* 29, 2017; 486-499
- ³⁶ Breiterová K., *Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění*; Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019
- ³⁷ Parnes J. S., Carter D. S., Kurz L. J., Flippin L. A. Concise synthesis of *Narcissus* pyrrolophenanthridine alkaloids: Vasconine, Assoanine and Oxoassoanine. *The Journal of Organic Chemistry* 59, 1994; 3497-3499

- ³⁸ Wang Y. H., Wan Q. L., Gu C. D., et al. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal* 6, 2012; 96
- ³⁹ Lipovská K., *Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita*; Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018
- ⁴⁰ Ritomská A., *Derivates of Amaryllidaceae alkaloids as drugs*; Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019
- ⁴¹ <https://spectrabase.com/compound/1Fh74ZTnvvB> (citováno 8. 11. 2022)
- ⁴² <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lycorenine#section=2D-Structure> (citováno 9. 11. 2022)
- ⁴³ Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., et al. Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules* 24, 2019; 1307
- ⁴⁴ Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., et al. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their in vitro and in silico biological activity connected to Alzheimer's disease, *Bioorganic Chemistry* 100, 2020; 103928
- ⁴⁵ Cortes N., Posada-Duque R. A., Alvarez R., et al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study, *Life Sciences* 122, 2015; 42-50
- ⁴⁶ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Crinine> (citováno 14. 11. 2022)
- ⁴⁷ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443693#section=Structures> (citováno 16. 11. 2022)
- ⁴⁸ Harvey A. L., The pharmacology of galanthamine and its analogues, *Pharmacology & Therapeutics* 68, 1995; 113-128
- ⁴⁹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galantamine#section=Structures> (citováno 16. 11. 2022)

- ⁵⁰ Zaragoza-Puchol D., Ortiz J. E., Orden A. A., et al. Alkaloids Analysis of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae), Anti-Cholinesterase Activity and Biomass Production by Propagation Strategies. *Molecules* 26, 2021, 192
- ⁵¹ Tang R., Jia L., Li Y., et al. Narciclasine attenuates sepsis-induced myocardial injury by modulating autophagy. *Aging (Albany NY)* 13, 2021; 15151-15163
- ⁵² Fürst R. Narciclasine-an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica* 82, 2016; 1389-1394
- ⁵³ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tazettine#section=Structures> (citováno 24. 11. 2022)
- ⁵⁴ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Narciclasine> (citováno 24. 11. 2022)
- ⁵⁵ Koutová D., Havelek R., Peterová E., et al. Pancracine, a Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloid, Inhibits Proliferation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells and Induces Apoptotic Cell Death in MOLT-4 Leukemic Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2021; 7014.
- ⁵⁶ Krstenansky J. L. Mesembrine alkaloids: Review of their occurrence, chemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 195, 2017; 10-19
- ⁵⁷ Makolo F., Viljoen A., Veale C. G. L. Mesembrine: The archetypal psycho-active *Sceletium* alkaloid. *Phytochemistry* 166, 2019; 112061
- ⁵⁸ Makolo F., Viljoen A., Veale C. G. L., Mesembrine: The archetypal psycho-active *Sceletium* alkaloid, *Phytochemistry* 166, 2019; 112061
- ⁵⁹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Panracine> (citováno 1. 12. 2022)
- ⁶⁰ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mesembrine#section=2D-Structure> (citováno 1. 12. 2022)
- ⁶¹ Zvěřinová M. a kol., *Alzheimerova demence*; Grada: Praha 7, 2017
- ⁶² Jiráček R. a kol., *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*; Grada: Praha, 2009
- ⁶³ Rusina R. a kol., *Neurodegenerativní onemocnění*; Mladá fronta: Praha, 2014

- ⁶⁴ Brunovský, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2007, 2, 107-111
- ⁶⁵ Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*. 2009, 5
- ⁶⁶ Chatonnet A., Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem Journal* 260, 1989; 625-34
- ⁶⁷ <https://www.buoyhealth.com/learn/alzheimers-disease#definition> (citováno 7. 12. 2022)
- ⁶⁸ Khan S., Barve K. H., Kumar M. S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology* 18, 2020; 1106-1125
- ⁶⁹ Martínková J. a kol., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*; Grada: Praha, 2007
- ⁷⁰ Vlček J. a kol., *Klinická farmacie*; Grada: Praha, 2014
- ⁷¹ Harvey R. A., Champe P. C. *Pharmacology*. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 978-0-7817-7155-9
- ⁷² Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25, 2020; 5789
- ⁷³ Kovács T. Az alzheimer-kór terápiája [Therapy of Alzheimer disease]. *Neuropsychopharmacol Hung.* 11, 2009; 27-33
- ⁷⁴ Stoilkovic M., Horvath T. L., Hajós M. Therapy for Alzheimer's disease: Missing targets and functional markers?, *Ageing Research Reviews* 68, 2021; 101318
- ⁷⁵ Wong K. H., Riaz M. K., Xie Yet al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2019; 381
- ⁷⁶ <https://go.drugbank.com/> (citováno 12. 12. 2022)
- ⁷⁷ Martin J., Krkošková Z., Dušek J. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství* 7, 2011; 39-41
- ⁷⁸ Drtinová L., Pohanka M. Možnosti využití Huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické listy* 107, 2013; 12-15

⁷⁹ Park S.-Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. Archives of Pharmacal Research 33, 2010; 1601-1602

⁸⁰ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (citováno 12. 12. 2022)

⁸¹ Orel M. a kol., *Somatopatologie: nauka o nemocech těla*; Grada: Praha, 2014

⁸² <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (citováno 15. 12. 2022)

⁸³ <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/#:~:text=Find%20information%20about%20world%20cancer,and%208.8%20million%20in%20women> (citováno 11. 2. 2023)

⁸⁴ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (citováno 11. 2. 2023)

⁸⁵ <https://ourworldindata.org/cancer> (citováno 15. 12. 2022)

⁸⁶ <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?> (citováno 22. 8. 2023)

⁸⁷ Klener P., Klener P. jr. Léky přírodního původu a jejich potenciální protinádorový účinek. Onkologie 7, 2013; 47-50

⁸⁸ <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0011421&tab=texts> (citováno 17. 12. 2022)

⁸⁹ <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0129597&tab=texts> (citováno 17. 12. 2022)

⁹⁰ <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0029631&tab=texts> (citováno 17. 12. 2022)

⁹¹ <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0241438&tab=texts> (citováno 17. 12. 2022)

⁹² <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0242233&tab=texts> (citováno 17. 12. 2022)

⁹³ Fan X., Zhao Z., Wang D., Xiao J. Glycogen synthase kinase-3 as a key regulator of cognitive function. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 52, 2020; 219-230

⁹⁴Zeman J., Vetchý D., Franc A., Pitschmann V.: Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. Chem. Listy 112, 2018; 434-439

⁹⁵ Rit R. K., Hongyi Li, Argent S. P., et al. A Scalable Synthesis of Chiral Himbert Diene Ligands for Asymmetric Catalysis, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 365, 10, 2023; 1629-1639

⁹⁶ S. Berkov, J. Bastida, B. Sidjimova, et al. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): a case study, *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 2008; 638–645