

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Cytotoxická aktivita vybraných kultivarů rodu *Narcissus in vitro*.

Cytotoxic activity of selected *Narcissus* cultivars *in vitro*.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

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

Hradec Králové, srpen 2023

Maršálková Aneta

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Tímto prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod odborným dohledem a vedením PharmDr. Kateřiny Hradiské Breiterové, PhD.

Všechny zdroje a literatura, ze kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla vytvořena za účelem získání jiného ani stejného titulu.

Hradec Králové, 2023

Maršálková Aneta

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za podpory grantu Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682) a Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové (SVV 260 662), za niž velmi děkuji.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce, PharmDr. Kateřině Hradiské Breiterové, PhD. za její čas, ochotu, vstřícnost, trpělivost, odborné vedení a poskytnuté materiály. Důležitá pro mě byla i její pomoc při vypracování experimentální části a konzultace výsledků, za to bych jí ráda vyjádřila velké poděkování. Poděkování patří také RNDr. Jaroslavu Jenčovi, PhD. za pomoc s měřením a interpretací výsledků plynové chromatografie.

Obsah

Obsah.....	4
Přehled obrázků a tabulek	6
Seznam zkratk	8
Seznam zkratk buněčných linií.....	9
1 Úvod.....	11
2 Cíl práce	12
3 Teoretická část	13
3.1 Nádorová onemocnění.....	13
3.2 Rod <i>Narcissus</i>	14
3.2.1 Taxonomie rodu <i>Narcissus</i>	14
3.3 Přehled kultivarů z rodu <i>Narcissus</i> použitých v experimentální části	15
3.3.1 <i>Narcissus</i> cv. CAIRNGORM	15
3.3.2 <i>Narcissus</i> cv. DICK WILDEN	15
3.3.3 <i>Narcissus</i> cv. ICE KING	16
3.3.4 <i>Narcissus</i> cv. MANLY	17
3.3.5 <i>Narcissus</i> cv. UNIQUE	17
3.3.6 <i>Narcissus</i> cv. TRENA	18
3.4 Amaryllidaceae alkaloidy.....	19
3.5 Přehled antineoplasticky aktivních AmA izolovaných z rodu <i>Narcissus</i>	21
3.5.1 Lykorin.....	21
3.5.2 Narciklasin	25
3.5.3 3-Epipankratistatin a pankratistatin	28
3.5.4 Pankracin.....	30
3.5.5 Haemanthamin	31
3.5.6 Haemanthidin	34
3.5.7 Tazettin.....	35
3.5.8 Pretazettin.....	36
3.5.9 Jonquailin	38
4 Experimentální část.....	40
4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení	40
4.1.1 Chemikálie	40
4.1.2 Materiál a přístrojové vybavení.....	40
4.1.3 Databáze a programy použité k vyhodnocování výsledků.....	41

4.1.4	Rostlinný materiál	41
4.1.5	Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2)	42
4.2	Metody použité pro analýzu studovaných extraktů	42
4.2.1	Plynová chromatografie – hmotnostní detekce (GC-MS).....	42
4.2.1.1	Chromatografické podmínky	43
4.2.2	Plynová chromatografie – plamenoionizační detekce (GC-FID).....	43
4.2.2.1	Chromatografické podmínky	43
4.3	Stanovení cytotoxické aktivity metodou MTT	44
4.3.1	Příprava testovaných extraktů na měření	44
4.3.2	Příprava čistých látek	44
4.3.3	Popis MTT metody.....	44
5	Výsledky	46
5.1	Identifikace složení sumárních extraktů	46
5.1.1	GC-MS	46
5.1.1.1	Narcissus cv. CAIRNGORM (AL-444)	47
5.1.1.2	Narcissus cv. DICK WILDEN (AL-452)	49
5.1.1.3	Narcissus cv. ICE KING (AL-453)	51
5.1.1.4	Narcissus cv. MANLY (AL-454).....	53
5.1.1.5	Narcissus cv. UNIQUE (AL-456)	55
5.1.1.6	Narcissus cv. TRENA (AL-462)	57
5.1.1.7	Tabulka 17: Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech metodou GC-MS.	59
5.1.1.8	Obrázek 23: Přehled struktur izolovaných alkaloidů.	61
5.1.2	GC-FID	62
5.1.2.1	Podíl jednotlivých alkaloidů v sumárním extraktu	62
5.1.2.2	Procentuální zastoupení daného alkaloidu v extrahovaných cibulích.....	63
5.2	Cytotoxická aktivita	64
6	Diskuze a závěr	66
7	Abstrakt.....	70
8	Abstract	71
9	Literatura.....	72

Přehled obrázků a tabulek

- Obrázek 1 *Narcissus* cv. Cairngorm.
- Obrázek 2 *Narcissus* cv. Dick Wilden.
- Obrázek 3 *Narcissus* cv. Ice King.
- Obrázek 4 *Narcissus* cv. Manly.
- Obrázek 5 *Narcissus* cv. Unique.
- Obrázek 6 *Narcissus* cv. Trena.
- Obrázek 7 Biosyntéza AmA.
- Obrázek 8 Lykorin.
- Obrázek 9 Indukce apoptózy lykorinem.
- Obrázek 10 Narciklasin.
- Obrázek 11 Schéma shrnující hypotézu o indukci apoptózy narciklasinem.
- Obrázek 12 3-Epipankratistatin a pankratistatin.
- Obrázek 13 Pankracin.
- Obrázek 14 Haemanthamin a haemanthidin.
- Obrázek 15 B: Porovnání haemanthaminu a narciklasinu ve vazbě do velké podjednotky ribozomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.
C: Porovnání vazby haemanthaminu v 25S a 28S rRNA.
- Obrázek 16 Tazettin, pretazettin, jonquailin.
- Obrázek 17 Chromatogram sumárního extraktu AL-444.
- Obrázek 18 Chromatogram sumárního extraktu AL-452.
- Obrázek 19 Chromatogram sumárního extraktu AL-453.
- Obrázek 20 Chromatogram sumárního extraktu AL-454.
- Obrázek 21 Chromatogram sumárního extraktu AL-456.
- Obrázek 22 Chromatogram sumárního extraktu AL-462.
- Obrázek 23 Přehled struktur izolovaných alkaloidů.
- Obrázek 24 Grafické znázornění výsledků screeningu cytotoxické aktivity.

Tabulka 1	Porovnání IC_{50} lykorinu na nádorových i zdravých buněčných liniích metodou 72hodinové MTT.
Tabulka 2	Hodnoty IC_{50} v μM narciklasinu, pankratistatinu, lykorinu, haemanthaminu na buněčných liniích kolorektálního karcinomu.
Tabulka 3	Hodnoty GI_{50} v μM 3-epipankratistatinu a pankratistatinu na lidských buněčných liniích.
Tabulka 4	Hodnoty IC_{50} v μM pankracinu a doxorubicinu metodou 48hodinové MTT.
Tabulka 5	Porovnání IC_{50} haemanthaminu některých MTT esejí.
Tabulka 6	Porovnání IC_{50} haemanthidinu některých MTT esejí.
Tabulka 7	Porovnání IC_{50} v μM pretazettinu a doxorubicinu na vybraných buněčných liniích metodou 72hodinové MTT.
Tabulka 8	Porovnání GI_{50} v μM jonquailinu a paklitaxelu na vybraných buněčných liniích metodou 48–72hodinové MTT.
Tabulka 9	Přehled studovaných taxonů.
Tabulka 10	Retenční časy jednotlivých AmA.
Tabulka 11	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-444.
Tabulka 12	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-452.
Tabulka 13	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-453.
Tabulka 14	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-454.
Tabulka 15	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-456.
Tabulka 16	Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-462.
Tabulka 17	Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech metodou GC-MS.
Tabulka 18	Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech metodou GC-FID.
Tabulka 19	Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v cibulích k extrakci.
Tabulka 20	Přehled cytotoxické aktivity sumárních alkaloidních extraktů na buněčné linii HepG2.
Tabulka 21	Viabilita HepG2 buněk po 24hodinovém ovlivnění konkrétním alkaloidem.

Seznam zkratek

ADS	American Daffodil Society
AmA	Amaryllidaceae alkaloidy
APAF1	Faktor aktivující apoptózu 1
ATP	Adenosintrifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED ₅₀	Střední efektivní dávka
FBS	Fetální bovinní sérum
GC-FID	Plynová chromatografie – plamenoionizační detekce
GC-MS	Plynová chromatografie – hmotnostní detekce
GI ₅₀	Střední inhibiční koncentrace růstu
IC ₅₀	Střední inhibiční koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MTT	Kolorimetrický test pro hodnocení metabolické aktivity buněk s roztokem 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu
PBS	Phosphate buffer saline
RT	Retenční čas
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TP53	Tumor supresorový gen pro protein p53

Seznam zkratek buněčných linií

4T1	myší buněčná nádorová linie prsu
5123tc	buněčná linie hepatocelulárního karcinomu potkana
A 2780	buněčná linie ovariálního karcinomu
A431	buněčná linie epidermálního karcinomu kůže
A549	buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic
B16F10	buněčná linie myšího melanomu
BXPC-3	buněčná linie adenokarcinomu slinivky
Ccd-25-Lu	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
CoN	nenádorová buněčná linie střeva
DLD-1	buněčná linie kolorektálního karcinomu se sníženou funkcí TP53
DU-145	buněčná linie karcinomu prostaty
H1993	buněčná linie karcinomu plic odvozena z metastázy v lymfatických uzlinách pacienta před chemoterapií
H2073	buněčná linie karcinomu plic odvozena z opětovného růstu metastázy v lymfatických uzlinách pacienta po chemoterapii
HCT-116-/-	buněčná linie kolorektálního karcinomu s nefunkční TP53
HCT-116+/+	buněčná linie kolorektálního karcinomu s funkční TP53
HeLa	buněčná linie karcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie karcinomu jater
HeyB1	buněčná linie ovariálního karcinomu
HL-60	buněčná linie chronické myeloidní leukemie
Hs683	buněčná linie anaplastického oligodendrogliomu
HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu se sníženou funkcí TP53
CHO-1-15	buněčná linie nerakovinných křeččích vaječníků
Jurkat	buněčná linie akutní T-buněčné leukemie
K562	buněčná linie chronické myeloidní leukemie

KM 20L2	buněčná linie karcinomu tlustého střeva
L5178	myší buněčná lymfoidní linie
L5178 MDR	multirezistentní forma buněčné linie lymfomu
L5178 MDR1	multirezistentní forma buněčné linie lymfomu s vloženým lidským genem MDR1
LMTK	buněčná linie myších fibroblastů
LNCaP	buněčná linie androgen-senzitivní lidské prostaty
LoVo	buněčná linie kolorektálního karcinomu s funkční TP53
MCF-7	buněčná linie karcinomu prsu
MES-SA	buněčná linie děložního sarkomu
MES-SA/Dx5	buněčná linie děložního sarkomu pěstovaná v rostoucí koncentraci doxorubicinu
MOLT-4	buněčná linie akutní lymfoblastické leukemie
MRC-5	buněčná linie nenádorových plicních fibroblastů
NT2	buněčné linie lidského teratokarcinomu
OE21	buněčná linie karcinom jícnu
PC-3	buněčná linie karcinomu prostaty
SA OS-2	buněčná linie osteosarkomu
SF 268	buněčná linie glioblastomu CNS
SHSY-5Y	buněčná linie lidského neuroblastomu
SKMEL-28	buněčná linie melanomu
T98G	buněčná linie glioblastomu
U373	buněčná linie glioblastomu
U87	buněčná linie glioblastomu
WI-38, WS-1	buněčné linie zdravých fibroblastů

1 Úvod

Lidé se od nepaměti snaží najít látky, které by dokázaly pomoci od zdravotních problémů. Od počátku rozvoje lidstva až po vyspělé civilizace byly léčivé účinky rostlin identifikovány, zaznamenávány a předávány dalším generacím. Nejstarší písemný doklad o použití léčivých rostlin je připisován Sumerům a je datován k roku 5000 před naším letopočtem. Týkal se více než 250 různých rostlin, přičemž mezi nimi byly zahrnuty i rostliny alkaloidní, například blín či mák¹.

Ve světle toho, že 49 % všech léčiv registrovaných mezi lety 1981–2019 je v určitém vztahu s látkami přírodního původu, je možno vidět, že potenciál těchto látek je i v současné době skutečně vysoký. V kategorii léčiv charakteru malé molekuly se tento fakt vztahuje dokonce k 67 % registrovaných léčivých přípravků v uvedeném období. Statisticky jsou nejčastěji registrovány látky povahy polosyntetických derivátů či syntetické sloučeniny strukturně odvozené od aktivních látek přírodního původu. Oproti tomu jen několik málo indikací je spojeno se zcela syntetickými léčivy bez jakékoli přírodní předlohy (například antihistaminika a hypnotika)².

Amaryllidaceae alkaloidy jsou potenciálními zdroji látek pro léčbu mnohých onemocnění. U demence Alzheimerova typu je již jedna látka, galanthamin, zavedena v klinické praxi. Další látky z této skupiny mají potenciál navázat například v léčbě parazitárních, virových, nádorových a plísňových onemocnění, a z tohoto důvodu jsou mnohé z nich vědci intenzivně zkoumány³.

Zhoubné nádory jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí⁴. Ačkoli pokrok v léčbě nádorových onemocnění je v posledních desetiletích značný, rezistence vůči klasickým chemoterapeutikům a/nebo novým cíleným léčivům zůstává velkým problémem. Rezistence, ať už vnitřní, existující již před léčbou, nebo ta získaná v průběhu léčby, je zodpovědná za většinu relapsů, které jsou jednou z hlavních příčin úmrtí na nádorová onemocnění. Heterogenita mezi pacienty a všestranná schopnost rakovinotvorných buněk obcházet dostupné zavedené terapeutické systémy činí řešení lékové rezistence ještě náročnějším a důležitějším, a proto je zásadní objevování nových léčiv, která budou navazovat na lepší pochopení mechanismů rezistence⁵.

2 Cíl práce

Cílem této práce byl screening cytotoxické aktivity sumárních alkaloidních extraktů vybraných kultivarů rodu *Narcissus* s ohledem na cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii HepG2, GC-MS a GC-FID kvalitativní a kvantitativní analýza daných extraktů a screening aktivity majoritně zastoupených Amaryllidaceae alkaloidů. V případě výrazné aktivity stanovení IC_{50} daných látek.

Dílčí cíle:

- Zpracování rešerše k problematice cytotoxické aktivity čeledi Amaryllidaceae - zejména s ohledem na rod *Narcissus*.
- Screening cytotoxické aktivity vybraných kultivarů rodu *Narcissus*.
- GC-MS analýza jednotlivých sumárních alkaloidních extraktů a vyhodnocení získaných alkaloidních spekter.
- GC-FID kvantitativní analýza alkaloidních extraktů, identifikace a kvantifikace majoritně zastoupených alkaloidů.
- Stanovení cytotoxické aktivity majoritních látek zastoupených ve studovaných extraktech. U aktivních látek stanovení IC_{50} .
- Vyhodnocení výsledků a sepsání práce.

3 Teoretická část

3.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou přítomna v lidské historii již od pradávna. Nejstarší záznamy o nich pocházejí z Egypta kolem roku 1600 před naším letopočtem. Víme, že tato onemocnění byla rozšířeným problémem po celém světě, například ve středověku v medicíně Číny, severní Afriky, Střední Ameriky a Arábie. Lidé v různých etnických kulturách používali při léčbě nádorů více než 3000 rostlinných taxonů, včetně česneku (*Allium sativum*), zázvoru (*Zingiber officinale*) a kurkumy (*Curcuma longa*). Otec medicíny, Hippokrates z Kosu (4. století před naším letopočtem), který například léčil nádorová onemocnění dělohy narcisovým olejem, použil slovo „*carcinosa*“ a tento název se ujal až do dnešní doby. Mezi nejznámější novodobé látky rostlinného původu v klinické praxi patří kamptotecin, podofylotoxin a vinblastin či jejich deriváty^{6,7}.

„Lze říci, že nádor je soubor (populace) abnormálních buněk, který roste a chová se poměrně samostatně bez závislosti na řídicích vlivech organismu, i když původní příčina jeho vzniku již nepůsobí“⁸.

Tvorba nádoru začíná u nepatrné části DNA, konkrétně u dvou tříd genů. Nádorově supresorové geny jsou pro organismus užitečné v potlačení růstu nádorů, dokud neprojdou mutací, která je inaktivuje. Druhou třídou genů jsou protoonkogeny, které podporují buněčný růst a mohou se stát onkogeny. Aby došlo ke vzniku nádoru, je nutná mutace více genů kontrolujících růst. Ve zdravých nenádorových buňkách jsou stimulační a inhibiční signály v rovnováze, a pokud už k nějakým neobvyklým změnám dojde, buňka má možnost zpětnovazebnými mechanismy defekt odhalit a spáchat buněčnou sebevraždu například apoptózou. Ale i zde, u genů účastnících se apoptózy, může vzniknout mutace a buňka nemusí být apoptózy schopna⁹.

S ohledem na rozložení nádorových onemocnění v populaci, mívají ženy nejčastěji nádory dělohy, prsu, tlustého střeva nebo ovaria. U mužů jsou nejčastější karcinomy plic, tlustého střeva, prostaty a žaludku. Navíc je dle některých údajů počet maligních nádorů u mužů 1,5x větší než u žen¹⁰. Hledisko dědičnosti je také na místě. Pokud zárodečná buňka od rodiče obsahuje mutaci, potomek má touto mutací vybaveny všechny buňky v těle a tedy velmi vysokou pravděpodobnost vzniku nádoru^{9,10}.

3.2 Rod *Narcissus*

Rod *Narcissus* patří stejně jako desítky jiných rodů do čeledi Amaryllidaceae. Na rozdíl od jiných rodů je rod *Narcissus* hojně rozšířen ve středomoří, ačkoli přirozené prostředí je pro jednotlivé druhy různé (od skal až po břehy řek). Členění v rámci tohoto rodu není vždy jednoznačné, jelikož velice snadno dochází k přirozené hybridizaci a zároveň je v nemalé míře kultivován a šlechtěn¹¹. Jakmile je nový kultivar pojmenován, je zařazen nezávisle na původu do jedné ze 13 divizí. Jedenáct divizí je rozděleno podle základních morfologických rysů, jako je množství květu na stonku, velikost pakorunky atd. Dvanáctá divize je shrnující pro kultivary, které nelze zařadit do předchozích skupin, a třináctá zahrnuje narcisy odlišující se pouze botanickým názvem¹².

Podzemní část je tvořena cibulí obvykle světlehnědé barvy a velikosti od 0,6 do 10 cm. Jelikož se jedná o víceleté rostliny, cibule přezimuje, na jaře kvete (některé druhy kvetou na podzim) a každým rokem formuje nové cibule dorůstáním. Po rychlém odkvětu přichází letní období latence. Stonek není olistěný a má podobu dutého stvolu. Ze spodní části stonku vybíhají 2-4 listy (některé druhy mají až 8 listů) se souběžnou žilnatinou. Listová čepel je po celé délce stejně široká a na konci zašpičatělá^{11,13-15}.

Květy rodu *Narcissus* jsou oboupohlavné, 12-125 mm velké a rostou samostatně i v květenství. Barevně jsou v odstínech bílé, žluté, oranžové. Zajímavý je druh *Narcissus viridiflorus*, který kvete v noci zeleně a je opylován mûrami. Okvětí se skládá z šesti okvětních lístků ve dvou přeslenech, které vyrůstají z různobarevné a různotvaré pakorunky. Okvětní lístky mohou ale nemusí mít barvu shodnou s barvou pakorunky¹³⁻¹⁵.

3.2.1 Taxonomie rodu *Narcissus*¹⁶

Říše:	rostliny (Plantae)
Podříše:	cévnaté rostliny (Tracheophyta)
Oddělení:	krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	jednoděložné (Liliopsida)
Řád:	chřestotvaré (Asparagales)
Čeleď:	amarylkovité (Amaryllidaceae)
Podčeleď:	amarylkové (Amaryllidoideae)

3.3 Přehled kultivarů z rodu *Narcissus* použitých v experimentální části

Experimentální část této diplomové práce se zabývá 11 kultivary a 1 varietou druhů rodu *Narcissus*. Morfologické znaky 5 kultivarů a 1 variety již byly popsány v diplomové práci vypracované mgr. Beátou Tkáčovou, která se mimo jiné zabývala přípravou jejich sumárních extraktů¹⁷. Zbýlých 6 kultivarů je popsáno níže.

3.3.1 *Narcissus* cv. CAIRNGORM

Narcissus cv. Cairngorm (obrázek 1) patří do divize velkokvětých narcisů¹⁸, které mají velikost pakorunky v rozmezí třetiny až celé délky okvěti¹². Registrován byl v roce 1974 a za hybridizátora je považována Helen K. (Nell) Richardson. Vznikl hybridizací mateřského kultivaru Camelot pylem kultivaru Daydream. Kultivar je vysoký více než 67,5 cm s šířkou květu 98 mm. Okvěti je žluté s bílou bází, pakorunka od báze přechází z bílé až na oranžovo-žlutý okraj¹⁸.



Obrázek 1: *Narcissus* cv. Cairngorm¹⁹.

3.3.2 *Narcissus* cv. DICK WILDEN

Kultivar Dick Wilden (obrázek 2) patří do divize plnokvětých narcisů²⁰, které se vyznačují jedním či více květy na stonku, zdvojením okvětních lístků nebo pakorunky nebo obojího¹². Hybridizátorem tohoto kultivaru je P.Th. Zwetsloot z Nizozemska. Registrován byl v roce 1962. Americká společnost zabývající se narcisy (American Daffodil Society, ADS) později zařadila tento kultivar do sekce „Classics“, do které se řadí všechny narcisy registrované v období 1940-1969. Popisovaný kultivar vychází z *Narcissus* cv. Carlton sport. Dorůstá do výšky více než 67,5 cm a šířka květů je 50 mm. Okvěti je široce vejčité, zářivě zelenožluté

s bílým zašpičatěním. Pakorunka se skládá z pevně stočených trychtýřovitých segmentů s vroubkovanými a zvlněnými okraji²⁰.



Obrázek 2: *Narcissus* cv. Dick Wilden²¹.

3.3.3 *Narcissus* cv. ICE KING

Dalším zástupcem divize plnokvětých narcisů je kultivar Ice King (obrázek 3) registrovaný v roce 1984. Hybridizátorem je A.P. van den Berg-Hytuna. Vyšlechtěn byl z *Narcissus* cv. Ice Follies sport. Kultivar je vyšší než 67,5 cm, má slonovinově bílé, široce vejčité okvěti se zakulaceným koncem končícím ostrou špičkou. Pakorunka je nepravidelného tvaru, segmenty jsou u báze žluté, nařasené, na okraji bílé, vroubkované²².



Obrázek 3: *Narcissus* cv. Ice King²³.

3.3.4 *Narcissus* cv. MANLY

Narcissus cv. Manly (obrázek 4) patří též do divize plnokvětých narcisů. Za hybridizátora je považován J. Lionel Richardson, registrace proběhla roku 1972. Kultivar obdržel na světových výstavách dvě ocenění. Výška kultivaru přesahuje 67,5 cm, šířka květů je více než 100 mm. Okvěti je zelenožluté, široce vejčité s výraznou ostrou malou špičkou na vrcholu. Vnitřní přesleny jsou postupně kratší a těsněji zavinuté. Výrazně kratší pakorunka je na bázi jasně oranžová²⁴.



Obrázek 4: *Narcissus* cv. Manly²⁵.

3.3.5 *Narcissus* cv. UNIQUE

Další kultivar (obrázek 5) patřící do divize plnokvětých narcisů byl registrován v roce 1961, tedy dle ADS patří do sekce „Classics“. Hybridizátorem je též J. Lionel Richardson. Mateřskou rostlinou pro hybridizaci byl kultivar Falaise. Od roku 1961 do roku 2002 získal tento kultivar 4 ocenění. Dorůstá výšky přes 67,5 cm, má 105 mm široký květ, s okrouhlými krémově bílými okvětními lístky, které jsou zakončeny nenápadnou špičkou. Vnitřní segmenty dorůstají poloviční délky okvěti a jsou jasně žluté a nařasené²⁶.



Obrázek 5: *Narcissus* cv. Unique²⁷.

3.3.6 *Narcissus* cv. TRENA

Narcissus cv. Trena (obrázek 6) patří do divize Cyclamineus²⁸, která se vyznačuje jedním květem na stonku, který je k němu v ostrém úhlu¹². Registrován byl v roce 1971 a hybridizátorem je pravděpodobně Mavis Verry z Nového Zélandu. Kultivar získal celkem 3 ocenění. Výška kultivaru není větší než 32,5 cm, květy jsou široké 82 mm a směřují obrácené dolů. Okvětní lístky jsou široce vejčité, zašpičatělé, ohrnuté směrem nahoru. Žlutá pakorunka je na bázi světlejší, má nálevkovitý tvar s rozšířeným ústím a mělce vroubkovaným okrajem²⁸.



Obrázek 6: *Narcissus* cv. Trena²⁹.

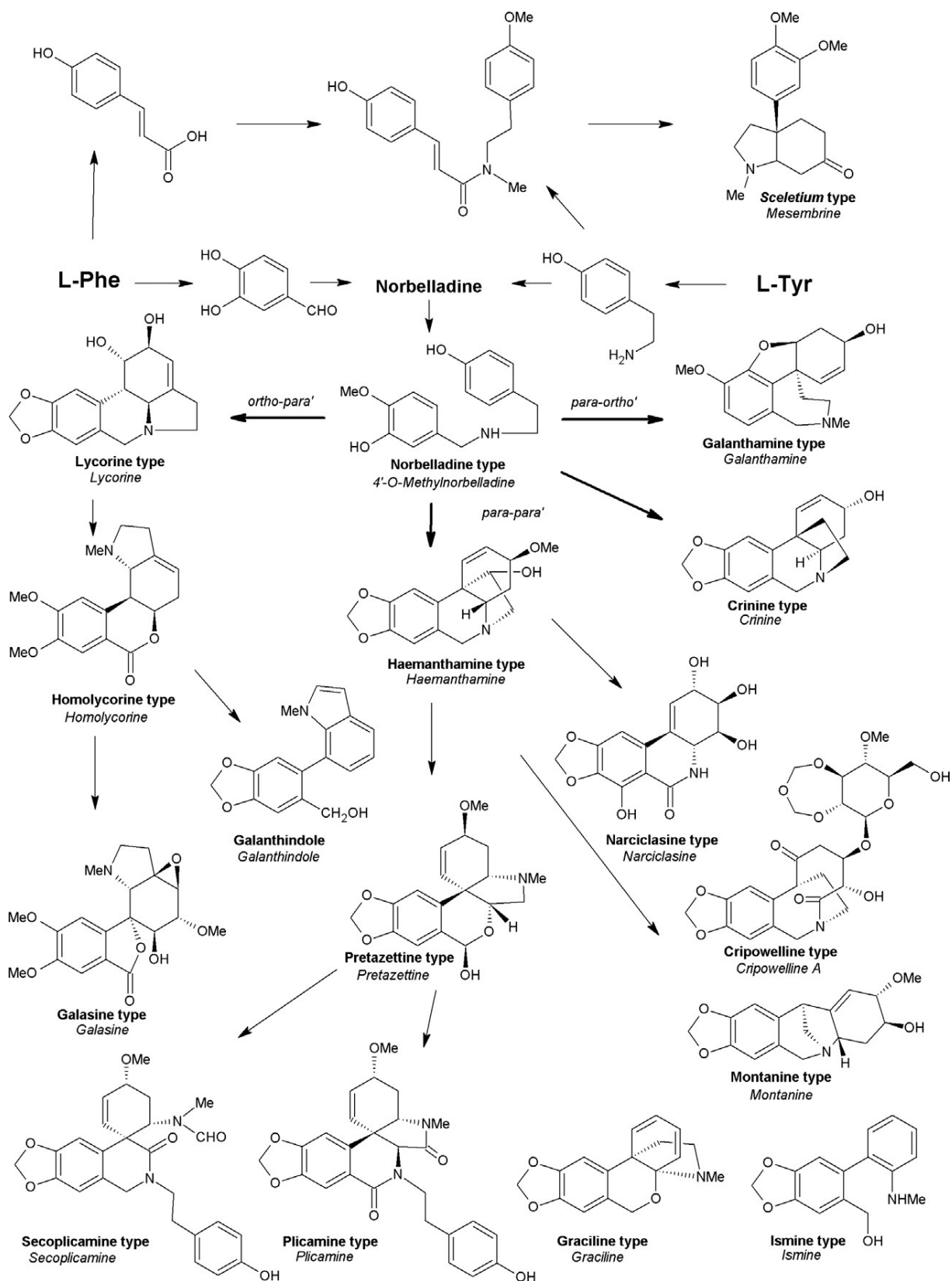
3.4 Amaryllidaceae alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin, které nejen, že rostlinu chrání proti biotickým faktorům, ale také slouží pro lákání organismů důležitých pro jejich rozmnožování³. Vedle biologických účinků, jako je cytotoxická, antivirová, antibakteriální, antifungální, cholinesterasově inhibiční, protinádorová, analgetická či antiprotozoální aktivita, mají Amaryllidaceae alkaloidy (AmA) potenciál pro využití v ekologicky šetrném působení na významné zemědělské škůdce. Na rozdíl od obsáhlé literatury o biologické aktivitě a farmakologii těchto alkaloidů je tato role výrazně méně prozkoumána^{3,30}.

S novou metodou molekulární fylogeneze byla čeleď Amaryllidaceae sestupně revidována na podčeď Amaryllidoideae, která spolu s dalšími dvěma podčeleděmi, Allioideae a Agapanthoideae, tvoří novou čeleď Amaryllidaceae. Amaryllidoideae se od nejbližší podčeledi Allioideae odštěpila před asi 30 miliony let³. Do dnešní doby bylo popsáno více než 600 strukturně různorodých AmA izolovaných z přibližně 350 druhů. Tyto alkaloidy jsou v hledáčku vědců díky šíři svých biologických a farmakologických účinků^{3,16}.

AmA jsou klasifikovány do devíti hlavních strukturních typů, mezi které řadíme norbelladinový, lykorinový, homolykorinový, haemanthaminový, krininový, narciklasinový, pretazettinový, monthaninový a galanthaminový typ. Alkaloidy, jež nenáleží ani k jednomu z těchto strukturních typů, jsou zahrnuty do smíšené skupiny, kam je zařazeno 26 strukturních typů představujících jen několik málo jednotek sloučenin, které jsou získávány z velmi malého počtu druhů³.

Biosyntéza AmA (obrázek 7) začíná u aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, které prochází oxidačně-redukčními, dekarboxylačními a dalšími enzymatickými reakcemi za vzniku klíčového meziprojektu 4'-O-methylnorbelladinu. Tento klíčový meziprojekt poté prochází intramolekulární oxidační cyklizací fenol-fenol, která může probíhat třemi způsoby *ortho-para'*, *para-ortho'* a *para-para'*. Lykorinový a z něj vycházející homolykorinový typ alkaloidů vznikají *ortho-para'* intramolekulární cyklizací, C-C spojením *para-para'* vznikají alkaloidy krininového a haemanthaminového typu, který vede k pretazettinovému, narciklasinovému a monthaninovému strukturnímu typu, *para-ortho'* kombinace vede k alkaloidům galanthaminového typu. Enzymatická cesta z 4'-O-methylnorbelladinu zatím není pro všechny strukturní typy zcela známá^{3,30}.



Obrázek 7: Biosyntéza AmA (převzato z druhé kapitoly knihy *The Alkaloids: Chemistry and Biology*³).

3.5 Přehled antineoplasticky aktivních AmA izolovaných z rodu *Narcissus*

Zástupci rodu *Narcissus* byli odedávna používáni v lidovém léčitelství pro své cytotoxické účinky, například u děložních nádorů. Již staří Řekové o těchto účincích věděli, ale až v roce 1877, po úspěšné izolaci alkaloidu lykorinu z druhu *Narcissus pseudonarcissus*, se začala více zkoumat různorodá biologická aktivita jednotlivých AmA³¹.

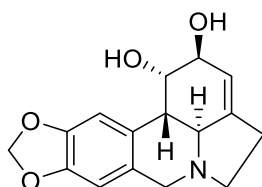
Norbelladinový a krininový typ AmA nemá dle druhé kapitoly knihy *The Alkaloids: Chemistry and Biology* vydané v roce 2020 v rodu *Narcissus* zastoupení³. Podle studie kultivaru *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton z téhož roku je norbelladinový typ zastoupen karltoninem A–C, ovšem alkaloidy byly z důvodu izolace malého množství studovány pouze z hlediska inhibice cholinesteras. Krininový typ, konkrétně krinin, byl identifikován a izolován z kultivaru *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master v roce 2019³². Homolykorin byl identifikován v kultivaru *Narcissus* L. cv. Professor Einstein v roce 2020, ovšem jeho cytotoxicita nebyla výrazná⁶. Cytotoxický potenciál krininu také není příliš významný, což může být dáno β -orientací jeho ethanového můstku mezi N5 a C10b^{33,34}. Galanthamin, hlavní zástupce galanthaminového strukturního typu, je známý pro svou terapeutickou účinnost na demenci Alzheimerova typu. Toto působení je v souladu s faktem, že není cytotoxický a lze ho tedy použít jako bezpečné léčivo u řady pacientů v počáteční fázi onemocnění^{3,35}. Ostatní strukturní typy, které zahrnují alkaloidy s potenciální protinádorovou aktivitou, jsou uvedeny dále.

3.5.1 Lykorin

Lykorin byl izolován jako první alkaloid z čeledi Amaryllidaceae v roce 1877 z druhu *Narcissus pseudonarcissus*. Jeho struktura je odvozena od pyrrolofenanthridinového skeletu. Mezi farmakologické vlastnosti lykorinu patří antivirová, antibakteriální, antiparazitická, protizánětlivá, anticholinesterasová, analgetická, choleretická a antipyretická aktivita^{36,37}.

Z hlediska struktury jsou pro protinádorovou aktivitu důležité 2 hydroxylové skupiny na C1 a C2. Tyto hydroxyly nejsou sice součástí farmakoforu, ale pomáhají molekule penetrovat do buňky, proto při substituci těchto skupin stericky objemnějšími substituenty nebylo sledováno snížení aktivity, což je pravděpodobně způsobeno nukleofilní substitucí v organismu vodou. Na druhou stranu bylo pozorováno, že jakýkoli dihydroderivát na C-kruhu zcela ztrácí protinádorovou aktivitu. Co je dále pro tuto aktivitu esenciální, je dusík v pozici N6 v B-kruhu. Jakmile tento dusík není bazický, dochází ke ztrátě části či celého spektra antineoplastické aktivity. Stereochemie a konformační volnost C-kruhu, neporušený B a C-kruh

spolu s β -konformací D-kruhu jsou u lykorinu důležité nejen pro cytotoxické účinky. Naproti tomu přemístění dvojných vazeb v C-kruhu je podobně účinné jako samotný lykorin, podobně jako otevření A-kruhu. Studie s napojením mastných kyselin sice nepřinesly zvýšení účinnosti, přinesly však chemickou stabilitu v rozmezí pH 5-7,4. Formulace nanoemulze manosylovaného lykorinu a kyseliny olejové vykazovala zlepšenou lipofilitu a buněčnou absorpci lykorinu s výhodnou antiproliferativní aktivitou³⁶.



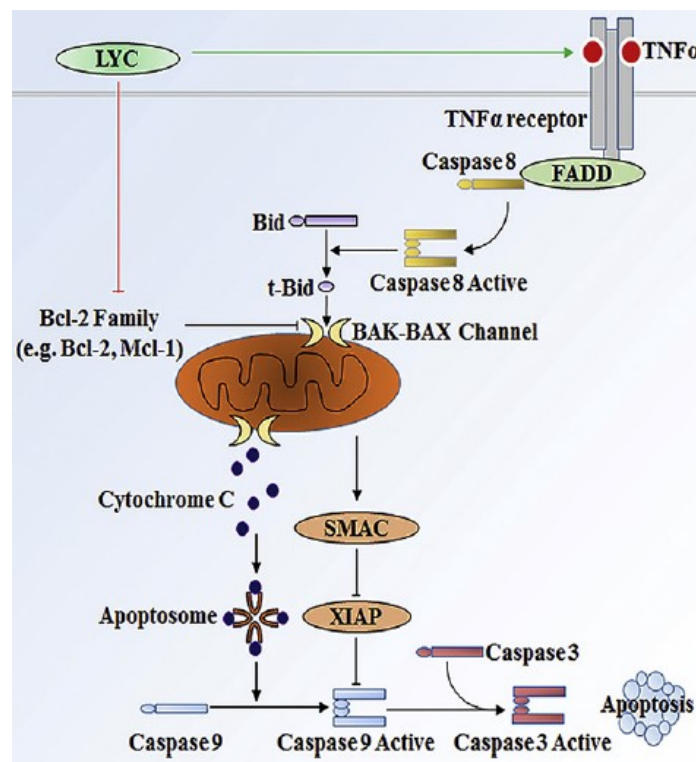
Obrázek 8: Lykorin³.

Protinádorová aktivita lykorinu byla objevena již v roce 1976. Postupně se začalo ukazovat, že lykorin je velmi slibnou antineoplastickou sloučeninou proti různým typům nádorových buněk díky několika velice důležitým vlastnostem. Specifická selektivita proti nádorovým buňkám je jednou z nich. Koncentrace, ve které lykorin významně snižuje nádorové bujení, je jen slabě toxická pro zdravé B-lymfocyty, fibroblasty, buňky prostaty, prsu, mléčných žláz, urotelu, a dokonce i pro darované zdravé plazmatické buňky. Dalšími vlastnostmi jsou nízké hodnoty IC₅₀ (střední inhibiční koncentrace) pohybující se v řádu jednotek mikromolů, dobrá snášenlivost a vysoká účinnost spolu s malými projevy toxicity v účinných dávkách³⁶. Jeden případ za všechny je studie z roku 2017, kde byla sledována myší nádorová linie prsu (4T1), která ukázala, že lykorin je účinnější než paklitaxel. Navíc léčba paklitaxelem vedla k významné ztrátě tělesné hmotnosti oproti použití lykorinu, který vykazoval zanedbatelné změny³⁸. Potenciál má lykorin i v léčbě rezistentních typů nádorů (například rezistentních na doxorubicin) včetně těch odolných vůči apoptóze, dokonce má schopnost resenzibilizovat myelomové buňky rezistentní na bortezomib (inhibitor proteozomu) a inhibovat buněčný proces, kterým bortezomib získanou rezistenci vyvolává³⁶.

Existuje několik mechanismů, díky kterým má lykorin takové vlastnosti, které ať v kombinaci nebo z něj samotného dělají předmět zájmu v boji s nádorovými onemocněními. Zajímavý je fakt, že lykorin může inhibovat metastázy a invaze solidního nádoru do dalších částí organismu, což bylo dokázáno například v *in vivo* studii na myší buněčné linii melanomu B16F10^{36,39}.

Lykorin působí jako silný induktor apoptózy, má potenciál vést indukci jak vnější (přes receptory), tak vnitřní cestou (mitochondriálně). Mechanismy, jakými působí na jednotlivé

nádory citlivé k apoptóze, jsou různé. Základem vnitřní cesty je indukce proapoptických Bid proteinů, které regulují narušení mitochondriální membrán, a zablokování proteinů Bcl-2 rodiny, které působí proti apoptóze. Narušením dojde k uvolnění cytochromu C, který přes faktor aktivující apoptózu 1 (APAF1) aktivuje kaspasu 9, a SMAC proteinu, druhého aktivátoru kaspas odvozeného z mitochondrií, který blokuje kaspasové inhibitory. Pro apoptózu indukovanou vnější cestou je typická rodina tumor nekrotizujících faktorů (TNF), která po navázání na receptory smrti vede k aktivaci kaspasy 8 (obrázek 9)^{36,39}. Indukce apoptózy, která se uplatňuje například u buněk jaterního karcinomu (HepG2)⁴⁰, není jediným mechanismem účinku, lykorin působí i na panel gliomových a melanomových buněk, na buněčnou linii karcinomu plic a jícnu, které nejsou k apoptóze senzitivní. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1^{36,39}.



Obrázek 9: Indukce apoptózy lykorinem.

Lykorin cílí na přežití podporující proteiny Bcl-2 rodiny a inhibuje je. Zároveň může působit vnější cestou zvýšením proapoptických ligandů³⁶.

Tabulka 1: Porovnání IC₅₀ lykorinu na nádorových i zdravých buněčných liniích metodou 72hodinové MTT (specifický kolorimetrický test pro hodnocení metabolické aktivity buněk)³⁹.

Buněčný typ	IC ₅₀ lykorinu [μM]
Nemalobuněčný karcinom plic (A549)	4.3 ± 0.3
Karcinom jícnu (OE21)	5.1 ± 0.4
Anaplastický oligodendrogliom (Hs683)	6.7 ± 0.3
Glioblastom (U373)	7.6 ± 0.2
Melanom (SKMEL-28)	8.5 ± 0.3
Myší melanom (B16F10)	6.3 ± 0.4
Zdravé fibroblasty (WI-38, WS-1)	>100

Dalším mechanismem působení lykorinu je blok buněčného cyklu. Dle typu nádoru zastaví buňku v G0/G1 (například linie mnohočetného myelomu), či G2/M fázi (například buněčná linie ovariálního karcinomu HeyB1). Bez ohledu na typ nádoru lykorin zvyšuje expresi proteinu p21, proto se předpokládá, že p21 zprostředkovává lykorinem indukované zamknutí buněčného cyklu, buď ve fázi G1 nebo G2. Také se předpokládá, že up-regulace p21 je nezávislá na nádorovém supresoru p53 (běžně reguluje expresi a aktivitu p21) a že p21 je možným přímým cílem lykorinu pro inhibici buněčného cyklu^{36,41}. Ačkoli existují pro tuto teorii vhodnější AmA, v roce 2022 byla potvrzena na liniích kolorektálního karcinomu. (tabulka 2)⁴².

Nekróza buněk bývala považována za náhodnou. Dnes je známo, že proces, který nastává po poškození DNA, je regulovaný stejně jako běžné fyziologické procesy v buňce. Oproti apoptóze zde nejsou přítomny kaspasy, ale jsou zde přítomny tzv. ribozom inaktivující proteiny RIP1 a RIP3 jako induktory nekrózy a inhibitory je zde nekrostatin-1. Lykorin způsobuje nekrózu mitochondriální dysfunkcí, tvorbou reaktivních forem kyslíku, deplecí ATP, poškozením DNA a zvýšením vylučování RIP1 a RIP3³⁶.

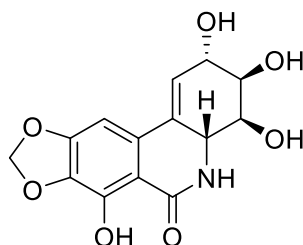
Mezi další mechanismy účinku lykorinu patří inhibice autofagie (proces odstraňování defektních organel v buňce), jejíž mechanismus není ještě experimentálně zcela objasněn. Pravděpodobně je propojen se zvýšenou tvorbou volných kyslíkových radikálů, které mohou vyvolat poškození DNA a následně buňky s poničenou DNA mohou zastavit svůj buněčný cyklus v určitém kontrolním bodě. Buňky s pozastaveným buněčným cyklem pak páchají smrt naprogramovaným způsobem apoptózou, nebo nekrózou, jelikož nemohou projít mitózou³⁶.

Plazmatický poločas lykorinu je v dávce 10 mg/kg 3-5 hodin. Maximální plazmatická koncentrace a plocha pod křivkou rostou s dávkou, ačkoli ne přímo úměrně. Lykorin je distribuován do všech tkání organismu jako jsou játra, ledviny, plíce, ale také jako je žaludek, slezina, srdce a mozek. Velké množství lykorinu je eliminováno ledvinami a může být metabolizováno v játrech, jelikož bez ohledu na cestu podání byla po 15 minutách pozorována vyšší koncentrace lykorinu v ledvinách a nižší v játrech³⁶.

3.5.2 Narciklasin

Narciklasin byl poprvé objeven v roce 1967 z druhů rodu *Narcissus*, po kterých nese název⁴³. Poději byl nalezen například i v rodech *Haemanthus*, *Galanthus*, *Hymenocallis*, nebo *Leucojum* čeledi Amaryllidaceae. V roce 1968 byl izolován lykoricindinol z cibulí *Lycoris radiata*. Později se ukázalo, že se jedná o stejnou strukturu, jejíž součástí jsou struktury fenanthridinu, isochinolinu a isokarbostyrilu^{31,44}. Neobvyklá je přítomnost narciklasinu a pankratistatinu v kobylce druhu *Brachystola magna*, jelikož se jinak u hmyzu isokarbostyrilové a fenanthridinové alkaloidy nevyskytují³¹. Nejdůležitější biologické aktivity narciklasinu jsou protizánětlivá a antineoplastická, která cílí hned několika mechanismy. Zajímavé je potenciální působení na cirkadiánní rytmus. Konkrétně je díky této aktivitě cirkadiánní období reverzibilně prodlouženo⁴⁴.

Zavedení hydrofobního substituentu, či ztráta jednoho ze tří hydroxylů vede k snížení protinádorové aktivity. Redukce dvojné vazby mezi C1 a C10b vede u *cis*-dihydronarciklasinu ke snížení aktivity, zatímco u *trans*-dihydronarciklasinu je aktivita nezměněná. *S*-konfigurace na C2 je také důležitá pro působení alkaloidu. Glykosylace narciklasinu na C7 zvyšuje jeho biodostupnost, ale nemění *in vivo* aktivitu. Z důvodu špatné rozpustnosti se jeví jako vhodnější sloučeninou narcistatin, který má na C3 a C4 navázaný anion kyseliny fosforečné a je v organismu nespecifickými esterasami hydrolyzován na narciklasin⁴⁴.



Obrázek 10: Narciklasin⁴⁵.

V roce 2007 bylo prokázáno, že účinná koncentrace na rakovinné buňky (30 nM) je o 2 řády nižší než na fibroblasty (7,5 μM). Konkrétně 18 hodin po ovlivnění jedním mikromolem

narciklasinu nebyly na buněčné linii zdravých plicních fibroblastů (Ccd-25-Lu) pozorovány žádné morfologické změny, zatímco na buněčné linii karcinomu prsu (MCF-7) byly morfologické změny korespondující se znaky buněčné smrti. Vysvětlením může být fakt, že zdravé lidské plicní fibroblasty nepodléhají apoptóze přes receptory spojené s TNF^{44,46}.

U pacientů s kolorektálním karcinomem jsou běžné mutace genu TP53 pro protein p53 (dále jako TP53), nádorový supresor, proto léčba cisplatinou, jejíž terapeutická účinnost je závislá na funkčním p53, nemusí vždy vést k potlačení růstu nádoru. AmA mají oproti cisplatině, běžně užívanému chemoterapeutiku, mnohem větší potenciál v léčbě kolorektálního karcinomu díky nezávislosti na funkci p53, což bylo porovnáváno na buněčných liniích kolorektálního karcinomu s různou funkčností genu TP53. Vedle nádorových linií bylo působení cisplatiny a AmA porovnáváno i na zdravých střevních buňkách. Cisplatina projevila vůči nádorovým buňkám toxicitu při pětinasobku průměrné IC₅₀, zatímco u narciklasinu byla toxická až dvaatřicetinasobná dávka. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2⁴².

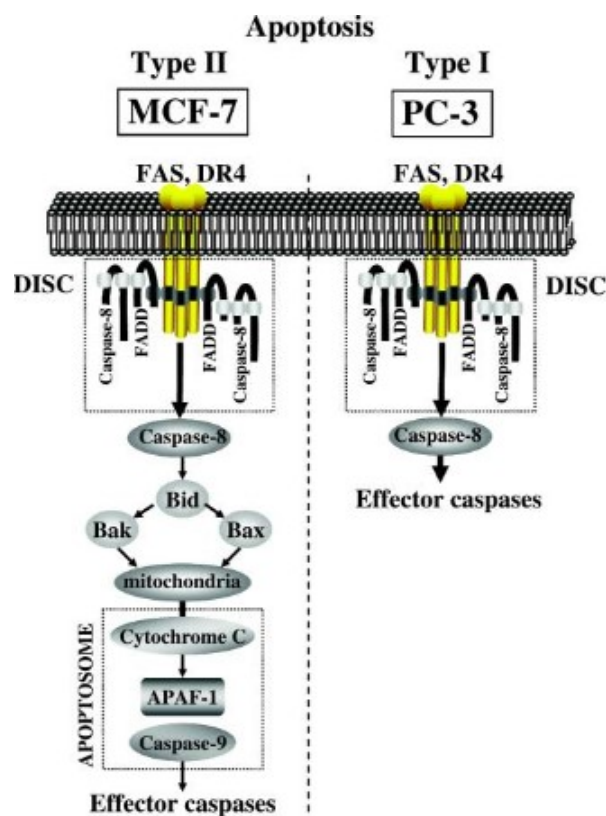
Tabulka 2: Hodnoty IC₅₀ v μM narciklasinu (NAR), pankratistatinu (PANC), lykorinu (LYC), haemanthaminu (HAE) na buněčných liniích kolorektálního karcinomu (LoVo, HCT-116+/+, HCT-116-/-, HT-29, DLD-1) s rozdílnou funkčností p53 v porovnání s účinností cisplatiny a jejich toxicita na nenádorové linii CoN buněk střeva. V posledním řádku je uveden poměr toxicit na zdravých a průměru nádorových linií střevních buněk⁴².

Buněčný typ	Funkčnost TP53	NAR	PANC	LYC	HAE	Cisplatina
LoVo	funkční	0,052	0,59	5,5	4,6	8,4
HCT-116+/+	funkční	0,023	0,17	1,3	1,9	4,5
HCT-116-/-	nefunkční	0,029	0,16	2,6	2,2	17,5
HT-29	snížená mutací	0,032	0,30	3,9	2,5	22,1
DLD-1	snížená mutací	0,030	0,28	2,9	2,4	14,8
CoN	-	1,1	2,4	79	85	67
poměr	-	32	8	24	31	5

Narciklasin působí antiproliferativně zejména blokováním proteosyntézy. Ve stejné studii, kde byl narciklasin objeven, byla popsána i jeho silná antimitotická aktivita na pšeničných zrnech a na *in vivo* testech myšního sarkomu⁴³. V průběhu dalších dekád byly účinky inhibice proteosyntézy potvrzeny a rozšířeny. V roce 2014 bylo potvrzeno, že narciklasin inhibuje

elongaci peptidové vazby vazbou na A-místo velké podjednotky ribozomu 60S, které je katalytickým centrem peptidyltransferasy^{44,46,47}.

Druhým mechanismem účinku narciklasinu je indukce apoptózy vnitřní i vnější cestou v závislosti na typu buněk. U linie MCF-7 je účinnost narciklasinu závislá na zpracování Bid proteinu, který způsobuje amplifikaci signálu poklesem membránového potenciálu mitochondrie. Dojde k vyplavení cytochromu C a vytvoření apoptozomu. U buněčné linie karcinomu prostaty (PC-3) se také objevuje pokles membránového potenciálu, není však tak výrazný jako u linie MCF-7, pro indukci apoptózy v tomto případě stačí vnější prostředí. Přes receptory smrti DR3, DR4 a FAS, které patří mezi TNF, je neaktivní prokaspasa 8 přeměňována na aktivní v takovém množství, že následný řetězec reakcí stačí k přímé aktivaci efektorové kaspasy 3, která je v buňce přítomna. Schéma je znázorněno na obrázku 11^{44,46}.



Obrázek 11: Schéma shrnující hypotézu o indukci apoptózy narciklasinem.

Po aktivaci receptorů smrti, dojde v komplexu indukujícím smrt (DISC) k aktivaci kaspasy 8 a rozběhnou se signální dráhy závislé na typu buněk. V buněčné linii karcinomu prostaty PC-3 (typ I) probíhá apoptóza přímou aktivací efektorových kaspas kaspasou 8. Naproti tomu v buněčné linii MCF-7 karcinomu prsu (typ II) dojde spuštěním mitochondriální dráhy k zesílení apoptotických signálů, protože tyto buňky postrádají kaspasu 3⁴⁶.

V 0,1 μ M koncentraci narciklasin *in vitro* narušuje mitózu glioblastomových buněk i bez indukce apoptózy. *In vivo* testy na myších vystavených lidskému glioblastomu ukázaly, že narciklasin dokázal významně zvýšit dobu přežití preklinických modelů lidského multiformního glioblastomu. Mechanismus je způsoben aktivací GTPasy RhoA a vytvoření F-aktinových stresových vláken v buňkách multiformního glioblastomu. Předpokládá se, že zvýšená produkce stresových vláken je základem inhibice proliferace stejně tak, jako je příčinou snížené migrační kapacity glioblastomových buněk⁴⁸.

Narciklasin byl také studován na imunodeficientních myších s implantovanými lidskými buňkami metastazujícího melanomu VM-48 rezistentního k apoptóze. Narciklasin se u myší jevil jako terapeuticky přínosný. Vykázal dokonce mírně lepší terapeutickou aktivitu než temozolomid, zavedená chemoterapeutická látka. Alkaloid totiž cílí na eukaryotický translační elongační faktor eEF1A, který dodává aminoacyl-tRNA do prázdného A-místa ribozomů, ale také se váže na aktin a přispívá k organizaci aktinového cytoskeletu. Podílí se tedy na regulaci migrace, morfologie a proliferace⁴⁴. Ačkoli studie z roku 2009 u narciklasinu neodhalila významnou inhibici invaze HeLa buněk karcinomu děložního čípku do kolagenu typu I (modelový případ buněčné invaze a vzniku metastáz), odhalila ji u jeho syntetického derivátu narciklasin tetraacetátu (ovšem v koncentraci 0,1 μ M, která je blízká koncentraci toxické)⁴⁹. Navíc proces invaze není závislý pouze na migrační složce, ale i na interakci nádorové buňky s extracelulární matrix⁴⁴.

Biodostupnost narciklasinu byla po perorálním podání vypočítána na 32 %, eliminační poločas byl po intravenózní aplikaci stanoven na 66 minut. Narciklasin je pravděpodobně schopen procházet hematoencefalickou bariérou, jelikož byla potvrzena účinnost na mozkové nádory u myší, není vyloučeno, že za tuto účinnost nejsou zodpovědné zatím neznámé metabolity narciklasinu. Narciklasin inhibuje izoenzym CYP3A4 lidského cytochromu P450, což zvyšuje interakční potenciál s dalšími sloučeninami. Hranice pro projev nežádoucích účinků byla u potkanů stanovena na 1 mg/kg/den, nad touto hranicí byly patrné nežádoucí účinky typu průjmů, letargie, žaludečních problémů, navíc byly zjištěny změny erytrocytů a leukocytů. Dávka 25 mg/kg/den byla téměř u všech jedinců letální⁴⁴.

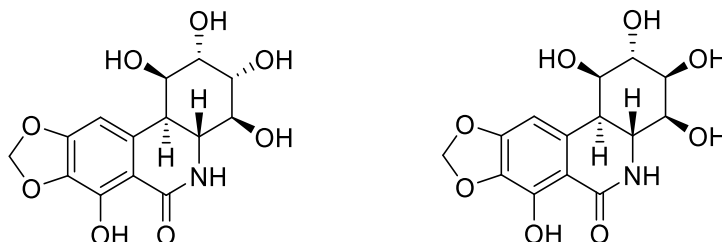
3.5.3 3-Epipankratistatin a pankratistatin

3-Epipankratistatin je látka narciklasinového strukturního typu získaná z kultivaru *Narcissus* cv. Ice Follies, která se od narciklasinu liší hydroxy skupinou na C1. Od struktury pankratistatinu se liší orientací hydroxyly na C3, 3- α -orientovaný je 3-epipankratistatin, 3- β -orientovaný je

pankratistatin. 3-Epipankratistatin vykazoval významnou inhibiční aktivitu vůči lidským nádorovým buněčným liniím, jeho koncentrace (od 0,74 do 2,3 $\mu\text{g/ml}$, což je s jeho molekulární hmotností 325.27 g/mol ⁴⁵ od 2,275 do 7,07 μM) však byla o 1-2 řády vyšší než u jeho diastereomeru pankratistatinu (od 0,014 do 0,032 $\mu\text{g/ml}$, což je od 0,04304 do 0,09838 μM). Touto studií byl odhalen velmi důležitý konfigurační požadavek na silnější antineoplastickou aktivitu. Porovnání GI_{50} (střední inhibiční koncentrace růstu) je v tabulce 3⁴⁵.

Tabulka 3: Hodnoty GI_{50} v μM 3-epipankratistatinu a pankratistatinu na lidských buněčných liniích⁴⁵.

Buněčný typ	GI_{50} 3-epipankratistatinu	GI_{50} pankratistatinu
Adenokarcinom slinivky (BXPC-3)	5,23	0,06149
MCF-7	6,76	0,07071
Glioblastom CNS (SF 268)	2,28	0,04304
Karcinom tlustého střeva (KM 20L2)	7,07	0,07686
Karcinom prostaty (DU-I45)	4,00	0,04616



Obrázek 12: 3-Epipankratistatin a pankratistatin⁴⁵.

Pankratistatin má vedle silné RNA antivirové aktivity i antineoplastickou a cytostatickou aktivitu na celé řadě buněčných linií⁵⁰. Mezi prvními byla objevena jeho schopnost indukovat apoptózu u buněčné linie Jurkat akutní T-buněčné leukemie (dále jako Jurkat) v koncentraci 1 μM , která zároveň nebyla toxická pro lymfocyty⁵¹. Podobné závěry byly učiněny při studii na buněčné linii lidského teratokarcinomu (NT2) a karcinomu kůže ve srovnání s nulovými vedlejšími efekty na zdravé lidské fibroblasty. Pankratistatin v koncentraci 0,5 μM působil synergicky s antiestrogenní onkologickou léčbou tamoxifenem proti buněčné linii MCF-7 karcinomu prsu. Apoptóza se projevovala hlavně kondenzací DNA, smršťováním buňky a tvorbou bublin v buňkách. Další projevy toxicity byly pozorovány na buněčných liniích SHSY-5Y lidského neuroblastomu, LNCaP androgen-senzitivní lidské prostaty, 5123tc

hepatocelulárního karcinomu potkana⁵⁰. Dá se odhadovat, že mechanismus účinku selektivně cílí na rakovinné buňky, konkrétně jejich mitochondrie. Ovšem pankratistatin není v druzích rodu *Narcissus* přirozeně přítomen, ačkoli se poměrně snadno z těchto druhů získává, a to semisynteticky z narciklasinu⁴⁵.

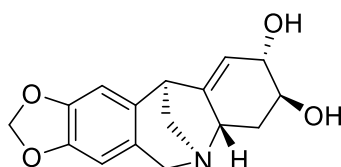
3.5.4 Pankracin

Pankracin je monthaninový typ AmA, který je odvozen od pentacyklického kruhu 5,11-metanomorfantridinu. V jeho struktuře jsou jedinečné dvě hydroxylové skupiny na chirálních C2 a C3 na E-kruhu a dvojná vazba mezi C1 a C11a⁵². Phytochemická studie extraktu z cibulí druhu *Narcissus* cv. Professor Einstein prokázala přítomnost pankracinu i u rodu *Narcissus*. V této studii byla zároveň testována jeho cytotoxicita na panelu buněčných linií. Protinádorovou aktivitu dokládají hodnoty v tabulce 4, ovšem problémová může být selektivita u linie Jurkat oproti zdravým plicním fibroblastům⁶. Vedle antiproliferativní aktivity vykazuje pankracin také antimalarickou, antibakteriální, antifungální a antiparazitickou aktivitu^{52,53}.

Tabulka 4: Hodnoty IC₅₀ v μM pankracinu a doxorubicinu metodou 48hodinové MTT.

Buněčný typ	IC ₅₀ pankracinu	IC ₅₀ doxorubicinu
Jurkat	5.07 ± 0.31	0.05 ± 0.02
Akutní lymfoblastická leukemie (MOLT-4)	2.71 ± 0.25	<0.01
A549	2.29 ± 0.43	0.43 ± 0.06
HT-29	2.60 ± 0.51	0.77 ± 0.24
Ovariální karcinom (A 2780)	5.08 ± 0.43	<0.01
HeLa	5.03 ± 0.36	0.55 ± 0.05
MCF-7	2.68 ± 0.37	0.44 ± 0.10
Osteosarkom (SA OS-2)	2.20 ± 0.25	0.1 ± 0.17
Zdravé plicní fibroblasty (MRC-5)	5.15 ± 0.34	0.72 ± 0.23

Byla také potvrzena důležitost substituce na chirálních C2 a C3 na E-kruhu, kdy náhradou obou hydroxylů za chlor a methoxy skupinu došlo ke snížení antiproliferativní aktivity⁵³.



Obrázek 13: Pankracin⁶.

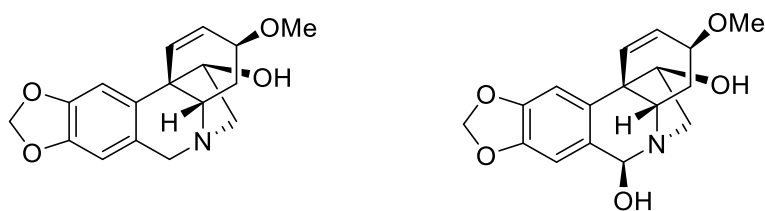
Proliferace a zároveň viabilita byla pozorována u rezistentní buněčné linie A549 a u senzitivnější linie MOLT-4. Rezistence a senzibilita těchto linií byla prokázána po ovlivnění 0,25 μ M doxorubicinem jako pozitivní kontrolou. Zatímco statisticky významný antiproliferativní efekt na buňky A549 se projevil již při nejnižší testované koncentraci pankracinu (2,5 μ M), efekt na viabilitu byl až v nejvyšších testovaných koncentracích (10 a 20 μ M). U MOL-4 buněk došlo ke statisticky významnému snížení viability při koncentraci pankracinu 5 μ M 48 hodin po ovlivnění a při koncentraci 10 μ M se tento efekt projevil již po 24 hodinách⁵².

Při koncentraci pankracinu 10 a 20 μ M byla u linie MOLT-4 indukována apoptóza, což bylo pozorováno statisticky významným zvýšením aktivity kaspas 3, 7, 8, 9. Kdy vnější cestou indukovaná apoptóza aktivuje kaspasu 8 a vnitřní cestou indukovaná apoptóza aktivuje kaspasu 9, jejichž výsledkem je aktivace kaspas 3 a 7. Ty jsou dále zodpovědné za efektorovou fázi apoptózy. U line A549 žádná zvýšená aktivita kaspas pozorována nebyla⁵².

Pankracin tedy u linie A549 snižuje proliferaci, ale ne viabilitu, jelikož zastaví buňku v G1 fázi cyklu a nepodněcuje ji k apoptóze na buněčné úrovni. Naopak u buněčné linie MOLT-4 je viabilita snížena aktivací všech sledovaných kaspas a tedy indukcí obou typů apoptických kaskád⁵².

3.5.5 Haemanthamin

Z extraktů připravených z rostlin čeledi Amaryllidaceae bývá haemanthamin, hlavní zástupce haemanthaminového strukturního typu, často izolován v abundantním množství⁵⁴. Biosyntéza haemanthaminového a krininového strukturního typu je velice podobná. Jediný rozdíl je v účasti enantiomerních forem reduktas. Haemanthamin je derivát 5,10b-ethanofenanthridinu s α -orientovaným ethanovým můstkem mezi N5 a C10b (krininový strukturní typ má β -orientaci)^{3,53}. Pro antiproliferativní aktivitu je u haemanthaminu společně s haemanthidinem, dalším zástupcem haemanthaminového strukturního typu, důležitá methoxy skupina na C3 a volná hydroxy skupina na C11⁵⁴.



Obrázek 14: Haemanthamin a haemanthidin⁵⁴.

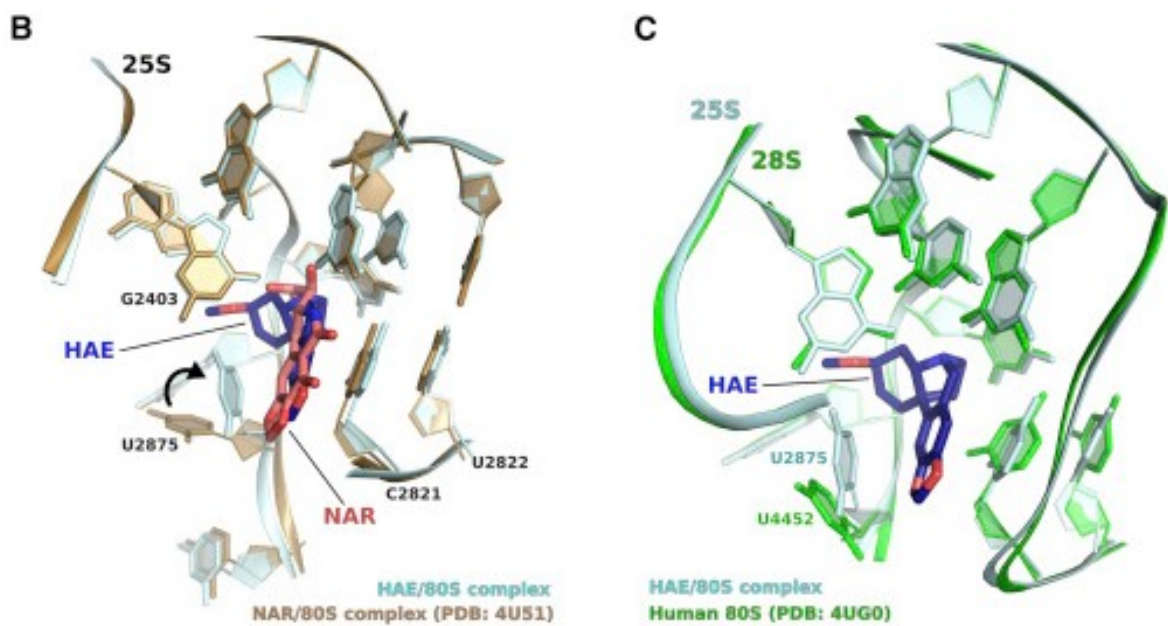
Testy cytotoxicity ukázaly slibnou protinádorovou aktivitu haemanthaminu. Studie provedená G. Van Goietsenoven et. al v roce 2010³⁴ bohužel neuvádí žádný standard pro porovnání s testovanými alkaloidy. Studie provedená Z. Luo et al. v roce 2012⁵⁵ používá jako standard cisplatinu a studie G. Luchetti et al. z téhož roku⁵⁶ porovnává ostatní studované Ama s lykorinem. Haemanthamin vykazuje silnou inhibiční aktivitu vůči růstu značného k apoptóze senzitivního i rezistentního množství buněčných linií, což je v souladu s použitými standardy (tabulka 5)^{34,54-56}. Dále vykazuje také účinky antioxidační, protivirové, antikonvulzivní a antimalarické⁵⁷.

Tabulka 5: Porovnání IC₅₀ haemanthaminu některých MTT esejí^{34,55,56}.

Buněčný typ	Délka MTT esej	IC ₅₀ [μM]	Zdroj
A549	48 hod	2,5	55
HepG2	48 hod	4,8	55
HT-29	48 hod	2,1	55
Chronická myeloidní leukemie (K562)	48 hod	2,5	55
Chronická myeloidní leukemie (HL-60)	48 hod	1,4	55
A549	72 hod	4,5	34
OE21	72 hod	6,8	34
U373	72 hod	7,7	34
B16F10	72 hod	6,8	34
HeLa	72 hod	3	56
U373	72 hod	6	56
Glioblastom (T98G)	72 hod	3	56
Glioblastom (U87)	72 hod	6	56

Účinek je na buněčné úrovni způsoben hned několika mechanismy. Některé jsou specifické pro haemanthaminový i krininový typ AmA a jiné přímo pro stereospecifickou strukturu haemanthaminu. Na buněčný cyklus má u haemanthaminu i haemanthidinu vliv zastavení přednostně v G1 popř. G2/M fázi^{53,54,58}.

Výhodou haemanthaminu oproti narciklasinu je jeho rozpustnost ve vodě ve vyšší koncentraci. Tím se stává lepším adeptem pro preklinické studie. Stejně tak jako narciklasin i haemanthamin se váže na A-stranu velké podjednotky ribozomu (ve studii byla použita kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která má strukturu velké podjednotky podobnou lidskému ribozomu), a tím zastavuje prolungační fázi translace. Oproti narciklasinu má haemanthamin lepší prostorové umístění báze (~75°), tvoří pevnější π vazbu mezi zbytky 25S rRNA a má o jednu vodíkovou vazbu více, což ho v této vazbě stabilizuje, a dochází tak k potenciaci inhibice translace. 25S rRNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* má konformační podobnost s 28S rRNA lidského ribozomu 80S, a lze tedy usuzovat, že haemanthamin se na lidský ribozom váže podobně (obrázek 15)⁵⁸.



Obrázek 15:

B: Porovnání haemanthaminu a narciklasinu ve vazbě do velké podjednotky ribozomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

C: Porovnání vazby haemanthaminu v 25S a 28S rRNA⁵⁸.

Cytostatický účinek haemanthaminu a haemanthidinu může být vedle ovlivnění syntézy proteinů způsoben také stabilizací p53 proteinu například v buňkách karcinomu tlustého střeva, což vede k programované buněčné smrti zvýšením protinádorové stresové odpovědi buňky, a tedy k účinnému způsobu, jak zničit karcinogenní buňky. Za tuto stabilizaci je primárně zodpovědná specifická inhibice zpracování pre-RNA⁵⁸.

Z hlediska farmakokinetiky byla provedena pilotní studie na myších. Po intravenózním podání je haemanthamin rychle (do 30 minut) distribuován pasivní difúzí. Díky 70,4minutovému poločasů rozpadu je poměrně rychle eliminován z organismu žlučí (koncentrace srovnatelná s plazmou) a močí (koncentrace o dva řády vyšší než v plazmě). Ačkoli se ve tkáních díky rychlé eliminaci téměř neváže, má velký distribuční objem 13,7 l/kg, a tedy vstupuje z plazmy i do buněk. Rizikem by mohlo být poškození ledvin právě díky jeho vysoké koncentraci v moči⁵⁷.

3.5.6 Haemanthidin

Strukturně je haemanthidin velice podobný haemanthaminu. Jedná se totiž o jeho 6-hydroxy derivát (obrázek 14). Oproti haemanthaminu bývá z rostlinných extraktů izolován ve velmi malých množstvích ve formě stereoizomeru⁵⁴. Byl detekován v několika genotypech *Narcissus tazetta* a v jednom genotypu *Narcissus papyraceus*⁵⁹. Prokázalo se, že v rostlinách probíhá ireverzibilní přeměna haemanthaminu na haemanthidin, ale haemanthidin není konečným produktem. Tím je tazettin, jehož přeměna zpět na haemanthamin je možná, není však častá⁶⁰. Toto tvrzení dnes vyvrací názor některých vědců zabývajících se tematikou AmA, že tazettin je pouze izolačním reliktem pretazettinu^{3,61}.

Mechanismus účinku má haemanthidin podobný haemanthaminu s tím rozdílem, že díky hydroxyly na C6 tvoří s 25S rRNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* o jednu vodíkovou vazbu více. Tím zvyšuje svoji aktivitu oproti haemanthaminu⁵⁸ (tabulka 6).

Tabulka 6: Porovnání IC₅₀ haemanthidinu některých MTT esejí^{34,56,62}.

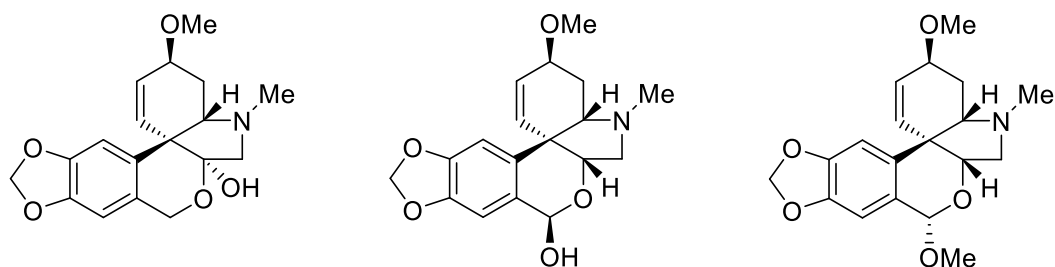
Buněčný typ	Délka MTT esej	IC ₅₀ [μM]	Zdroj
HL-60	24-72 hod	2,0	62
A549	72 hod	4,0	34
OE21	72 hod	3,7	34
U373	72 hod	3,8	34
B16F10	72 hod	3,1	34
T98G	72 hod	14	56
U373	72 hod	7	56
U87	72 hod	6	56
Standard	Délka MTT esej	IC ₅₀ [μM]	Zdroj
Cisplatina na HL-60	24-72 hod	1,3	62
Lykorin na U373 (zdroj ⁵⁶ odkazuje na předchozí studii)	72 hod	7,6	39

Aktivita haemanthaminu a haemanthidinu byla porovnáována na linii Jurkat. Po 48 hodinách haemanthidin oproti haemanthaminu více snižoval viabilitu při koncentracích 15 (viabilita 77 %, respektive 82 %) a 20 μM (viabilita 50 %, respektive 67 %). Toto zjištění bylo dále podpořeno navázáním annexinu V na fosfatidylserin, který je translokován na vnější stranu membrány při rané fázi apoptózy. Buňky ovlivněny haemanthidinem měly vyšší procento buněk pozitivních na annexin V a zároveň vyšší pokles procenta buněk s neporušenými mitochondriemi (dostatečným mitochondriálním membránovým potenciálem). Navíc bylo ve stejné studii zjištěno, že vnitřní fáze apoptózy byla aktivována masivněji díky větší aktivaci kaspasy 9 oproti kaspase 8 (vnější cestou indukovaná raná fáze apoptózy). Haemanthidin tedy v obou cestách indukce jevil větší aktivitu⁶³.

3.5.7 Tazettin

Tazettin, je dnes považovaný za izolační artefakt pretazettinu. I proto se od něj upouští jako od jednoho ze základních strukturních typů a používá se místo něj struktura pretazettinu³. Ovšem změna jména nenese změnu základních parametrů. Typická je tetracyklická struktura se dvěma heterocykly a jedním aromatickým jádrem, na které je napojena methylenedioxy skupina⁶⁴.

Tazettin postrádá antiproliferativní aktivitu na většinu buněčných linií, ačkoli v některých studiích nepocházejících z narcisů jevil mírnou aktivitu proti multirezistentní formě L5178 MDR buněčné linie lymfomu a HeLa linií^{34,53,55,64}.



Obrázek 16: Tazettin, pretazettin, jonquailin⁶¹.

3.5.8 Pretazettin

Pretazettin je jedním z 9 základních typů AmA. Změna polohy hydroxy skupiny z C6a v tazettinu do polohy C8 v pretazettinu je spojena se zvýšením cytostatického efektu. Tento efekt je pravděpodobně spojen s náchylnější povahou hemiacetalového pretazettinu k chemické modifikaci oproti hemiketalovému tazettinu. B- a D-kruhy jsou v *trans* uspořádání na rozdíl od tazettinu, kde jsou v poloze *cis*. Další důležitou skupinou pro antiproliferativní aktivitu je methoxy skupina na C3 v C-kruhu zároveň s její stereochemickou orientací^{61,64}.

Již v sedmdesátých letech 20. století profesor Eiichi Furusawa zkoumal pretazettin, alkaloid z rodu *Narcissus*, a jeho terapeutickou aktivitu na myších s implantovanými buňkami některých typů leukemie. Maximální netoxická dávka pretazettinu u myší s leukémií (tedy maximální dávka, kdy se ještě neprojevíly známky intoxikace jako je slabost, úbytek váhy atd...) byla stanovena na 50 mg/kg během čtrnáctidenního podávání. Ve srovnání s cyklofosfamidem, vinkristinem, purinetholem, v sedmdesátých letech dostupnými standardními léčivy na Rauscherovu leukemii, zvýšil pretazettin střední dobu přežití. Navíc v kombinaci pretazettinu s těmito standardními léčivy střední doba přežití dále významně stoupla. Ještě v sedmdesátých letech byly pretazettinem ovlivněny buňky linie HeLa. Oproti tazettinu (MIC > 400 μM) jevil pretazettin (MIC 1,0 μM) výrazně vyšší inhibiční aktivitu. Ve stejné studii byl pretazettin dokonce více účinný než lykorin (MIC 6,0 μM) a haemanthamin (MIC 4,0 μM)^{64,65}. V osmdesátých letech byla také prokázána terapeutická účinnost pretazettinu v kombinaci s některými standardními léčivy u intraperitoneálně implantovaného Lewisova plicního karcinomu u myší, kde byly nejlepší výsledky pro střední dobu přežití

pozorovány v dávce 25 mg/kg a kombinaci s 6-thioguaninem (v dávce 25 mg/kg), nebo aktinomycinem D (také v dávce 25 mg/kg). Oproti tomu kombinace s cyklofosfamidem, methotrexátem a 5-fluorouracilem jevíly výrazně nižší aktivitu a kombinace s vinkristinem nejevila vůbec žádný synergický efekt. V devadesátých letech byl pretazettin zkoušen na MOLT-4 linii. Jako aktivní se ukázal na linii MOLT-4 s ED₅₀ (střední efektivní dávkou) 0,3 µg/ml. Aktivní byl však i na nenádorovou linii myších fibroblastů LMTK v ED₅₀ 0,7 µg/ml. V dalších letech se pretazettin a jeho potenciální cytotoxický efekt víceméně dostal do ústraní, jelikož se nepodařilo replikovat výsledky na Rauscherovu leukemii v jiných modelech studií⁶⁴.

V roce 2009 se pak pretazettin objevil ve studii rodu *Sprekelia* čeledi Amaryllidaceae, kde vykazoval mírnou aktivitu na lidskou HeLa linii, MCF-7 linii, A431 linii epidermálního karcinomu kůže, vyšší aktivitu na myší lymfoidní linii L5178 s vloženým lidským genem MDR1, díky kterému je buněčná linie multirezistentní, a vysokou aktivitu na samotnou senzitivní myší lymfoidní linii L5178 (tabulka 7). Pretazettin navíc inhiboval aktivitu p-glykoproteinu, který může být zodpovědný za rozvoj multirezistence během chemoterapie, a synergicky zvýšil aktivitu doxorubicinu vůči linii L5178 MDR1⁶⁶.

Tabulka 7: Porovnání IC₅₀ v µM pretazettinu a doxorubicinu na vybraných buněčných liniích metodou 72hodinové MTT⁶⁶.

Buněčný typ	IC ₅₀ pretazettinu	IC ₅₀ doxorubicinu
HeLa	8,853	0,154
MCF-7	7,869	0,279
A431	5,373	0,149
L5178 MDR1	4,12	1,097
L5178	0,7989	neurčeno

Ve studii z roku 2019 byla na buněčné linii A549 pozorována indukce apoptózy měřením aktivity kaspasy 3. Aktivita kaspasy 3 po ovlivnění pretazetinem byla 70 %, po ovlivnění lykorinem to bylo jen 60 %⁶⁷. Kaspasa 3 je součástí apoptického aparátu, což můžeme pozorovat na některých diagnostických znacích jako je fragmentace DNA a kondenzace chromatinu. Tento fakt vyplynul i z *in silico* modelování, kde byla vypočtena příznivá vazebná afinita pretazettinu. Na druhou stranu pretazettin vyjevil svoji vyšší toxicitu na linii zdravých křeččích buněk vaječníků CHO-1-15 ve srovnání s mitomycinem C jako kontrolou^{64,67}.

3.5.9 Jonquailin

Jonquailin patří do pretazettinového typu AmA. Jeho název je odvozen z *Narcissus jonquilla*, ze kterého byl poprvé izolován. Od struktury pretazettinu se liší pouze substitucí na C8. Místo hydroxylové skupiny pretazettinu je na C8 jonquailinu navázána methoxy skupina, tedy změna z hemiacetalu (pretazettinu) na stabilnější acetal (jonquailin). Jelikož byl jonquailin získán v epimerní čistotě na C8, byl vyloučen jeho vznik reakcí pretazettinu s methanolem při extrakci, nebo při chromatografickém čištění rostlinných extraktů. Pro protinádorovou aktivitu se jeví jako důležitá hydroxylace na C8, na druhou stranu stereochemie laktolové skupiny ani její acetalizace tuto aktivitu neovlivnily⁶¹.

První studie na protinádorové aktivity jonquailinu ukázaly, že je účinný proti liniím nádorových buněk glioblastomu U87 a U373, děložního sarkomu MES-SA a MES-SA/Dx5 (dceřiná linie pěstovaná v přítomnosti doxorubicinu), SKMEL-28, A549, které vykazují různé typy rezistence vůči dosavadní léčbě. Dále byla účinnost jonquailinu hodnocena u dvou buněčných linií karcinomu plic H1993 a H2073 pocházejících od jednoho pacienta, který podstoupil chemoterapii, ale v primárním místě se nádor opět objevil. H1993 byl odvozen z metastázy lymfatických uzlin izolované před chemoterapií, zatímco H2073 byl odvozen z opětovného růstu plicního nádoru měsíce po chemoterapii. Buněčná linie H2073 je vůči paklitaxelu významně odolnější než linie H1993. Ačkoli účinnost jonquailinu proti buňkám H2073 také klesá, její pokles je řádově méně výrazný než u paklitaxelu. Proti oběma těmto buněčným liniím však nejlépe působí jonquailin spolu s paklitaxelem. Pro své synergické působení může být jonquailin potenciálně použit jako adjuvans ke konvenční chemoterapii. Oproti tomu buněčná linie sarkomu dělohy MES-SA a její dceřiná linie pěstovaná v přítomnosti doxorubicinu MES SA/Dx5, která je odolná vůči mnoha funkčně a strukturně nepříbuzným molekulám, nevykazovaly nikterak výrazný rozdíl ve snižování viability po přidání jonquailinu, opačně tomu je u paklitaxelu, který jeví více než tisícinásobný pokles (tabulka 8)⁶¹.

Tabulka 8: Porovnání GI_{50} v μM jonquailinu a paklitaxelu na vybraných buněčných liniích metodou 48–72hodinové MTT⁶¹.

Buněčný typ	GI_{50} jonquailinu	GI_{50} paklitaxelu
U87	28	96
U373	1	neurčeno
SKMEL-28	11	neurčeno
A549	5	neurčeno
Hs683	51	neurčeno
H1993	17	0,003
H2073	85	> 1
MES-SA	25	0,007
MES-SA/Dx5	29	10

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Doxorubicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Methanol HPLC (J. T. Baker, Denver, Holandsko)
- Methylénová tetrazoliová sůl: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Roztok L-glutaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- RPMI 1640 médium bez fenolové červeni (BioTech, Prague, Česká republika)
- Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

4.1.2 Materiál a přístrojové vybavení

- Centrifuga (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Inkubátor SalvisLab BC 190 S s řízenou atmosférou CO₂ (SalvisLab, Risch-Rotkreuz, Švýcarsko)
- Inverzní mikroskop Nikon Eclipse Ts2-FL (Nikon, Melville, New York, USA)
- Kultivační lahve T75 (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Laminární box BioAir Aura 2000 M.A.C.
- Mikrotitrační destičky 96 jamek, ploché dno (Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko)
- Neubauerova počítací komůrka
- Pipety a špičky Eppendorf (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem 5975C inert MSD, EI mód 70 eV, kolona HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm), (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7820A s plamenoionizačním detektorem (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA)

- Spektrofotometr Reader Synergy Neo2 Multi-Mode Reader NEO2SMALPHAB (BioTek, Vermont, USA)
- Třepačka MS 3 digital (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA)
- Ultrazvuková vodní koupel Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlín, Německo)

4.1.3 Databáze a programy použité k vyhodnocování výsledků

- Knihovna EI-MS spekter NIST Virtual Library 2011 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornie, USA)

4.1.4 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule všech studovaných taxonů byly dodány firmou Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc a dokladné vzorky byly uloženy v herbáriu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod označením *Narcissus* cv. Cairngorm CUFPH-16130/AL-444, *Narcissus* cv. Acropolis CUFPH-16130/AL-450, *Narcissus* cv. Dick Wilden CUFPH-16130/AL-452, *Narcissus* cv. Ice King CUFPH-16130/AL-453, *Narcissus* cv. Manly CUFPH-16130/AL-454, *Narcissus* cv. Unique CUFPH-16130/AL-456, *Narcissus* cv. Delta CUFPH-16130/AL-457, *Narcissus* cv. White Marvel CUFPH-16130/AL-460, *Narcissus* cv. Trena CUFPH-16130/AL-462, *Narcissus* cv. Kedron CUFPH-16130/AL-463, *Narcissus* cv. Scarlet Gem CUFPH-16130/AL-467 a *Narcissus albus* var. *plenus odoratus* CUFPH-16130/AL-508.

Tabulka 9: Přehled studovaných taxonů.

Kultivar/varieta	Kód	Hmotnost cibulí	Hmotnost alkaloidního extraktu
<i>Narcissus</i> cv. CAIRNGORM	AL-444	270 g	160 mg
<i>Narcissus</i> cv. ACROPOLIS*	AL-450	198 g	150 mg
<i>Narcissus</i> cv. DICK WILDEN	AL-452	210 g	325 mg
<i>Narcissus</i> cv. ICE KING	AL-453	308 g	178 mg
<i>Narcissus</i> cv. MANLY	AL-454	124 g	280 mg
<i>Narcissus</i> cv. UNIQUE	AL-456	255 g	112 mg
<i>Narcissus</i> cv. DELTA*	AL-457	188 g	168 mg
<i>Narcissus</i> cv. WHITE MARVEL*	AL-460	210 g	113 mg

Kultivar/varietà	Kód	Hmotnost cibulí	Hmotnost alkaloidního extraktu
<i>Narcissus</i> cv. TRENA	AL-462	243 g	104 mg
<i>Narcissus</i> cv. KEDRON*	AL-463	183 g	171 mg
<i>Narcissus</i> cv. SCARLET GEM*	AL-467	256 g	184 mg
<i>Narcissus albus</i> var. <i>plenus odoratus</i> *	AL-508	103 g	122 mg

*zpracováno mgr. Beátou Tkáčovou¹⁷

4.1.5 Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2)

Buňky adherentní buněčné linie HepG2 (ATCC HB-8065, ECACC, Salisbury, UK), byly kultivovány v médiu Minimum Essential Medium Eagle doplněném o 10 % v/v FBS a 1 % v/v roztokem L-glutaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v atmosféře při teplotě 37 °C, vlhkosti 95 % a 5% koncentraci CO₂. Během kultivace bylo buňkám pravidelně měněno kultivační médium, kdy bylo z kultivační lahve odstraněno staré médium, přisedlé buňky byly opláchnuty pomocí 5 ml PBS se a do lahve bylo napipetováno čerstvé kultivační médium předem zahřáté na 37 °C. Pravidelně byla pod inverzním mikroskopem kontrolována míra konfluence buněk.

4.2 Metody použité pro analýzu studovaných extraktů

Příprava sumárních extraktů nebyla předmětem této diplomové práce – extrakty s označením AL-450, AL-457, AL-460, AL-463, AL-467 a AL-508 byly připraveny v rámci diplomové práce mgr. Beáty Tkáčové, kde je podrobně popsán postup pro jejich získání na základě acidobazických vlastností alkaloidů¹⁷. Ostatní extrakty (AL-444, AL-452, AL-453, AL-454, AL-456 a AL-462) byly připraveny v rámci nedokončené diplomové práce Marie Kotoučkové.

4.2.1 Plynová chromatografie – hmotnostní detekce (GC-MS)

Kombinace plynové chromatografie a hmotnostní detekce je kombinace vysoce výkonnostních technik, která je velice výhodná při identifikaci a charakterizaci složitých směsí neznámých sloučenin. Detekce hmotnostním spektrometrem určuje a kvantifikuje chemické sloučeniny v závislosti na jejich poměru hmotnosti k náboji. Poskytuje tedy informace o hmotnosti, struktuře a jednotlivých fragmentech sloučenin⁶⁸.

4.2.1.1 Chromatografické podmínky

Na analýzu složení a identifikaci jednotlivých AmA ze sumárních extraktů rodu *Narcissus*, konkrétně *Narcissus* cv. Cairngorm, *Narcissus* cv. Dick Wilden, *Narcissus* cv. Ice King, *Narcissus* cv. Manly, *Narcissus* cv. Unique, *Narcissus* cv. Trena, byl využit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A, který pracuje při elektronové ionizaci 70 eV. Jako mobilní fáze bylo použito helium s rychlostí průtoku 0,8 ml/min. Nástřík vzorku o objemu 1 µl a koncentraci 1 mg/ml byl za teploty 280 °C splitovou metodou 1:10. Separace probíhala v koloně HP-5MS o délce 30 m a průměru 0,250 mm za gradientového teplotního programu 100–180 °C s rychlostí růstu teploty 15 °C/min, 180 °C po dobu 1 min, 180–300 °C s rychlostí růstu teploty 5 °C/min a následně po dobu 5 minut bylo udržováno 300 °C. Rozsah měřených hodnot byl mezi 40 a 600 m/z.

Identifikace alkaloidů probíhala porovnáváním vyhotovených spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně dostupných spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), dále s daty dostupnými v literatuře a se standardy látek, které už byly v naší laboratoři izolovány.

4.2.2 Plynová chromatografie – plamenoionizační detekce (GC-FID)

Plynová chromatografie spojená s plamenoionizační detekcí je hojně využívána u těkavých organických sloučenin a složitých směsí nejen ve farmacii. Tato separační, identifikační a kvantifikační analytická metoda nabízí vysoce selektivní, citlivou a reprodukovatelnou analýzu.

Princip plynové chromatografie spočívá v rozdělení vzorku injektovaného v plynné formě mezi stacionární (pevnou) a mobilní (plynou) fázi, tedy v postupném vymývání jednotlivých složek vzorku z kolony díky rozdílným afinitám ke stacionární fázi. Plamenoionizační detektor následně kyslíkovým plamenem ionizuje postupně vymývané složky vzorku. Ionty dopadají na elektrodu, ta generuje signál, který je přímo úměrný koncentraci dané složky ve vzorku⁶⁸.

4.2.2.1 Chromatografické podmínky

Kvantifikace složení extraktů z rodu *Narcissus* byla prováděna plynovým chromatografem Agilent Technologies 7820A s plamenoionizačním detektorem. Nosným plynem byl dusík, teplota injektoru byla 270 °C, injektovaný objem byl 1 µl metodou splitless. Byla použita kolona Agilent 19091J-413 o délce 30 m, průměru 0,32 mm a hrubosti 0,25 µm. Iničiální teplota byla 200 °C, následoval gradient 10 °C/min až do dosažení teploty 300 °C po dobu 3 min. Teplota na detekci byla 310 °C a citlivost detektoru byla 50Hz/0.004 min.

Tabulka 10: Retenční časy (RT) jednotlivých AmA.

Alkaloid	RT [min]
Galanthamin	6,10
Tazettin	7,50
Haemanthamin	7,89
Lykorin	8,30

4.3 Stanovení cytotoxické aktivity metodou MTT

Metodou měření MTT se kvantifikuje životaschopnost buněk v kultuře pro posouzení cytotoxického působení různých látek. Živé buňky jsou pomocí mitochondriálních reduktas schopny redukovat žlutou methylenovou tetrazoliovou sůl na fialový formazan, jehož absorbance je stanovena spektrofotometricky. Jedná se tedy o kolorimetrickou metodu, která dokáže díky změnám v metabolické aktivitě buněk stanovit cytotoxicitu látek^{69,70}.

4.3.1 Příprava testovaných extraktů na měření

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky testovaných extraktů o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním v DMSO, které byly zamrazeny a v čase potřeby se následně naředěny na koncentrace 50 a 10 µg/ml.

4.3.2 Příprava čistých látek

Čisté alkaloidy (galanthamin, haemanthamin, lykorin a tazettin) byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 10 mM. Tyto zásobní roztoky byly v čas potřeby dále naředěny na koncentrace 50 a 10 µg/ml pro screening nebo na koncentrace v rozsahu 200-0,1 µM pro stanovení IC₅₀. Jako standard pro porovnání byl použit doxorubicin hydrochlorid.

4.3.3 Popis MTT metody

Experiment byl prováděn na buněčné linii HepG2. Minimálně jednou týdně byly buňky pasážovány. Pasážování předcházelo opláchnutí přisedlých buněk roztokem PBS, aby byly odstraněny mrtvé buňky a zbytky kultivačního média. Po opláchnutí byla provedena 5minutová inkubace buněk v roztoku trypsinu/EDTA při 37 °C, aby se buňky uvolnily ode dna kultivační lahve. Pasážování samo o sobě obnášelo centrifugaci buněk, jejich přepočítání v Neubauerově komůrce a nasazení určitého počtu buněk s dostatkem kultivačního média do nové kultivační

lahve. Buňky pro experimentální stanovení byly naředěny médiem a nasazeny do 96jamkové destičky tak, aby výsledná koncentrace byla 10^4 buněk/jamka a objem 100 μ l/jamka.

Buňky v destičce byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Po 24 hodinách bylo z jamek odsáto kultivační medium a buňky v jamkách byly po triplicátech ovlivněny 100 μ l roztoků testovaných extraktů či alkaloidů v kultivačním médiu. Aby bylo možné porovnat viabilitu, tak každá destička obsahovala kontrolu se 100% buněčnou viabilitou, kam bylo přidáno jen 0,5 % DMSO (odpovídá koncentraci DMSO v ostatních jamkách) a blank, který neobsahoval žádné buňky.

Po dalších 24 hodinách, kdy byly ovlivněné buňky opět inkubovány při 37 °C a koncentraci CO₂ 5 %, bylo odstraněno kultivační médium s testovanými extrakty či alkaloidy a k buňkám bylo přidáno 110 μ l roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT) v bezbarvém RPMI 1640 médiu a buňky byly kultivovány ve stejných podmínkách 3 hodiny. Následně byl z buněk odstraněn roztok MTT a krystaly fialového formazanu byly rozpuštěny ve 100 μ l DMSO a následně protřepány po dobu 3 minut na třepačce MS 3 digital (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA), aby bylo dosaženo homogenního zbarvení. V tu chvíli mohla být spektrofotometricky změřena absorbance roztoků při 570 nm na spektrofotometru Reader Synergy Neo2 Multi-Mode Reader NEO2SMALPHAB (BioTek, Vermont, USA). Vzhledem k tomu, že míra zbarvení v jamce je přímo úměrná množství životaschopných buněk, mohla být tato viabilita *in silico* spočítána pomocí Lambert-Beerova zákona. Cytotoxicita testovaných extraktů byla vypočítána a zprůměrována ze tří nezávislých experimentů. V případě stanovení IC₅₀ u čistých látek byla získaná data vyhodnocena pomocí programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornie, USA).

Vzorec Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \times c \times l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

A – absorbance, ε – molární absorpční koeficient látky, c – koncentrace látky v roztoku, l – délka optické dráhy, I_0 – intenzita záření vstupujícího do systému, I – intenzita záření dopadající na detektor⁶⁸.

5 Výsledky

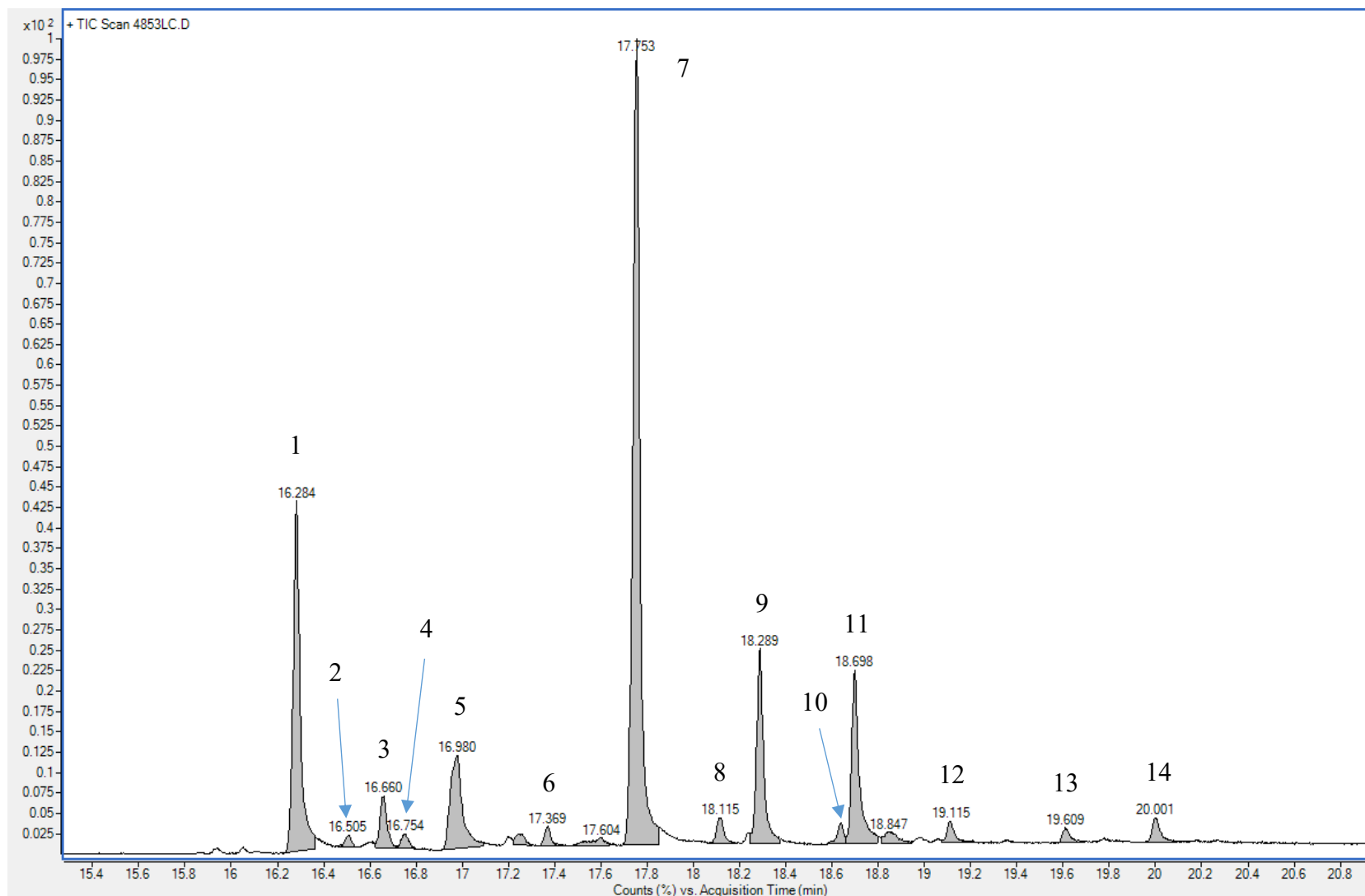
5.1 Identifikace složení sumárních extraktů

5.1.1 GC-MS

Následující podkapitoly zahrnují výsledky strukturní analýzy alkaloidů z jednotlivých sumárních extraktů. Ke každému extraktu je uveden obrázek chromatogramu a tabulka hmotnostních spekter. Na konci podkapitoly je uvedena tabulka (tabulka 17) s procentuálním zastoupením identifikovaných alkaloidů a obrázek (obrázek 23) s jejich strukturami.

5.1.1.1 *Narcissus* cv. CAIRNGORM (AL-444)

Obrázek 17: Chromatogram sumárního extraktu AL-444.

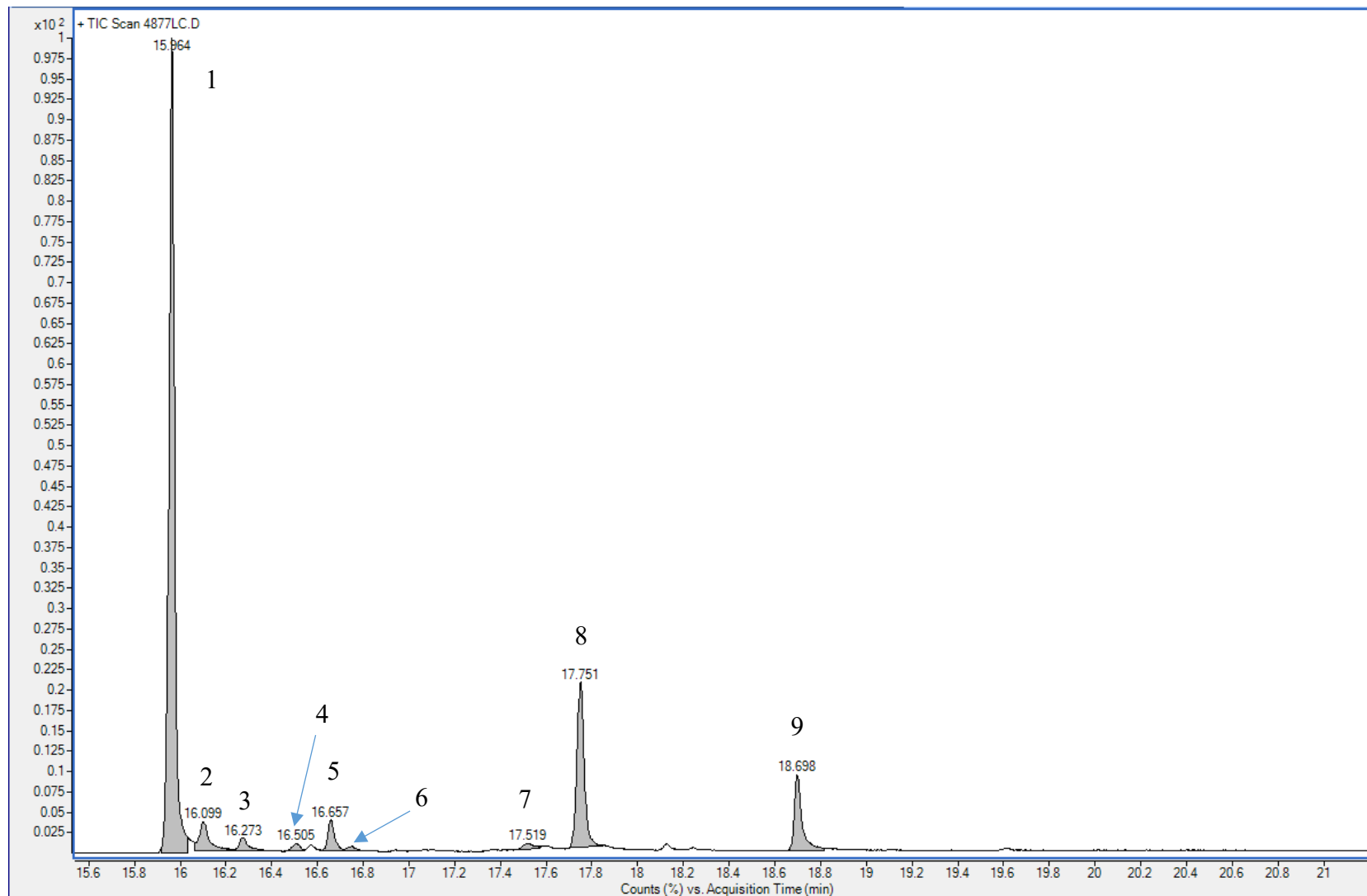


Tabulka 11: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-444.

Název alkaloidu	RT [min]	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. <i>epi</i> -Norgalanthamin	16,284	273(94), 272(100), 230(32), 202(29), 181(11), 174(16), 165(12), 115(18), 109(14)	NIST
2. Homolykorinový typ	16,505	273(7), 272(10), 269(6), 255(5), 207(14), 191(6), 115(7), 110 (10), 109(100), 108(18)	NIST
3. Homolykorinový typ	16,660	300(2), 299(3), 281(2), 207(3), 191(8), 110(7), 109(100), 108(3), 108(13), 94(3)	NIST
4. Homolykorinový typ	16,754	285(6), 284(3), 281(5), 255(3), 254(3), 207(10), 177(6), 110(6), 109(100), 108(16)	NIST
5. A ₁	16,980	329(32), 328(41), 272(18), 271(100), 270(74), 269(26), 268(59), 240(25), 128(15), 77(14)	-
6. Homolykorinový typ	17,369	281(10), 271(7), 268(8), 267(50), 266(100), 264(9), 250(22), 222(8), 207(19), 109(25)	NIST
7. Haemanthamin	17,753	301(15), 273(18), 272(100), 242(15), 240(15), 214(14), 212(14), 211(15), 186(14), 181(25), 128(13)	71
8. Dehydroassoanin	18,115	265(75), 264(100), 248(16), 223(12), 220(13), 207(30), 191(17), 178(14)	72
9. Galanthin	18,289	317(20), 316(14), 284(11), 268(16), 266(13), 244(14), 243(90), 242(100), 162(9), 125(9)	NIST
10. Inkartin	18,64	333(23), 332(100), 281(48), 266(16), 259(50), 258(70), 253(16), 226(19), 208(19), 207(98)	71,73
11. Homolykorinový typ	18,698	207(3), 178(2), 110(8), 109(100), 108(22), 94(3), 93(2), 82(3), 81(2), 77(1)	NIST
12. Homolykorinový typ	19,115	281(22), 253(7), 209(7), 208(8), 207(51), 110(9), 109(11), 109(100), 108(23), 73(11)	NIST
13. Homolykorinový typ (patrně hippeastrin)	19,609	282(11), 281(42), 253(12), 209(12), 208(17), 191(12), 125(100), 96(44), 73(19)	71
14. A ₂	20,001	296(17), 295(100), 294(81), 294(31), 281(41), 253(15), 208(24), 207(93), 125(12), 73(20)	-

5.1.1.2 *Narcissus* cv. DICK WILDEN (AL-452)

Obrázek 18: Chromatogram sumárního extraktu AL-452.

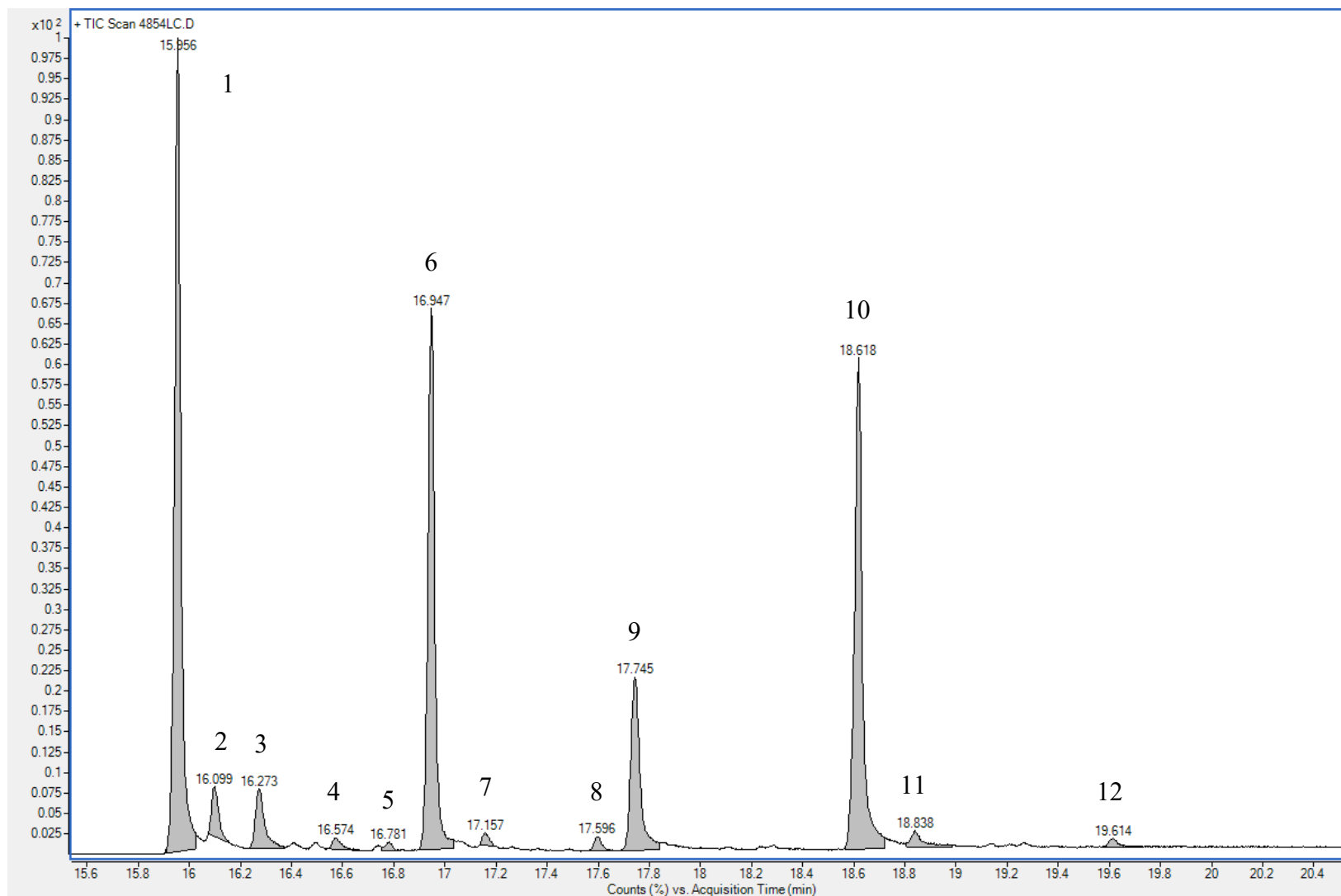


Tabulka 12: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-452.

Název alkaloidu	RT [min]	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. Galanthamin	15,964	287(79), 286(100), 270(14), 244(23), 230(12), 216(35), 174(32), 165(11), 115(17)	NIST
2. Lykoramin	16,099	289(55), 288(100), 287(28), 286(37), 284(14), 216(21), 174(21), 128(13), 115(22), 109(15)	71,72
3. Homolykorinový typ	16,273	287(43), 286(95), 273(25), 230(17), 216(26), 207(21), 202(26), 115(21), 109(100)	NIST
4. Homolykorinový typ	16,505	271(13), 207(10), 199(7), 187(9), 128(5), 115(6), 110(8), 109(100), 108(13), 108(5)	NIST
5. Homolykorinový typ	16,657	300(2), 299(3), 299(3), 207(3), 191(8), 110(8), 109(100), 108(14), 94(4), 82(2)	NIST
6. Homolykorinový typ	16,748	286(10), 285(9), 281(23), 254(19), 207(9), 207(27), 115(9), 109(12), 109(100), 108(20)	NIST
7. Homolykorinový typ	17,519	299(4), 281(4), 266(2), 207(8), 191(2), 110(8), 109(100), 108(19), 94(3), 82(2)	NIST
8. Haemanthamin	17,751	301(13), 273(18), 272(100), 242(15), 240(16), 214(15), 212(14), 211(15), 186(14), 181(25), 128(13)	71
9. Homolykorinový typ	18,698	207(2), 178(2), 110(8), 109(100), 108(22), 94(3), 93(2), 82(3), 81(2), 77(1)	NIST

5.1.1.3 *Narcissus* cv. ICE KING (AL-453)

Obrázek 19: Chromatogram sumárního extraktu AL-453.

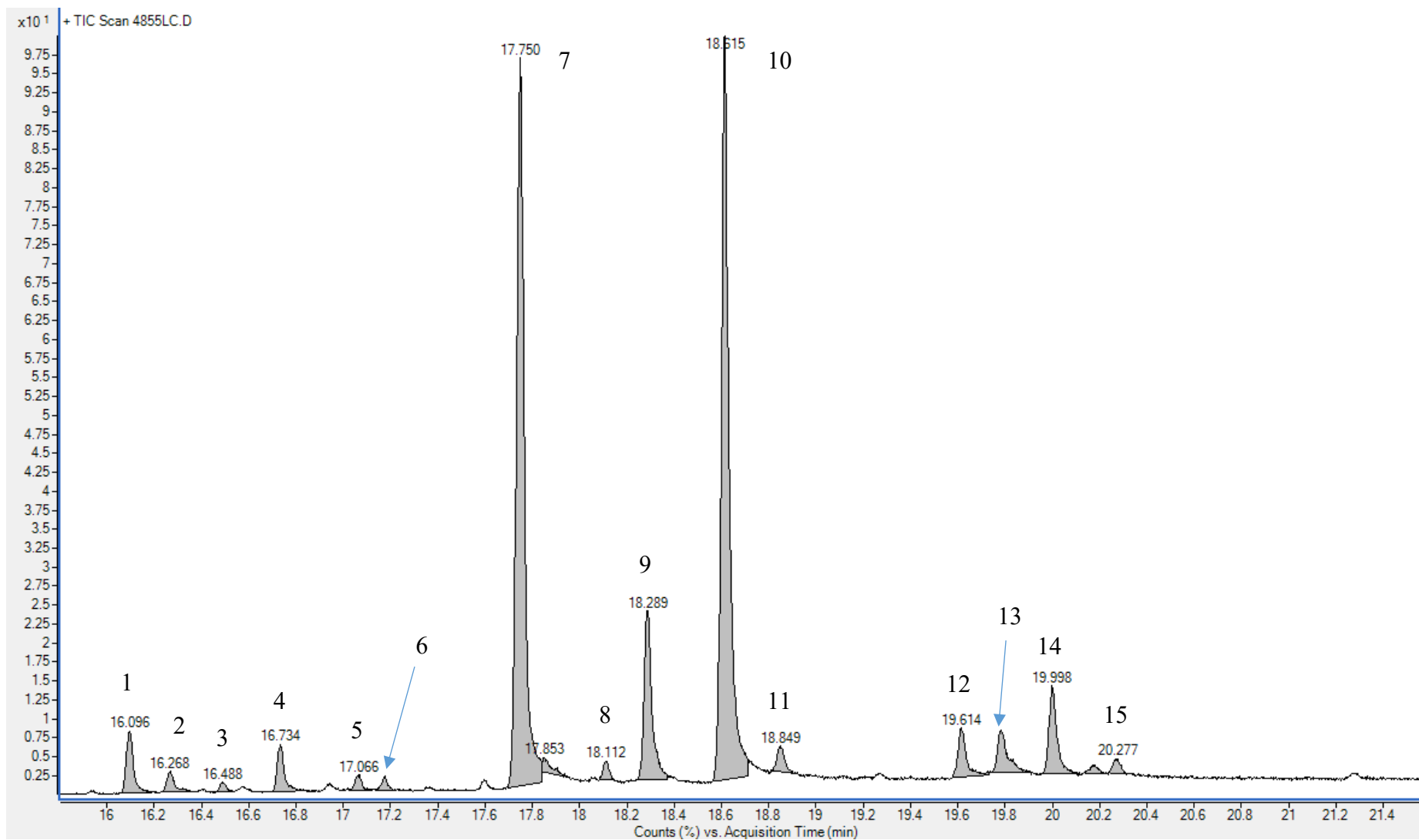


Tabulka 13: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-453.

Název alkaloidu	RT [min]	[M ⁺] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. Galanthamin	15,956	287(79), 286(100), 270(14), 244(23), 230(12), 216(35), 174(32), 165(11), 115(16)	NIST
2. Lykoramin	16,099	289(57), 288(100), 287(12), 286(16), 216(10), 187(10), 174(12), 128(9), 115(14)	71,72
3. Homolykorinový typ	16,273	288(25), 287(70), 286(100), 273(85), 272(95), 230(25), 202(42), 174(27), 115(33), 109(36)	NIST
4. Narwedín	16,574	285(50), 284(100), 281(21), 272(22), 216(27), 207(49), 174(28), 128(20), 115(32)	NIST
5. A ₃	16,781	281(7), 252(6), 251(42), 250(100), 207(18), 192(11), 191(13), 96(7)	-
6. Karanin	16,947	271(59), 270(36), 253(11), 252(51), 250(13), 240(10), 227(41), 226(100)	NIST
7. Norpluviin	17,157	273(54), 272(29), 254(51), 253(20), 252(51), 229(49), 228(100), 226(17), 207(31)	71
8. 11,12-Didehydroanhydrolykorin	17,596	249(56), 248(100), 207(17), 191(8), 190(22), 96(10), 95(6)	72
9. Haemanthamin	17,745	273(19), 272(100), 242(15), 240(16), 214(15), 212(14), 211(15), 186(14), 181(25), 128(13)	71
10. Lykorin	18,618	287(23), 286(16), 268(21), 252(11), 251(10), 250(28), 227(62), 226(100)	NIST
11. A ₄	18,838	281(45), 253(17), 250(40), 249(19), 248(19), 243(22), 242(28), 208(19), 207(100)	-
12. Homolykorinový typ (patrně hippeastrin)	19,614	282(11), 281(44), 253(14), 209(12), 208(17), 125(100), 96(22), 73(17)	71

5.1.1.4 *Narcissus* cv. MANLY (AL-454)

Obrázek 20: Chromatogram sumárního extraktu AL-454.

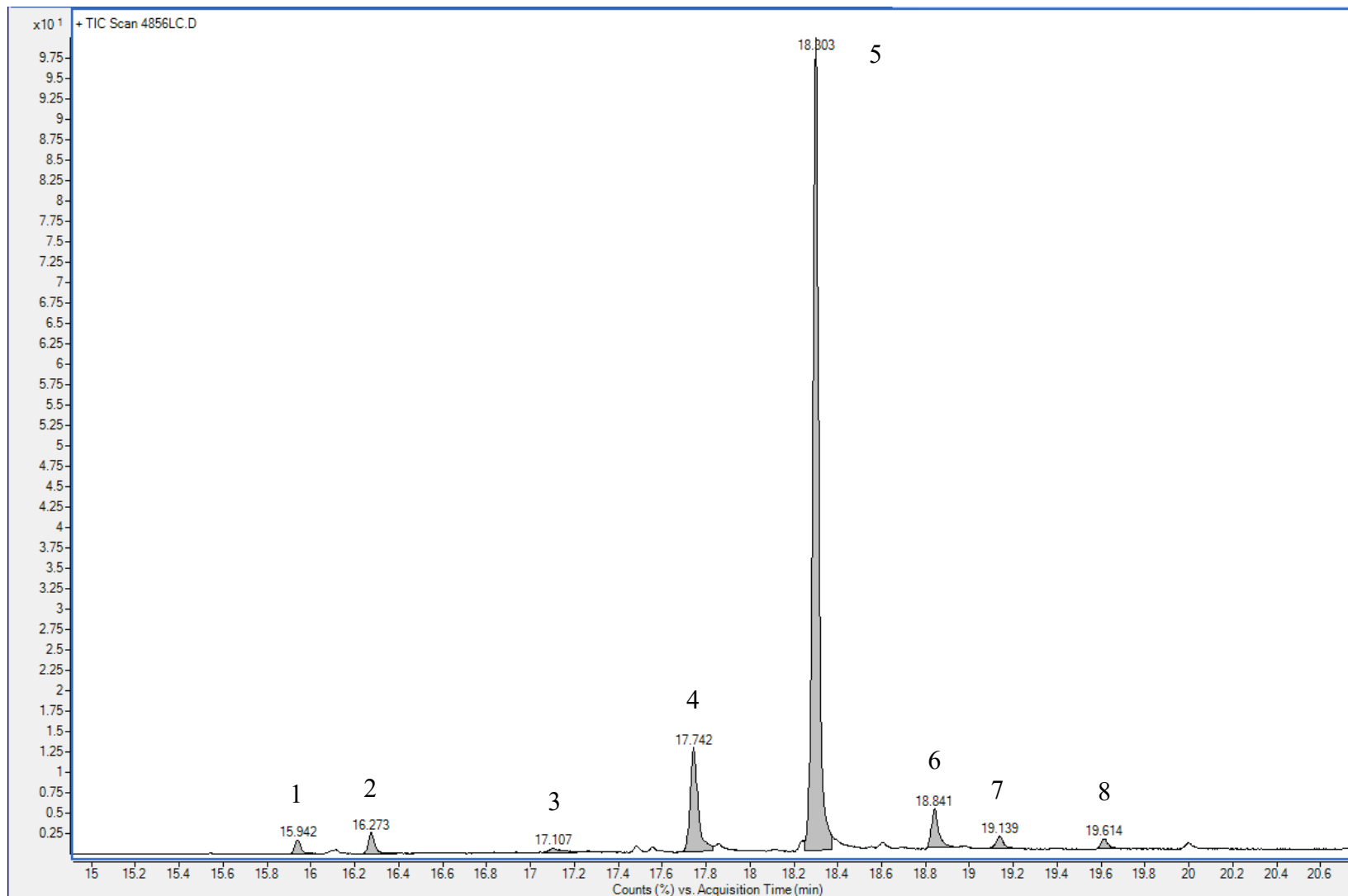


Tabulka 14: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-454.

Název alkaloidu	RT [min]	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. Lykoramin	16,096	290(9), 289(54), 288(100), 232(6), 228(5), 202(8), 187(5), 128(6), 115(7), 115(5)	71,72
2. Homolykorinový typ	16,268	288(22), 287(71), 286(100), 281(14), 207(39), 202(18), 187(11), 175(13), 115(16), 109(53)	NIST
3. A ₅	16,488	281(41), 271(81), 253(20), 252(20), 228(20), 208(23), 207(25), 207(100), 199(43), 187(41)	-
4. 1- <i>O</i> -Acetyl-10-norpluviin	16,734	315(42), 314(41), 256(27), 255(32), 254(100), 252(21), 242(19), 228(22), 207(21)	74
5. Sanguinine	17,066	273(100), 272(99), 256(26), 228 (43), 147(10)	72
6. Anhydropseudolykorin	17,176	281(19), 254(10), 253(49), 252(100), 237(18), 209(19), 208(10), 207(40),	75
7. Haemanthamin	17,750	273(19), 272(100), 242(15), 240(15), 214(15), 212(13), 211(15), 186(13), 181(25), 128(12)	71
8. Dehydroassoanin	18,112	265(77), 264(100), 248(18), 224(11), 223(16), 191(10), 178(12)	72
9. Galanthin	18,289	317(19), 316(11), 298(9), 268(16), 266(13), 243(88), 242(100), 228(9), 207(14), 125(10)	NIST
10. Lykorin	18,615	287(23), 286(16), 268(22), 252(13), 251(11), 250(30), 228(9), 227(62), 226(100), 147(10)	NIST
11. A ₆	18,849	315(22), 281(25), 266(36), 250(32), 248(28), 242(34), 241(76), 240(86), 208(22), 207(100)	-
12. Homolykorinový typ (patrně hippeastrin)	19,614	281(17), 253(6), 208(8), 207(41), 133(6), 126(8), 125(100), 124(7), 96(38), 73(6)	71
13. A ₇	19,783	315(10), 295(20), 294(23), 284(41), 282(14), 281(47), 264(15), 228(15), 208(23), 207(100), 191(15)	-
14. A ₈	19,998	295(87), 294(100), 281(15), 278(9), 250(8), 208(11), 207(35), 191(7), 147(6)	-
15. A ₉	20,277	295(72), 294(76), 284(40), 282(35), 265(48), 257(100), 256(76), 207 (100)	-

5.1.1.5 *Narcissus* cv. UNIQUE (AL-456)

Obrázek 21: Chromatogram sumárního extraktu AL-456.

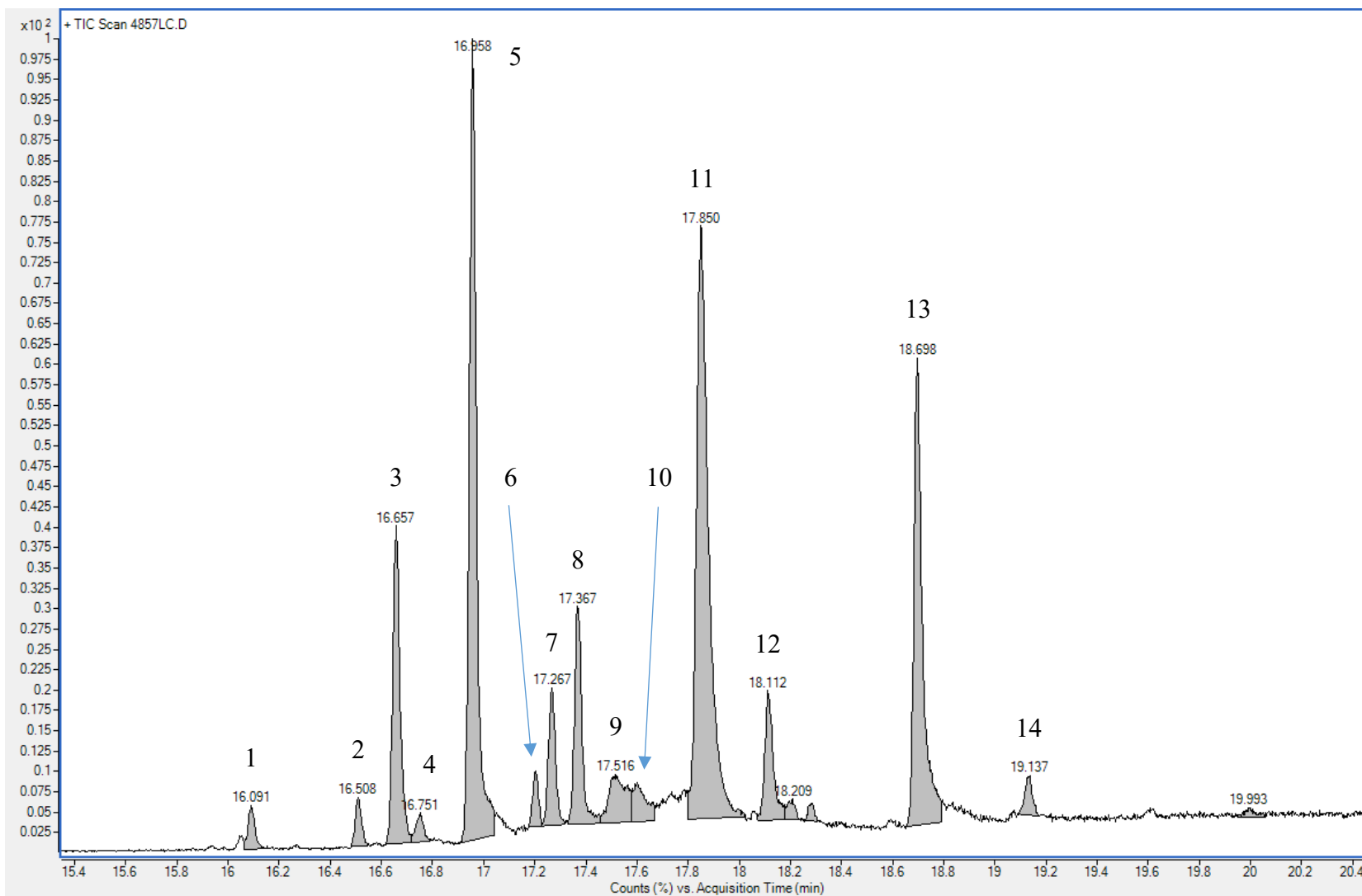


Tabulka 15: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-456.

Název alkaloidu	RT [min]	[M+] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. Galanthamin	15,942	287(78), 286(100), 270(12), 244(18), 230(11), 216(33) 207(11), 174(30), 115(14)	NIST
2. Homolykorinový typ	16,273	284(9), 283(5), 281(2), 207(3), 175(10), 110(8), 109(100), 108(19), 94(3), 82(2)	NIST
3. Homolykorinový typ	17,107	283(4), 281(9), 253(3), 208(4), 207(5), 207(18), 110(8), 109(100), 108(22), 94(3)	NIST
4. Haemanthamin	17,742	331(5), 273(19), 272(100), 242(14), 240(15), 214(15), 212(14), 211(15), 186(13), 181(25), 128(12)	71
5. Galanthin	18,303	317(20), 316(15), 284(10), 268(15), 266(11), 244(14), 243(89), 242(100), 162(10), 125(10)	NIST
6. 9- <i>O</i> -Methylpseudolykorin	18,841	303(25), 302(18), 284(20), 281(11), 268(21), 266(32), 264(12), 243(68), 242(100), 207(25)	76
7. Pseudolykorin	19,139	289(27), 288(14), 270(19), 252(18), 229(69), 228(100), 208(19)	72
8. Homolykorinový typ (patrně hippeastrin)	19,614	281(22), 208(8), 207(46), 191(6), 133(5), 126(8), 125(100), 124(6), 96(41), 73(7)	71

5.1.1.6 *Narcissus* cv. TRENA (AL-462)

Obrázek 22: Chromatogram sumárního extraktu AL-462.



Tabulka 16: Alkaloidy identifikované v sumárním extraktu AL-462.

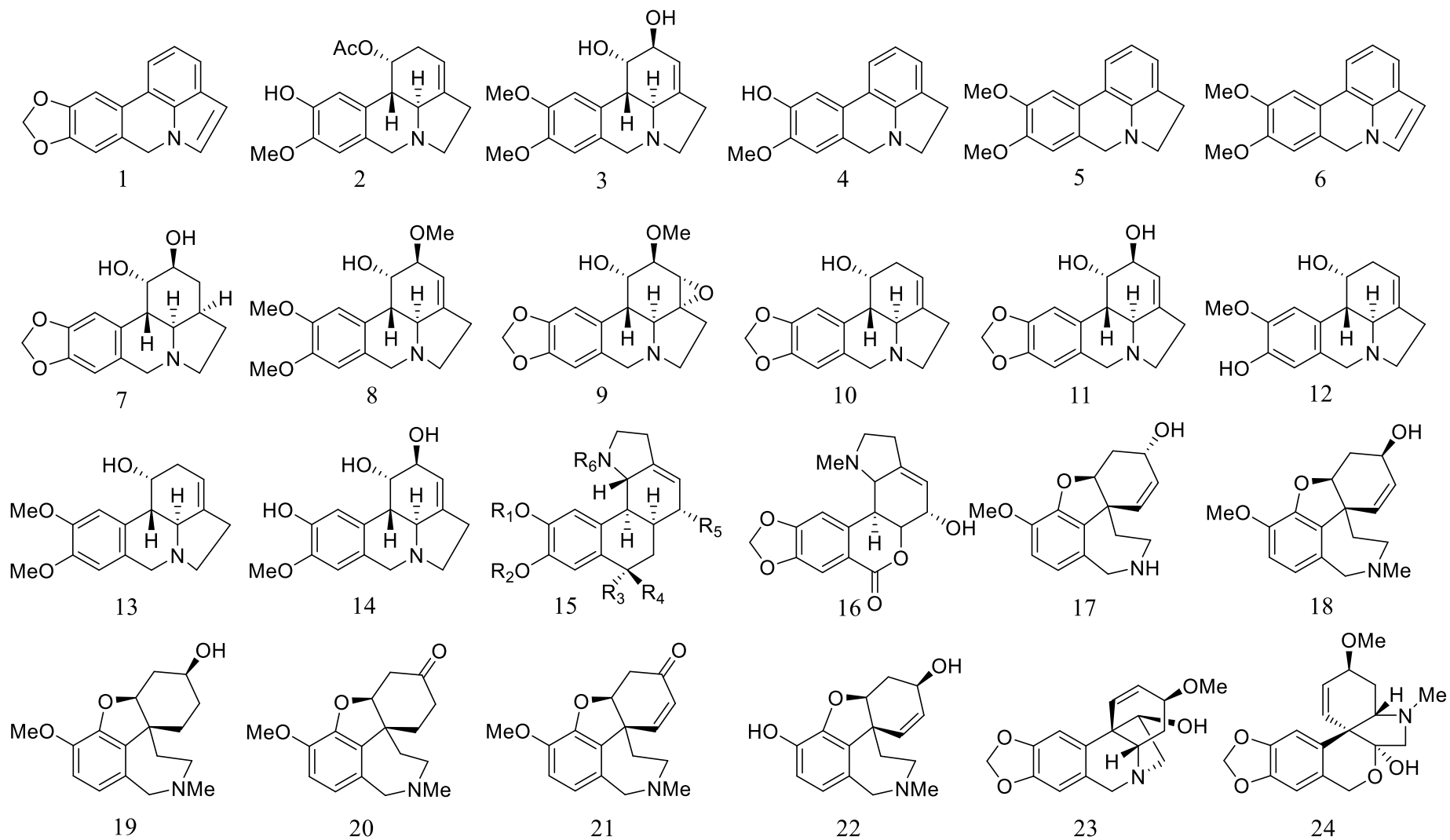
Název alkaloidu	RT [min]	[M+] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzity)	Reference pro MS
1. Dihydrolykorin	16,091	289(34), 288(100), 281(9), 207(25), 202(11), 115(7), 109(30)	NIST
2. Homolykorinový typ	16,508	281(3), 208(2), 207(8), 206.8(2), 191(5), 191(2), 110(8), 109(100), 108(16), 94(2)	NIST
3. Homolykorinový typ	16,657	300(3), 299(4), 281(2), 207(3), 191(8), 110(8), 109(100), 108(17), 94(4)	NIST
4. Homolykorinový typ	16,751	285(4), 281(14), 253(4), 208(6), 207(34), 177(8), 109(100), 108(19), 73(6)	NIST
5. A ₁₀	16,958	329(54), 328(69), 269(39), 268(100), 267(24), 266(48), 254(16), 242(28), 240(24)	-
6. A ₁₁	17,204	287(57), 286(100), 281(32), 270(33), 243(25), 242(74), 241(28), 207(83)	-
7. Pluviin	17,267	287(70), 286(45), 281(11), 270(10), 268(48), 266(22), 243(11), 243(35), 242(100), 207(24)	NIST
8. Assoanin	17,367	268(9), 267(50), 266(100), 264(7), 250(24), 222(8), 207(9), 193(6), 180(6), 109(9)	NIST, ⁷⁶
9. Homolykorinový typ	17,516	281(9), 267(8), 266(7), 265(4), 264(6), 207(18), 191(4), 110(5), 109(100), 108(18)	NIST
10. Homolykorinový typ	17,599	281(21), 267(7), 266(12), 264(9), 248(7), 208(7), 207(34), 109(100), 108(19)	NIST
11. Tazettin	17,850	331(22), 298(16), 248(16), 247(100), 201(16), 181(15), 152(15), 115(19), 71(18), 70(23)	NIST
12. Dehydroassoanin	18,112	265(77), 264(100), 248(15), 225(11), 220(13), 207(42), 191(16), 178(13)	⁷²
13. Homolykorinový typ	18,698	281(2), 207(5), 178(2), 110(8), 109(100), 108(22), 94(3), 93(2), 82(3), 77(1)	NIST
14. Pseudolykorin	19,137	289(27), 288(14), 253(27), 229(69), 228(100), 208(19)	⁷²

5.1.1.7 Tabulka 17: Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech metodou GC-MS.

Strukturní typ	Číslo struktury	Alkaloid	Obsah alkaloidů v sumárním extraktu [%]					
			AL-444	AL-452	AL-453	AL-454	AL-456	AL-462
Lykorinový	1	11,12-Didehydroanhydrolykorin	-	-	<1	-	-	-
	2	1- <i>O</i> -Acetyl-10-norpluviin	-	-	-	2	-	-
	3	9- <i>O</i> -Methylpseudolykorin	-	-	-	-	4	-
	4	Anhydropseudolykorin	-	-	-	<1	-	-
	5	Assoanin	-	-	-	-	-	6
	6	Dehydroassoanin	1	-	-	<1	-	4
	7	Dihydrolykorin	-	-	-	-	-	1
	8	Galanthin	10	-	-	8	77	-
	9	Inkartin	<1	-	-	-	-	-
	10	Karanin	-	-	23	-	-	-
	11	Lykorin	-	-	24	36	-	-
	12	Norpluviin	-	-	<1	-	-	-
	13	Pluviin	-	-	-	-	-	4
	14	Pseudolykorin	-	-	-	-	1	1

Strukturní typ	Číslo struktury	Alkaloid	Obsah alkaloidů v sumárním extraktu [%]					
			AL-444	AL-452	AL-453	AL-454	AL-456	AL-462
Homolykorinový	15	Homolykorinový typ	17	16	3	<1	3	31
	16	Homolykorinový typ (patrně hippeastrin)	< 1	-	<1	3	1	-
Galanthaminový	17	<i>epi</i> -Norgalanthamin	18	-	-	-	-	-
	18	Galanthamin	-	-	33	-	1	-
	19	Lykoramin	-	4	2	3	-	-
	20	Lykoraminon	-	64	-	-	-	-
	21	Narwedín	-	-	<1	-	-	-
	22	Sanguinin	-	-	-	<1	-	-
Haemanthaminový	23	Haemanthamin	42	17	10	35	13	-
Pretazettinový	24	Tazettin	-	-	-	-	-	27

5.1.1.8 Obrázek 23: Přehled struktur izolovaných alkaloidů.



5.1.2 GC-FID

5.1.2.1 Podíl jednotlivých alkaloidů v sumárním extraktu

Tabulka 18: Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech metodou GC-FID.

Kód extraktu	Galanthamin	Tazettin	Haemanthamin	Lykorin
AL-444	4,10088	4,77716	27,11457	13,05374
AL-450	4,29753	3,77191	9,30981	20,38281
AL-452	18,76466	1,96948	10,53096	12,30162
AL-453	24,12672	4,80122	14,75681	31,58931
AL-454	5,76550	12,72482	27,77173	20,94848
AL-456	5,75386	60,15088	14,47098	12,81657
AL-457	10,95177	1,96430	4,04045	6,75680
AL-460	24,99604	3,15978	4,53808	6,45321
AL-462	4,02169	3,68678	13,95034	13,05362
AL-463	25,53757	3,41734	6,00806	37,72298
AL-467	4,69995	4,30526	3,52483	10,14912
AL-508	25,87022	4,78726	10,59698	30,68460

Vysvětlivka k odstupňované barevné škále (množství jednotlivých alkaloidů v sumárním extraktu v %):

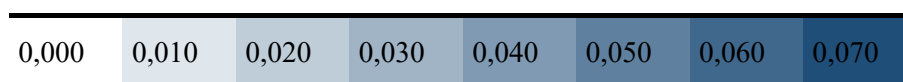
0,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	60,00	70,00
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

5.1.2.2 Procentuální zastoupení daného alkaloidu v extrahovaných cibulích

Tabulka 19: Procentuální zastoupení jednotlivých alkaloidů v cibulích k extrakci.

Kód extraktu	Galanthamin	Tazettin	Haemanthamin	Lykorin
AL-444	0,00243	0,00283	0,01607	0,00774
AL-450	0,00326	0,00286	0,00705	0,01544
AL-452	0,02904	0,00305	0,01630	0,01904
AL-453	0,01394	0,00277	0,00853	0,01826
AL-454	0,01302	0,02873	0,06271	0,04730
AL-456	0,00253	0,02642	0,00636	0,00563
AL-457	0,00979	0,00176	0,00361	0,00604
AL-460	0,01345	0,00170	0,00244	0,00347
AL-462	0,00172	0,00158	0,00597	0,00559
AL-463	0,02360	0,00316	0,00555	0,03487
AL-467	0,00338	0,00309	0,00253	0,00729
AL-508	0,03064	0,00567	0,01255	0,03634

Vysvětlivka k odstupňované barevné škále (množství jednotlivých alkaloidů v celkové hmotnosti cibulí v %):



5.2 Cytotoxická aktivita

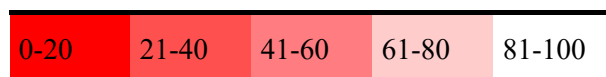
Tabulka 20: Přehled cytotoxické aktivity sumárních alkaloidních extraktů na buněčné linii HepG2. Viabilita buněk byla stanovena po 24hodinovém ovlivnění jednotlivými sumárními extrakty o koncentracích 10 a 50 µg/ml.

Kód extraktu	Viabilita [%] při dané koncentraci	
	10 µg/ml	50 µg/ml
AL-444	44 ± 7	38 ± 5
AL-450	51 ± 4	45 ± 4
AL-452	62 ± 4	42 ± 5
AL-453	48 ± 9	39 ± 5
AL-454	42 ± 8	38 ± 4
AL-456	24 ± 5	20 ± 1
AL-457	40 ± 6	33 ± 3
AL-460	44 ± 6	38 ± 5
AL-462	30 ± 6	21 ± 3
AL-463	53 ± 7	42 ± 8
AL-467	38 ± 3	32 ± 2
AL-508	38 ± 5	27 ± 4

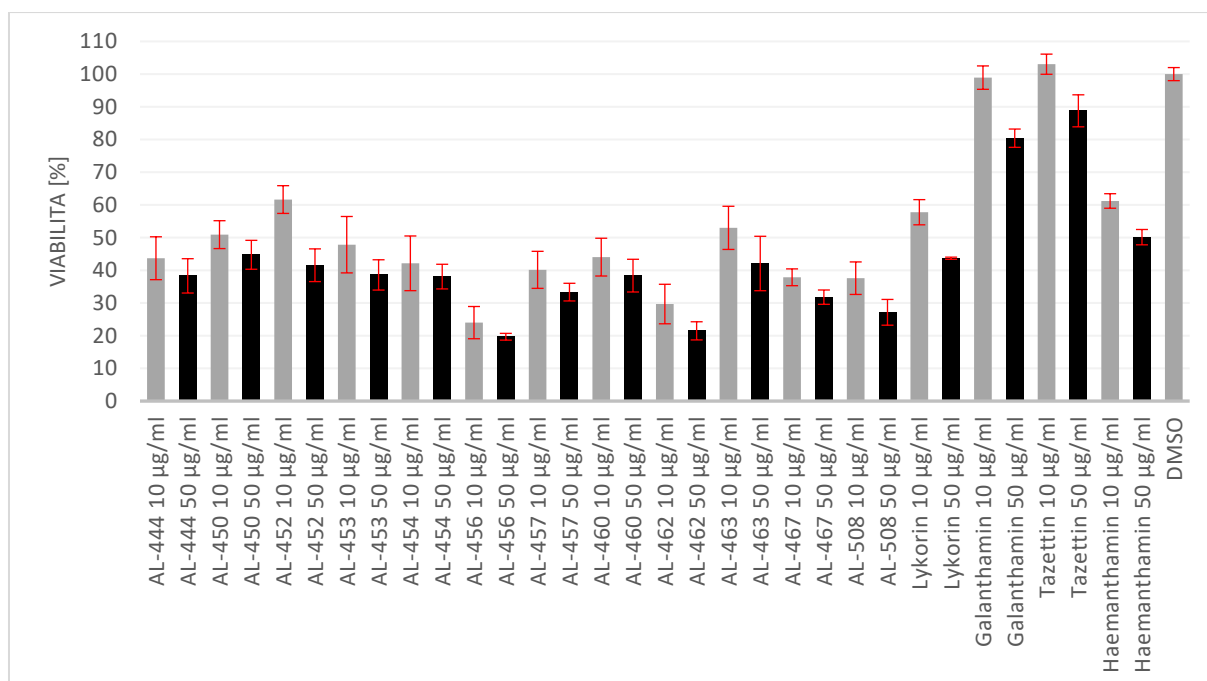
Tabulka 21: Viabilita HepG2 buněk po 24hodinovém ovlivnění konkrétním alkaloidem.

AmA	Viabilita při dané koncentraci [%]		IC ₅₀ [μM]
	10 μg/ml	50 μg/ml	
Lykorin	58 ± 4	44 ± 0	13,77 ± 2,74
Galanthamin	99 ± 4	80 ± 3	<500
Tazettin	103 ± 3	89 ± 5	<500
Haemanthamin	61 ± 2	50 ± 2	83,12 ± 9,13
Doxorubicin HCl	-	-	4,42 ± 0,34

Barevná vysvětlivka k heatmapě tabulek 20 a 21 (% přeživších buněk oproti kontrole po 24hodinové inkubaci):



Obrázek 24: Grafické znázornění výsledků screeningu cytotoxické aktivity.



6 Diskuze a závěr

Tato práce je zaměřena na látky přírodního původu a jejím cílem bylo určit vliv extraktů získaných z různých kultivarů rodu *Narcissus* na viabilitu buněčné linie HepG2. A zároveň z těchto druhů vybrat potenciálně vhodné zdroje pro izolaci jednotlivých majoritních AmA, lykorinu, galantaminu, haemantaminu a tazettinu.

V této práci byly studovány sumární alkaloidní extrakty ze šesti kultivarů rodu *Narcissus* provedením GC-MS analýzy, konkrétně bylo pojednáváno o kultivarech *Narcissus* cv. Cairngorm (AL-444), Dick Wilden (AL-452), Ice King (AL-453), Manly (AL-454), Unique (AL-456), Trena (AL-462). Dalších šest sumárních alkaloidních extraktů (označených AL-450, AL-457, AL-460, AL-463, AL-467 a AL-508) bylo popsáno pomocí GC-MS analýzy v diplomové práci mgr. Beáty Tkáčové¹⁷, kde byla zároveň určena jejich cytotoxická aktivita na panelu 10 buněčných linií, který však nezahrnoval žádnou jaterní buněčnou linii¹⁷. Proto byla v rámci této práce zkoumána cytotoxická aktivita všech 12 sumárních extraktů vůči buněčné linii HepG2 a zároveň bylo všech 12 sumárních extraktů podrobena GC-FID analýze, pomocí níž bylo kvantifikováno zastoupení čtyř majoritních alkaloidů - lykorinu, galanthaminu, haemanthaminu a tazettinu.

V šesti sumárních alkaloidních extraktech bylo pomocí GC-MS analýzy identifikováno celkem 23 alkaloidů. Přičemž 14 alkaloidů (lykorin, galanthin, dihydrolykorin, pseudolykorin, anhydropseudolykorin, 9-*O*-methylpseudolykorin, 11,12-didehydroanhydrolykorin, 1-*O*-acetyl-10-norpluviin, assoanin, dehydroassoanin, inkartin, karantin, norpluviin, pluviin) patří k lykorinovému strukturnímu typu. Zajímavý je fakt, že u kultivaru AL-452 žádný zástupce tohoto strukturního typu nebyl nalezen. Dále byla identifikována řada alkaloidů homolykorinového strukturního typu, v jehož hmotnostním spektru je možno nalézt charakteristický ion s hodnotou m/z 109. Pomocí GC-MS analýzy ovšem nebylo možné homolykorinové alkaloidy přesněji identifikovat, avšak látka obsahující další charakteristický ion m/z 125 může být s vysokou pravděpodobností označena za hippeastrin. Nicméně, pro přesnější určení alkaloidů homolykorinového strukturního typu by bylo potřeba použít šetrnější ionizační metodu, než je elektronová ionizace. Vhodné by bylo například použití ionizace elektrosprejem, která je řazena mezi měkké ionizační techniky. Galanthaminový strukturní typ byl druhým nejčastějším typem identifikovaným v chromatogramech analyzovaných sumárních extraktů a konkrétně byl zastoupen *epi*-norgalanthaminem, galanthaminem, lykoraminem, lykoraminonem, narwedinem a sanguininem. Haemanthaminový

a pretazettinový strukturní typ byly zastoupeny právě jedním, hlavním, zástupcem. Jelikož v posledních letech převažuje názor, že je tazettin pravděpodobně izolačním artefaktem pretazettinu, dá se předpokládat, že se v kultivaru AL-462 namísto tazettinu vyskytoval právě pretazettin³. Další alkaloidy se blíže nepodařilo identifikovat, z charakteristických iontů s hodnotou m/z 315, 329, 341 lze však usuzovat, že se jedná o acetylované deriváty (A_1 , A_6 , A_7 , A_{10}). V mnohých zápisech charakteristických iontů se vyskytuje hodnota m/z 207, navíc je často zastoupena ve vysoké intenzitě v porovnání s ostatními hodnotami. Toto může být pravděpodobně způsobeno krvácením kolony a uvolňováním nečistot – zejména siloxanů.

Inhibice růstu nádorových buněk je jednou z hlavních intenzivně studovaných biologických aktivit AmA. Nejvýznamněji se projevuje u alkaloidů lykorinového, haemanthaminového a narciklasinového strukturního typu³.

Haemanthamin vykazuje silnou inhibiční aktivitu vůči růstu značného množství k apoptóze senzitivních i rezistentních buněčných linií³⁴. Sumární extrakt AL-444 s majoritním množstvím haemanthaminu mírně inhiboval růst HepG2 buněk, což odpovídalo i naměřené aktivitě samotného haemanthaminu ($IC_{50} = 83 \pm 9 \mu M$). Tato mírná aktivita však nekorresponduje s hodnotami v literatuře – například studie z roku 2012 udává pro haemanthamin aktivitu výrazně vyšší ($IC_{50} = 4,8 \mu M$). Množství nasazených buněk ve zmíněné studii bylo stejné (10^4 /jamka), ale doba expozice buněk vůči působení haemanthaminu byla 48 hodin místo našich 24⁵⁵. Pro lepší porovnání aktivity s výsledky v literatuře by bylo potřeba provést stanovení i v tomto delším časovém intervalu.

Selektivita lykorinu je předmětem vědeckého zájmu. Některé práce či studie uvádí velmi nízkou selektivitu vůči zdravým buňkám^{6,77}, jiné naopak popisují jeho specifickou selektivitu vůči zdravým B-lymfocytům, fibroblastům, buňkám prostaty, prsu, mléčných žláz, urotelu, a i vůči darovaným zdravým plazmatickým buňkám^{36,39,78,79}. V roce 2022 byl dokonce publikován přehledový článek věnující se lykorinem zprostředkované orgánové ochraně⁸⁰. Lykorin je v mnoha druzích a kultivarech rodu *Narcissus* majoritním alkaloidem, což bylo potvrzeno i v této studii, kdy byl v abundantním množství obsažen v sumárních extraktech AL-450, AL-453, AL-463 a AL-508. Zejména extrakt AL-508 pak vykázal vyšší aktivitu vůči buněčné linii HepG2 a snížil její viabilitu výrazněji než většina ostatních sledovaných extraktů, což odpovídá inhibiční aktivitě naměřené u samotného lykorinu ($IC_{50} = 13,8 \pm 2,7 \mu M$), ačkoliv i tato byla přibližně 10× vyšší než u většiny linií dříve testovaných na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky FaF UK, kde se obvykle IC_{50} pohybovala okolo $1 \mu M$ ⁸¹. Vyjma

AL-453 byly tyto sumární extrakty dříve testovány na panelu 9 nádorových buněčných linií, kde jevíly poměrně vysokou cytotoxickou aktivitu, avšak všechny tři extrakty byly toxické i pro zdravou linii MRC-5. V tomto případě tedy extrakty s majoritním zastoupením lykorinu specifickou selektivitu nejevily¹⁷.

Lykorin spolu s haemanthaminem byly v majoritních množstvích obsaženy v sumárním extraktu AL-454, jenž by tak teoreticky měl vykazovat jednu z nejvyšších cytotoxických aktivit^{34,36,55,56}. V našem experimentu však extrakt AL-454 vykázal pouze mírnou aktivitu vůči linii HepG2, kdy při použití obou testovaných koncentrací snížil viabilitu buněk na přibližně 40 %. Tento rozdíl může být dán i tím, že tento extrakt obsahuje řadu alkaloidů, které se nepodařilo pomocí GC-MS analýzy určit. Nevíme tudíž, zda jde o látky disponující cytotoxickou aktivitou či nikoliv.

Sumární extrakt AL-452 dle GC-MS neobsahoval žádný AmA lykorinového strukturního typu, ačkoli pomocí GC-FID bylo vyhodnoceno, že samotný lykorin je v sumárním extraktu v 12% zastoupení. Důvodem tohoto rozporu může být zejména špatná ionizace lykorinu. I přes fakt, že extrakt obsahoval značné množství alkaloidů galanthaminového strukturního typu, které všeobecně nevykazují žádnou významnou protinádorovou aktivitu^{3,81}, což bylo dokázáno i v této práci (IC_{50} galanthaminu < 500 μ M), měl tento extrakt mírný inhibiční efekt na viabilitu HepG2 buněčné linie, což je pravděpodobně dáno obsahem nezanedbatelného množství haemanthaminu (10,53 %) a lykorinu..

Alkaloidy homolykorinového strukturního typu byly dle GC-MS analýzy významně zastoupeny v extraktu AL-467. Dle posledních studií homolykorin samotný není výrazně cytotoxický⁶, ale bez další analýzy zahrnující měkkou ionizační techniku nebo izolaci a důkladnou strukturní analýzu a identifikaci získaných látek není možné přesně určit, které AmA mohou být za tuto aktivitu zodpovědné, ačkoliv jsou v tomto sumárním extraktu obsaženy i lykorin a haemanthamin, které mohou toxicitu extraktu zvyšovat.

Sumární extrakt AL-460 obsahoval velké množství galanthaminu, menší množství AmA lykorinového strukturního typu, konkrétně jako jediný obsahoval norpluviin (3 % dle GC-MS)¹⁷. Pluviin ani norpluviin ovšem nejsou předmětem zájmu z hlediska cytotoxického působení⁸², nelze tedy určit jejich podíl na mírné cytotoxicitě sumárního extraktu AL-460, AL-453 a mírně vyšší cytotoxicitě sumárního extraktu AL-462.

Výsledky GC-MS analýzy sumárních alkaloidních extraktů AL-456, AL-457 a AL-462 nekorelovaly zcela s výsledky GC-FID, konkrétně obsah tazettinu v extraktu

AL-456 nebyl v GC-MS identifikován, zatímco pomocí GC-FID měl zastoupení 60 %, extrakt AL-457 jevil pomocí GC-FID nižší zastoupení haemanthaminu, extrakt AL-462 dle GC-MS obsahoval v majoritním množství tazettin, zatímco dle GC-FID obsahoval zejména haemanthamin a lykorin. Tyto výsledky mohou být způsobeny rozdílnou schopností ionizace jednotlivých alkaloidů při GC-MS.

Sumární extrakt AL-456 jevil nejvyšší cytotoxickou aktivitu vůči linii HepG2. Vzhledem k majoritnímu zastoupení lykorinového strukturního typu AmA (82 % dle GC-MS) a abundantnímu zastoupení haemanthaminu (13 % dle GC-MS) byla tato aktivita očekávána, teoreticky mohla být podpořena synergickým efektem těchto dvou strukturních typů AmA.

Bylo zjištěno, že na obsah alkaloidů v cibulích má vliv nejen lokalita, ve které jedinec rodu *Narcissus* vyrostl, ale také stáří cibule (významné zejména u galanthaminu). Faktem je, že v různých obdobích růstového cyklu rostlin jsou vytvářeny různé metabolity. Proto je zejména u galanthaminu z ekonomického hlediska důležité určit optimální časový bod pro sklizeň během růstovém cyklu, galanthamin měl nejvyšší výtěžnost z dvouletých cibulí, zatímco haemanthamin ze tříletých⁸³. Jelikož stáří cibulí nebylo v našem experimentu známo, mohla by být tato problematika zajímavým podnětem k dalšímu zkoumání.

Kultivary rodu *Narcissus* jsou sice primárně šlechtěny pro okrasné účely, ale zároveň jsou bohatým zdrojem AmA, které díky rozsáhlému zkoumání jejich biologických aktivit dostávají ve světě moderní medicíny více a více prostoru. S ohledem na celosvětově vysokou incidenci nádorových onemocnění více či méně rezistentních vůči dnes dostupné terapii je i nadále nutné studovat tyto potenciálně antineoplasticky působící sloučeniny přírodního původu pro případné doplnění portfolia používaných látek, stejně tak jako pro obsah jednotlivých AmA.

7 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky (16-16230)

Řešitel: Aneta Maršálková

Vedoucí práce: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

Název práce: Cytotoxická aktivita vybraných kultivarů rodu *Narcissus in vitro*.

Klíčová slova: *Narcissus*, amarylkovité alkaloidy, cytotoxicita, HepG2

Cílem této práce byl screening sumárních alkaloidních extraktů vybraných kultivarů rodu *Narcissus* s ohledem na cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii HepG2 karcinomu jater, screening cytotoxické aktivity majoritně zastoupených Amaryllidaceae alkaloidů (AmA), u kterých byla následně stanovena hodnota IC₅₀ a GC-MS a GC-FID kvalitativní a kvantitativní analýza daných extraktů.

Pomocí GC-MS analýzy bylo porovnáváním hmotnostních spekter z šesti kultivarů identifikováno celkem 23 alkaloidů, konkrétně 11,12-didehydroanhydrolykorin, 1-*O*-acetyl-10-norpluviin, 9-*O*-methylpseudolykorin, anhydropseudolykorin, assoanin, dehydroassoanin, dihydrolykorin, *epi*-norgalanthamin, galanthamin, galanthin, haemanthamin, hippeastrin, inkartin, karanin, lykoramin, lykoraminon, lykorin, narwedín, norpluviin, pluviin, pseudolykorin, sanguinin, tazettin a několik konkrétněji neurčených alkaloidů homolykorinového strukturního typu. Studované extrakty byly dále podrobeny GC-FID analýze s cílem kvantifikovat majoritně zastoupené AmA – galanthamin, haemanthamin, lykorin a tazettin.

Při screeningu cytotoxické aktivity jevil nejvyšší inhibiční aktivitu vůči HepG2 buněčné linii karcinomu jater sumární alkaloidní extrakt AL-456 z *Narcissus* cv. Unique. Vzhledem k majoritnímu zastoupení lykorinového strukturního typu AmA (82 % dle GC-MS) a abundantnímu zastoupení haemanthaminu (13 % dle GC-MS) byla dle literatury tato aktivita očekávána. Ze stanovení cytotoxické aktivity jednotlivých AmA jevil nejvyšší aktivitu lykorin (IC₅₀ = 13,8 ± 2,7 μM). Oproti tomu u galanthaminu a tazettinu nebyla víceméně žádná cytotoxická aktivita nalezena, což je v souladu s faktem, že je dnes galanthamin používán v klinické praxi pro léčbu demence Alzheimerova typu.

8 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany (16-16230)

Author: Aneta Maršálková

Supervisor: PharmDr. Kateřina Hradiská Breiterová, Ph.D.

Title of thesis: Cytotoxic activity of selected *Narcissus* cultivars *in vitro*.

Key words: *Narcissus*, Amaryllidaceae alkaloids, cytotoxicity, HepG2

The main focus of this diploma thesis is the screening of summary alkaloidal extracts of selected cultivars of the genus *Narcissus* for their cytotoxic activity against HepG2 liver carcinoma cell line. In the second phase, the cytotoxic activity of the majorly represented Amaryllidaceae alkaloids (AmA) was screened, followed by an IC₅₀ value determination. All studied alkaloidal extracts underwent also GC-MS and GC-FID qualitative and quantitative analysis to identify as many alkaloids as possible.

A total of 23 alkaloids, namely 11,12-didehydroanhydrolycorine, 1-*O*-acetyl-10-norpluviine, 9-*O*-methylpseudolycorine, anhydropseudolycorine, assoanine, dehydroassoanine, dihydrolycorine, *epi*-norgalanthamine, galanthamine, galanthine, haemanthamine, hippeastrine, incartine, caranine, lycoramine, lycoramnone, lycorine, narwedine, norpluviine, pluviine, pseudolycorine, sanguinine, tazettine and several unspecified alkaloids of the homolycorine structural type were identified using GC-MS analysis by comparing the mass spectra obtained from six of examined cultivars. All studied extracts were further subjected to GC-FID analysis to quantify the majorly represented AmA – galanthamine, haemanthamine, lycorine and tazettine.

The highest inhibitory activity against HepG2 cell line was exhibited by the summary alkaloidal extract AL-456 from *Narcissus* cv. Unique. Considering the major representation of the lycorine structural type AmA (82 % by GC-MS) and the abundant representation of haemanthamine (13 % by GC-MS), this activity was expected. In the determination of cytotoxic activity of individual AmA, lycorine showed the highest activity (IC₅₀ = 13.8 ± 2.7 μM). On the contrary, almost no cytotoxic activity was found for galanthamine and tazettine, which is consistent with the fact that galanthamine has been used in clinical practice for the treatment of Alzheimer-type dementia.

9 Literatura

- 1 B. B. Petrovska, Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacogn Rev*, 2012, **6**, 1–5.
- 2 D. J. Newman a G. M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, 2020, **83**, 770–803.
- 3 S. Berkov, E. Osorio, F. Viladomat a J. Bastida, Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids, *Alkaloids Chem Biol*, 2020, **83**, 113–185.
- 4 Zdravotnická ročenka České republiky 2021 - ÚZIS ČR. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8435>, (cit. 2023-07-28).
- 5 X. Wang, H. Zhang a X. Chen, Drug resistance and combating drug resistance in cancer, *Cancer Drug Resist.*, 2019, **2**, 141–160.
- 6 K. Breiterová, D. Koutová, J. Maříková, R. Havelek, J. Kuneš, M. Majorošová, L. Opletal, A. Hošťálková, J. Jenčo, M. Řezáčová a L. Cahlíková, Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity, *Plants*, 2020, **9**, 137.
- 7 J. J. Nair a J. Van Staden, The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles, *South African Journal of Botany*, 2021, **136**, 157–174.
- 8 J. Strítěský, *Patologie*, Epava, Olomouc, Vyd. 1., 2001.
- 9 Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy, Genotoxicita a karcinogeneze, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html, (cit. 2023-05-05).
- 10 J. Mačák, *Patologie*, Grada, Praha, 3., doplněné a přepracované vydání., 2022.
- 11 G. R. Hanks, in *Narcissus and daffodil: the genus Narcissus*, Taylor & Francis, New York, London, 2002.
- 12 S. McDonald, *The International Daffodil Register & Classified List (2008) Fifth Supplement*, The Royal Horticultural Society, vol. 2008.
- 13 J. Štěpánková, Z. Kaplan, P. Batoušek a J. Chrtek, *Květena České republiky. 8*, Academia, Praha, Vyd. 1., 2010.

- 14 Z. Kaplan, *Klíč ke květeně České republiky*, Academia, Praha, Druhé, aktualizované a zcela přepracované vydání., 2019.
- 15 S. W. Graham a S. C. H. Barrett, Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae), *Am J Bot*, 2004, **91**, 1007–1021.
- 16 Angiosperm Phylogeny Website. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, (cit 2022-11-18).
- 17 B. Tkáčová, Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2020.
- 18 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Cairngorm&pagenum1=1&which=hist1&lang=en-US>, (cit. 2023-07-25).
- 19 J. H. bloembollen specialist, X 100 *Narcissus* Cairngorm 12/14. Dostupné z: <https://www.jubholland.nl/en/webshop/spring-flowering/landscape/x-100-narcissus-cairngorm-12/14>, (cit. 2023-07-25).
- 20 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Dick%20Wilden>, (cit. 2023-07-25).
- 21 Daffodil Dick Wilden - *Narcissus* - Flowers and Fillers - Flowers by category, Sierra Flower Finder. Dostupné z: <http://www.sierraflowerfinder.com/en/d/daffodil-dick-wilden/8965>, (cit. 2023-07-25).
- 22 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Ice%20King>, (cit. 2023-07-25).
- 23 Ice King Daffodil. Dostupné z: <https://www.veseys.com/ca/ice-king-daffodil-71012.html>, (cit. 2023-07-25).
- 24 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Manly>, (cit.2023-07-25).
- 25 MijnWinkel, Daffodil Manly. Dostupné z: https://www.youtulip.co.uk/spring_blooming/21296--daffodil-manly.html, (cit. 2023-07-25).
- 26 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Unique>, (cit. 2023-07-25).
- 27 *Narcissus* ‘Unique’ 4W-YWW. Dostupné z: <https://www.ivydenegardens.co.uk/Bulb%20Narcissus%20Gallery/nd4unique.html>, (cit. 2023-07-25).

- 28 DaffSeek. Dostupné z: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Trena>, (cit. 2023-07-25).
- 29 2020-North-Island-National-Show-Results – National Daffodil Society NZ. Dostupné z: <https://daffodil.org.nz/2020-north-island-national-show-results/>, (cit. 2023-07-25).
- 30 S. Ka, M. Koirala, N. Mérindol a I. Desgagné-Penix, Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids, *Molecules*, 2020, **25**, 4901.
- 31 A. Kornienko a A. Evidente, Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 1982–2014.
- 32 D. Hulcová, Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
- 33 J. J. Nair, J. Bastida, F. Viladomat a J. van Staden, Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids, *Nat Prod Commun*, 2012, **7**, 1677–1688.
- 34 G. Van Goietsenoven, A. Andolfi, B. Lallemand, A. Cimmino, D. Lamoral-Theys, T. Gras, A. Abou-Donia, J. Dubois, F. Lefranc, V. Mathieu, A. Kornienko, R. Kiss a A. Evidente, Amaryllidaceae Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells, *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, 1223–1227.
- 35 S. A. R. Sancha, A. V. Gomes, J. B. Loureiro, L. Saraiva a M. J. U. Ferreira, Amaryllidaceae-Type Alkaloids from *Pancratium maritimum*: Apoptosis-Inducing Effect and Cell Cycle Arrest on Triple-Negative Breast Cancer Cells, *Molecules*, 2022, **27**, 5759.
- 36 M. Roy, L. Liang, X. Xiao, P. Feng, M. Ye a J. Liu, Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, **107**, 615–624.
- 37 J. McNulty, J. J. Nair, J. Bastida, S. Pandey a C. Griffin, Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells, *Phytochemistry*, 2009, **70**, 913–919.
- 38 X. Ying, A. Huang, Y. Xing, L. Lan, Z. Yi a P. He, Lycorine inhibits breast cancer growth and metastasis via inducing apoptosis and blocking Src/FAK-involved pathway, *Sci China Life Sci*, 2017, **60**, 417–428.

- 39 D. Lamoral-Theys, A. Andolfi, G. Van Goietsenoven, A. Cimmino, B. Le Calvé, N. Wauthoz, V. Mégalizzi, T. Gras, C. Bruyère, J. Dubois, V. Mathieu, A. Kornienko, R. Kiss a A. Evidente, Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight, *J Med Chem*, 2009, **52**, 6244–6256.
- 40 W. Liu, Q. Tang, Q. Zhang, C. Hu, J. Huang, F. Sheng, Y. Liu, M. Zhou, W. Lai, G. Li a R. Zhang, Lycorine Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Hepatoblastoma HepG2 Cells Through ROCK1 Activation, *Front Pharmacol*, 2019, **10**, 651.
- 41 Y. Li, J. Liu, L.-J. Tang, Y.-W. Shi, W. Ren a W.-X. Hu, Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest, *Oncol Rep*, 2007, **17**, 377–384.
- 42 V. Mathieu, B. Laguera, M. Masi, S. A. Dulanto, T. W. Bingham, L. W. Hernandez, D. Sarlah, A. Evidente, D. L. J. Lafontaine, A. Kornienko a M. A. Lane, Amaryllidaceae Alkaloids Decrease the Proliferation, Invasion, and Secretion of Clinically Relevant Cytokines by Cultured Human Colon Cancer Cells, *Biomolecules*, 2022, **12**, 1267.
- 43 G. Ceriotti, Narciclasine: an antimetabolic substance from *Narcissus* bulbs, *Nature*, 1967, **213**, 595–596.
- 44 R. Fürst, Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties, *Planta Med*, 2016, **82**, 1389–1394.
- 45 G. R. Pettit, R. Tan, G.-H. Bao, N. Melody, D. L. Doubek, S. Gao, J.-C. Chapuis a L. Williams, Antineoplastic agents. 587. Isolation and structure of 3-epipancratistatin from *Narcissus* cv. Ice Follies, *J Nat Prod*, 2012, **75**, 771–773.
- 46 P. Dumont, L. Ingrassia, S. Rouzeau, F. Ribaucour, S. Thomas, I. Roland, F. Darro, F. Lefranc a R. Kiss, The Amaryllidaceae Isocarbostryl Narciclasine Induces Apoptosis By Activation of the Death Receptor and/or Mitochondrial Pathways in Cancer Cells But Not in Normal Fibroblasts, *Neoplasia*, 2007, **9**, 766–776.
- 47 N. Garreau de Loubresse, I. Prokhorova, W. Holtkamp, M. V. Rodnina, G. Yusupova a M. Yusupov, Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome, *Nature*, 2014, **513**, 517–522.

- 48 F. Lefranc, S. Sauvage, G. Van Goietsenoven, V. Mégalizzi, D. Lamoral-Theys, O. Debeir, S. Spiegl-Kreinecker, W. Berger, V. Mathieu, C. Decaestecker a R. Kiss, Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, **8**, 1739–1750.
- 49 A. Evidente, A. S. Kireev, A. R. Jenkins, A. E. Romero, W. F. A. Steelant, S. Van slambrouck a A. Kornienko, Biological Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and their Synthetic Derivatives: Discovery of Novel Leads for Anticancer Drug Design, *Planta Med*, 2009, **75**, 501–507.
- 50 K. Habartová, L. Cahlíková, M. Řezáčová a R. Havelek, The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity, *Nat Prod Commun*, 2016, **11**, 1587–1594.
- 51 N. Kekre, C. Griffin, J. McNulty a S. Pandey, Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, **56**, 29–38.
- 52 D. Koutová, R. Havelek, E. Peterová, D. Muthná, K. Královec, K. Breiterová, L. Cahlíková a M. Řezáčová, Pancracine, a Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloid, Inhibits Proliferation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells and Induces Apoptotic Cell Death in MOLT-4 Leukemic Cells, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**, 7014.
- 53 J. C. Cedrón, Á. G. Ravelo, L. G. León, J. M. Padrón a A. Estévez-Braun, Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids, *Molecules*, 2015, **20**, 13854–13863.
- 54 L. Cahlíková, I. Kawano, M. Řezáčová, G. Blunden, D. Hulcová a R. Havelek, The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs, *Phytochem Rev*, 2021, **20**, 303–323.
- 55 Z. Luo, F. Wang, J. Zhang, X. Li, M. Zhang, X. Hao, Y. Xue, Y. Li, F. D. Horgen, G. Yao a Y. Zhang, Cytotoxic Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes candida*, *J Nat Prod*, 2012, **75**, 2113–2120.
- 56 G. Luchetti, R. Johnston, V. Mathieu, F. Lefranc, K. Hayden, A. Andolfi, D. Lamoral-Theys, M. R. Reisenauer, C. Champion, S. C. Pelly, W. A. L. van Otterlo, I. V. Magedov, R. Kiss, A. Evidente, S. Rogelj a A. Kornienko, Bulbispermine: A Crinine-Type

- Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity towards Apoptosis-Resistant Glioma Cells, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 815–822.
- 57 M. Hroch, S. Mičuda, R. Havelek, J. Cermanová, L. Cahlíková, A. Hošťálková, D. Hulcová a M. Řezáčová, LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study, *Biomedical Chromatography*, 2016, **30**, 1083–1091.
- 58 S. Pellegrino, M. Meyer, C. Zorbas, S. A. Bouchta, K. Saraf, S. C. Pelly, G. Yusupova, A. Evidente, V. Mathieu, A. Kornienko, D. L. J. Lafontaine a M. Yusupov, The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth, *Structure*, 2018, **26**, 416-425.e4.
- 59 A. Tarakemeh, M. Azizi, V. Rowshan, H. Salehi, R. Spina, F. Dupire, H. Arouie a D. Laurain-Mattar, Screening of Amaryllidaceae alkaloids in bulbs and tissue cultures of *Narcissus papyraceus* and four varieties of *N. tazetta*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, **172**, 230–237.
- 60 H. M. Fales a W. C. Wildman, Biological Intercversions in the Amaryllidaceae. I. The Haemanthamine-Haemanthidine-Tazettine Sequence, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 294–295.
- 61 M. Masi, L. V. Frolova, X. Yu, V. Mathieu, A. Cimmino, A. De Carvalho, R. Kiss, S. Rogelj, A. Pertsemliadis, A. Kornienko a A. Evidente, Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla* quail, with activity against drug-resistant cancer, *Fitoterapia*, 2015, **102**, 41–48.
- 62 M. Jitsuno, A. Yokosuka, K. Hashimoto, O. Amano, H. Sakagami a Y. Mimaki, Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic activities, *Nat Prod Commun*, 2011, **6**, 187–192.
- 63 R. Havelek, M. Seifrtova, K. Kralovec, L. Bruckova, L. Cahlikova, M. Dalecka, J. Vavrova, M. Rezacova, L. Opletal a Z. Bilkova, The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells, *Phytomedicine*, 2014, **21**, 479–490.
- 64 J. J. Nair a J. Van Staden, Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae, *South African Journal of Botany*, 2021, **136**, 147–156.

- 65 A. Jimenez, A. Santos, G. Alonso a D. Vazquez, Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1976, **425**, 342–348.
- 66 I. Zupkó, B. Réthy, J. Hohmann, J. Molnár, I. Ocsosvzki a G. Falkay, Antitumor Activity of Alkaloids Derived from Amaryllidaceae Species, *In Vivo*, 2009, **23**, 41–48.
- 67 E. R. Cole, J. P. de Andrade, J. F. A. Filho, E. F. P. Schmitt, A. Alves-Araújo, J. Bastida, D. C. Endringer, W. de S Borges a V. Lacerda, Cytotoxic and Genotoxic Activities of Alkaloids from the Bulbs of *Griffinia gardneriana* and *Habranthus itaobinus* (Amaryllidaceae), *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, **19**, 707–717.
- 68 D. A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, Cengage Learning, Boston, seventh edition., 2018.
- 69 F. Denizot a R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods*, 1986, **89**, 271–277.
- 70 J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin a A. Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem*, 2012, **114**, 785–796.
- 71 L. Cahlikova, M. Locarek, N. Benesova, R. Kucera, J. Chlebek, Z. Novak a L. Opletal, Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid, *Nat. Prod. Commun.*, 2013, **8**, 781–785.
- 72 A. S. de Queiroz Souza, J. A. Costa de Sousa, C. S. Pinto, E. G. Alves Filho, R. de C. Alves Pereira, E. S. de Brito, K. M. Canuto a L. K. Almeida Moreira Leal, Untargeted GC/MS-based approach for identification of anti-inflammatory alkaloids from *Hippeastrum elegans* (Amaryllidaceae) using a human neutrophil model, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2021, **199**, 114061.
- 73 N. B. Pigni, S. Ríos-Ruiz, V. Martínez-Francés, J. J. Nair, F. Viladomat, C. Codina a J. Bastida, Alkaloids from *Narcissus serotinus*, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 1643–1647.
- 74 M. Kreh, R. Matusch a L. Witte, Acetylated Alkaloids from *Narcissus-Pseudonarcissus*, *Phytochemistry*, 1995, **40**, 1303–1306.
- 75 N. Rivero, M. Gomez a J. D. Medina, Search for bioactive alkaloids in *Hymenocallis* species, *Pharm. Biol.*, 2004, **42**, 280–285.

- 76 A. Emir, C. Emir, B. Bozkurt a N. Ünver Somer, GC/MS Analysis of Alkaloids in *Galanthus fosteri* Baker and Determination of Its Anticholinesterase Activity, *Turk J Pharm Sci*, 2020, **17**, 36–42.
- 77 B. Weniger, L. Italiano, J. Beck, J. Bastida, S. Bergonon, C. Codina, A. Lobstein a R. Anton, Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids, *Planta Med.*, 1995, **61**, 77–79.
- 78 M. He, C. Qu, O. Gao, X. Hu a X. Hong, Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 16562–16574.
- 79 I. Doskočil, A. Hošťálková, M. Šafratová, N. Benešová, J. Havlík, R. Havelek, J. Kuneš, K. Královec, J. Chlebek a L. Cahlíková, Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells, *Phytochemistry Letters*, 2015, **13**, 394–398.
- 80 H. Xiao, X. Xu, L. Du, X. Li, H. Zhao, Z. Wang, L. Zhao, Z. Yang, S. Zhang, Y. Yang a C. Wang, Lycorine and organ protection: Review of its potential effects and molecular mechanisms, *Phytomedicine*, 2022, **104**, 154266.
- 81 K. Breiterová, Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
- 82 Y. R. Boshra, J. R. Fahim, A. N. E. Hamed a S. Y. Desoukey, Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): A review, *South African Journal of Botany*, 2022, **146**, 437–458.
- 83 M. N. Akram, R. Verpoorte a B. Pomahačová, Effect of bulb age on alkaloid contents of *Narcissus pseudonarcissus* bulbs, *South African Journal of Botany*, 2021, **136**, 182–189.