

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva

Alkaloids of family Amaryllidaceae and their analogues as potential drugs

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

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, srpen 2016

Zuzana Kavková

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

Hradec Králové, srpen 2016

.....

podpis

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 295.

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, poskytnuté materiály a vstřícný přístup a pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Jirímu Kunešovi, CSc. za změření strukturních charakteristik neznámých látek. Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc., plk. doc. PharmDr. Danieli Junovi, Ph.D., Ing. Ivu Doskočilovi, RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabínové za změření biologických aktivit připravených alkaloidů. V neposlední řadě děkuji kolegům z laboratoře a ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření skvělých podmínek při práci v laboratoři.

OBSAH:

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae	9
3.1.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů	10
3.1.2. Strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů.....	13
3.1.2.1. Norbelladinový typ	13
3.1.2.2. Lykorinový typ	14
3.1.2.3. Homolykorinový typ	15
3.1.2.4. Galanthaminový typ.....	15
3.1.2.5. Haemanthaminový a krininový typ	16
3.1.2.6. Pankratistatinový typ.....	17
3.1.2.7. Tazettinový typ	17
3.1.2.8. Montaninový typ.....	18
3.2. Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a jejich syntetických derivátů	20
3.2.1. Protinádorová aktivita	20
3.2.1.1. Lykorinový typ	20
3.2.1.2. Haemanthaminový a krininový typ	22
3.2.1.3. Pankratistatinový typ.....	25
3.2.1.4. Tazettinový typ	26
3.2.1.5. Homolykorinový typ	26
3.2.2. Anticholinergní aktivita.....	27
3.2.2.1. Galanthaminový typ.....	27
3.2.2.2. Lykorinový typ	29
3.2.2.3. Haemanthaminový a krininový typ	30
3.2.2.4. Inhibice prolyloligopeptidasy	31
3.2.3. Antibakteriální aktivita.....	32
3.2.4. Antimalarická aktivita.....	34
3.3. Deriváty amarylkovitých alkaloidů vyvolávající cytotoxicitu	36
3.3.1. Lykorinové deriváty.....	36
3.3.2. Haemanthaminové a krininové deriváty.....	38
3.3.3. Deriváty pankratistatinu a narciklasinu	39

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1. Materiál, chemikálie a metody	43
4.1.1. Amaryllidaceae alkaloidy	43
4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla	43
4.1.3. Materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii	43
4.1.4. Vyvíjecí soustavy pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii	44
4.1.5. Strukturní analýza připravených derivátů	44
4.1.5.1. GC-MS analýza	44
4.1.5.2. ESI-MS analýza	44
4.1.5.3. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza)	45
4.1.5.4. NMR analýza	45
4.1.5.5. Optická otáčivost	45
4.1.6. Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin	46
4.1.6.1. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE	46
4.1.6.2. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči POP	46
4.1.6.3. Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů	46
4.2. Přípravy syntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidů a jejich strukturní identifikace	47
4.2.1. Syntéza a strukturní analýza derivátů haemanthaminu	47
4.2.1.1. Příprava 11- <i>O</i> -acetylhaemanthaminu (LC-6)	47
4.2.1.2. Příprava 11- <i>O</i> -propionylhaemanthaminu (LC-12)	49
4.2.1.3. Příprava 11- <i>O</i> -isobutyrylhaemanthaminu (LC-11)	51
4.2.1.4. Příprava apohaemanthaminu (LC-25)	53
4.2.2. Syntéza a strukturní analýza derivátů haemanthidinu	56
4.2.2.1. Příprava 6,11-di- <i>O</i> -acetylhaemanthidinu (LC-4)	56
4.2.3. Syntéza a strukturní analýza derivátů lykorinu	59
4.2.3.1. Příprava 1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorinu (LC-20)	59
4.2.3.2. Příprava 1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorinu (LC-37)	63
4.2.3.3. Příprava 1,2-di- <i>O</i> -isobutyryllykorinu (LC-38)	67
5. VÝSLEDKY	71
5.1. Příprava polosyntetických derivátů	71
5.2. Screening biologických aktivit	71
5.2.1. Inhibiční aktivity vůči AChE, BuChE a POP	71
5.2.2. Protinádorová aktivita	72
5.2.3. Stanovení cytotoxicity za využití metody xCELLigence	73

6. DISKUZE A ZÁVĚR	75
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	77
8. PŘEHLED OBRÁZKŮ.....	84
9. PŘEHLED TABULEK	86
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	87

1. ÚVOD

Rostliny byly od dávnověku využívány pro své účinky na lidské tělo v tradičním léčitelství a medicíně. Dnes dokážeme mnohá tajemství účinnosti rostlin odhalit, získat obsahové látky ve vysoké koncentraci nebo je synteticky připravit. Rostliny tak představují bohatý zdroj nových látek s vysokým potenciálem pro využití v moderní medicíně.

Velkou skupinou takových látek jsou i sekundární metabolity rostlin čeledi Amaryllidaceae, tzv. amarylkovité alkaloidy. Ty jsou především známy díky galanthaminu, alkaloidu, který byl v roce 2001¹ zaveden do klinické praxe v terapii Alzheimerovy choroby. Díky strukturním odlišnostem vycházejících z jejich biosyntetické cesty, se amarylkovité alkaloidy dělí do několika strukturních typů. Zajímavou vlastností těchto látek je, že často bývá určitý strukturní typ spjat s určitou biologickou aktivitou. Tak je tomu například v případě schopnosti inhibice cholinesteras, ta je spojena s galanthaminovým a částečně lykorinovým strukturním typem. Z těchto důvodů je amarylkovitým alkaloidům věnována zvýšená pozornost jako látkám potenciálně využitelných v terapiích různých civilizačních onemocnění.

Jejich biologická aktivita je velmi široká. Vedle již zmíněné schopnosti inhibovat cholinesterasy, se mezi další řadí aktivita antimalarická, antibakteriální, antiprotozoální a další. Jako nejvýznamnější a nejzajímavější se z nich jeví cytotoxická aktivita.

Onkologická onemocnění představují v rozvinutých zemích jednu z hlavních příčin úmrtí.² Podle Světové zdravotnické organizace vzroste do roku 2030 počet nových případů o 70%.² Chemoterapie, tedy léčba pomocí cytotoxicky působících léčiv ovšem ovlivňuje i zdravou tkáň a objevuje se tak celá řada vedlejších účinků. Schopnost selektivně působit na nádorové buňky a nepoškozovat buňky zdravé byla zjištěna u již zmíněných alkaloidů rostlin čeledi Amaryllidaceae.

Předmětem této diplomové práce byla příprava pilotních polysyntetických derivátů alkaloidů haemanthaminu, haemanthidinu a lykorinu, jejich strukturní analýza a screeningové testování biologických aktivit.

2. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce navazuje a vychází z výsledků DP Bc. Markéty Dalecké,³ která se zabývala vlivem alkaloidů čeledi Amaryllidaceae ambellinu, belladinu, galanthinu, haemanthaminu, haemanthidinu, chlidanthinu, lykorinu, tazettinu a undulatinu na apoptózu střevních nádorových buněčných linií.

Náplň diplomové práce:

- 1) zpracování rešerše k problematice využití alkaloidů a jejich syntetických derivátů čeledi Amaryllidaceae v terapii nádorových onemocnění
- 2) příprava pilotních polosyntetických analog izolovaných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae pro biologické testování dle literární rešerše
- 3) stanovení základních fyzikálně-chemických charakteristik připravených derivátů
- 4) biologické testování připravených derivátů v rámci spolupráce s jinými univerzitami
- 5) vyhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae

Čeď Amaryllidaceae je rozsáhlou čeledí, do které je řazeno kolem 75 rodů a je popsáno asi 1100 druhů rostlin.⁴ Jedná se o jednoděložné vytrvalé byliny jak suchozemské tak pobřežní, rozmnožující se cibulemi nebo oddenky. Jsou rozšířeny převážně v tropech a subtropích, ale své zastoupení mají i v mírném pásu. V ČR můžeme nalézt jak druhy původní tak zplanělé.⁴

Na našem území jsou nejznámějšími zástupci časné jarní rostliny *Galanthus nivalis* (sněžěnka podsněžník), *Leucojum vernum* a *aestivum* (bledule jarní a letní), *Narcissus pseudonarcissus* a *poeticus* (narcis žlutý a bílý). Mezi další zajímavé rody, které jsou využívány především jako okrasné rostliny, patří například *Amaryllis*, *Clivia* a *Haemanthus*.⁵

Rostliny patřící do této čeledi jsou zdrojem širokého množství strukturně jedinečných sekundárních metabolitů, tzv. amaryllkovitých alkaloidů. Chemicky se jedná o isochinolinové alkaloidy. Od izolace prvního alkaloidu jich bylo popsáno více než 500 a mají převážně významně toxický účinek. Vyskytují se v celé rostlině, ovšem největší podíl obsahují cibule.^{3,6}

Pro obsah těchto látek byly rostliny čeledi Amaryllidaceae využívány v lidovém léčitelství. První zdokumentovaná zmínka o jejich užití se objevuje již ve 4. století před našim letopočtem v období Hippokrata z Kósu. Hippokrates připravil extrakt z rostliny *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze a použil jej k léčbě nádorů dělohy.⁷ Od této doby se zmínky o rostlinách čeledi Amaryllidaceae a jejich alkaloidech objevují napříč historií v nejrůznějších částech světa – v Číně, Severní Africe, Střední Americe i na Arabském poloostrově.⁷

Amaryllidaceae alkaloidy potvrzují svůj potenciál v medicíně obrovským rozsahem biologického účinku. Od již zmíněného protinádorového působení přes proapoptické, antibakteriální, antivirové účinky až po inhibiční aktivitu vůči různým enzymům.

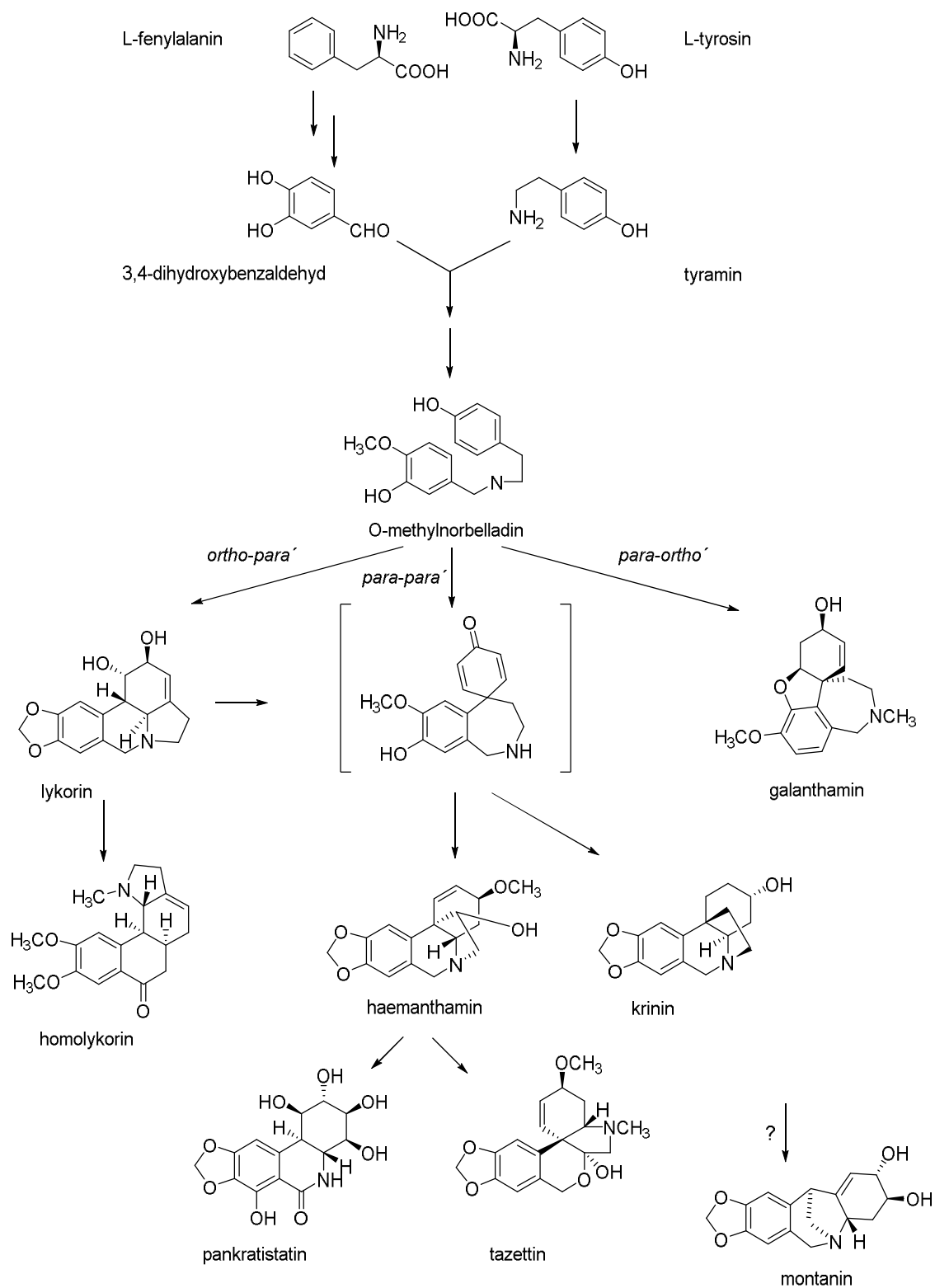
3.1.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů

Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů vychází ze společného základu a nazývá se tzv. norbelladinová cesta. Jejími výchozími látkami jsou L-fenylalanin a L-tyrosin. L-Fenylalanin jako prekurzor tvoří C1–C6 části aromatického kruhu A a polohu benzylylu na C6. L-tyrosin je prekurzorem dusíku na C2–C6 a prekurzorem kruhu C se dvěma uhlíky C-11, C-12 v postranním řetězci.⁷

L-Fenylalanin se v několika krocích přeměňuje na 3,4-dihydroxybenzaldehyd; L-tyrosin prochází přeměnou na tyramin. Několika reakčními kroky spolu za účasti Schiffovy báze vytváří 4'-*O*-methylnorbelladin, který podléhá intramolekulárnímu oxidativnímu spojení.⁷ Tuto skutečnost v roce 1957 potvrdili chemici Barton a Cohen.⁸ Schéma biosyntézy je znázorněno na obrázku (Obr. 1).

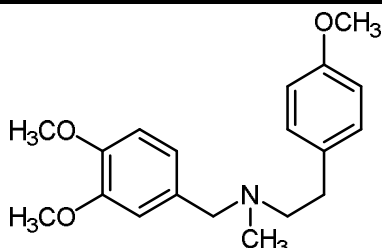
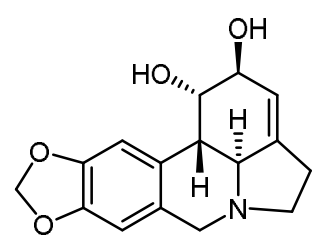
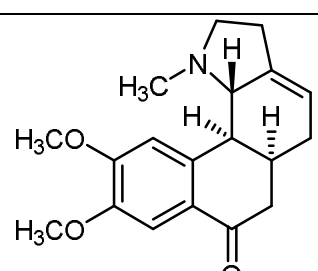
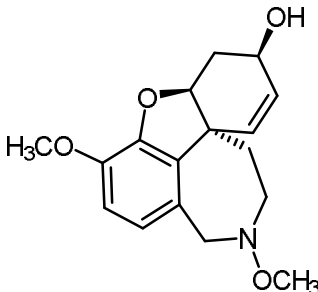
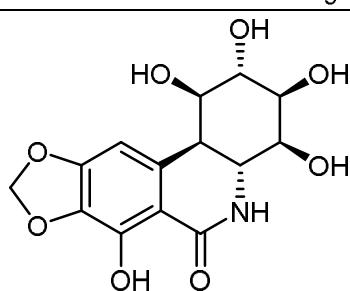
Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká 9 základních strukturních typů (započítán i výchozí norbelladinový a montaninový typ, jehož biosyntetická cesta není dosud zcela objasněna). Každá skupina má svého hlavního představitele, podle kterého jí byl udělen název. Jedná se o strukturní typy norbelladinový (norbelladin), lykorinový (lykorin), homolykorinový (homolykorin), galanthaminový (galanthamin), haemanthaminový (haemanthamin), krininový (krinin), pankratistatinový (pankratistatin), tazettinový (tazettin), montaninový (motanin).^{9,10} Pro přehled jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1).

Existuje řada dalších strukturních typů, které byly doposud nalezeny v jediném rostlinném rodu či druhu, nebo jsou zastoupeny jedinou strukturou. Jedná se například o strukturní typy: galantindolový (galanthindol), galasinový (galasin), cheryllinový (cheryllin), buflavinový (buflavin), plikaminový (plikamin), gracilinový (gracilin), augustaminový (augustamin), gracilaminový (gracilamin) a mesebranový (mesembrin).^{9,10}

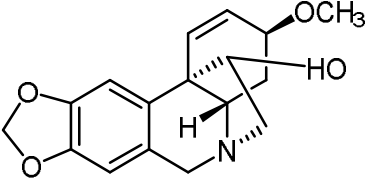
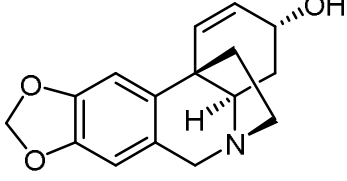
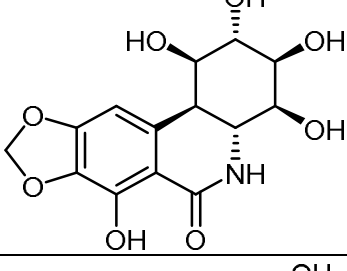
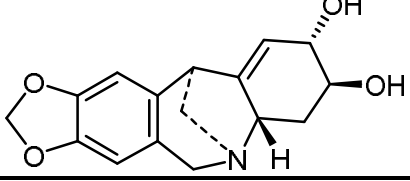


Obr. 1: Cesta syntézy hlavních typů Amaryllidaceae alkaloidů^{3,10}

Tabulka 1: Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, hlavní zástupci a příklady rodů, ze kterých byly izolovány (převzato a zkráceno z literatury)¹⁰

Strukturní typ	Hlavní zástupce	Rod
norbelladinový		norbelladin <i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Nerine</i>
lykorinový		lykorin <i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
homolykorinový		homolykorin <i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i>
galanthaminový		galanthamin <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
pankratistatinový		pankratistatin <i>Boophane</i> <i>Haemanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratinum</i> <i>Zephyranthes</i>

Tabulka 1: pokračování

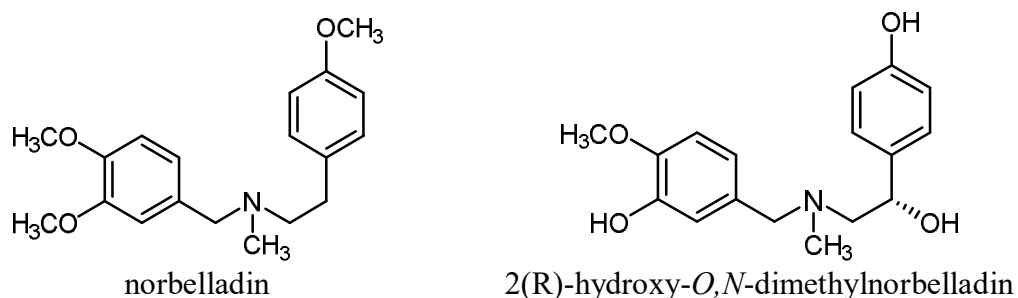
Strukturní typ	Hlavní zástupce	Rod
haemanthaminový		haemanthamin
krininový		krinin
tazettinový		tazettin
montaninový		montanin

3.1.2. Strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů

3.1.2.1. Norbelladinový typ

Norbelladinový typ se svým hlavním zástupcem norbelladinem (Obr.2) představuje výchozí strukturu pro vznik ostatních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Podle oxidativního spojení rozlišujeme 3 typy cyklizace:⁸

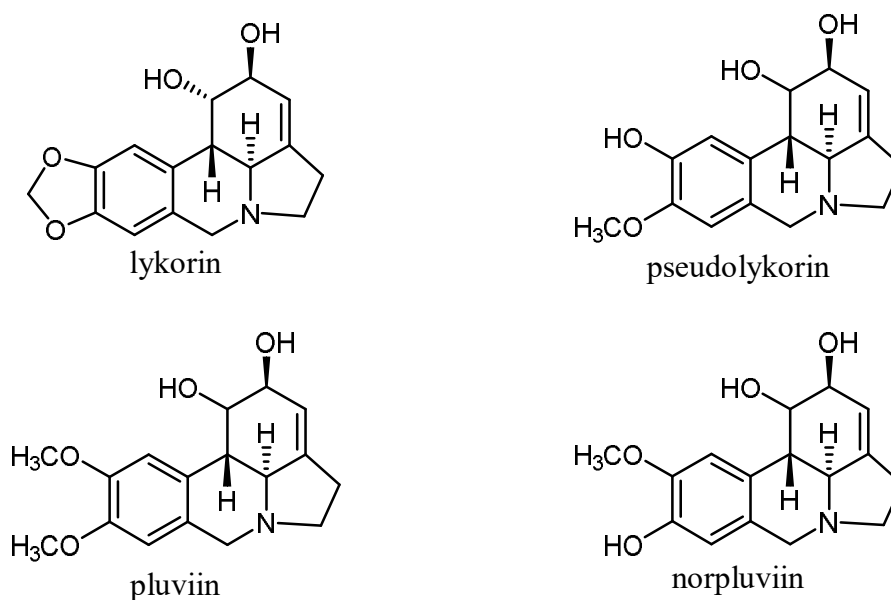
- *ortho-para* (lykorinový a homolykorinový typ)
- *para-para* (haemanthaminový, krininový, pankratistatinový a tazettinový)
- *para-ortho* (galanthaminový typ)



Obr. 2: Struktury alkaloidů norbelladinového typu

3.1.2.2. Lykorinový typ

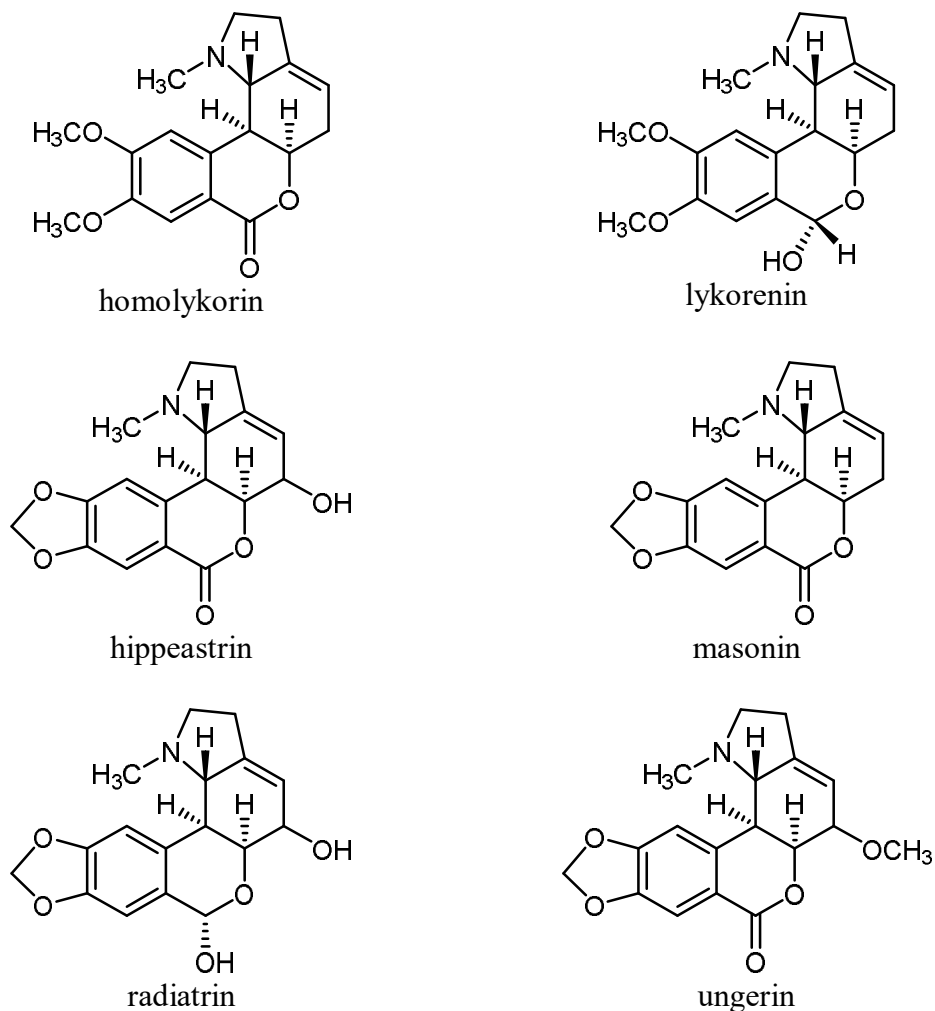
Struktura alkaloidů lykorinového typu vychází z pyrrolo[de]fenantridinu,¹¹ který vzniká *ortho-para* oxidativním spojením *O*-methylnorbelladinu. Základním představitelem je lykorin, který byl izolován jako vůbec první alkaloid v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* a jehož strukturu popsal až v roce 1956 Nagakawa.⁸ Dalšími zástupci jsou 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, pluviin, norpluviin, galanthin. Z důvodu široké strukturní rozmanitosti do této skupiny dále patří alkaloidy jako armabellisin, epi-zephyrantin, hippadin, inkartin, karantin, tortuosin, ungiminatorin (Obr. 3).^{12,13}



Obr. 3: Struktury vybraných alkaloidů lykorinového typu

3.1.2.3. Homolykorinový typ

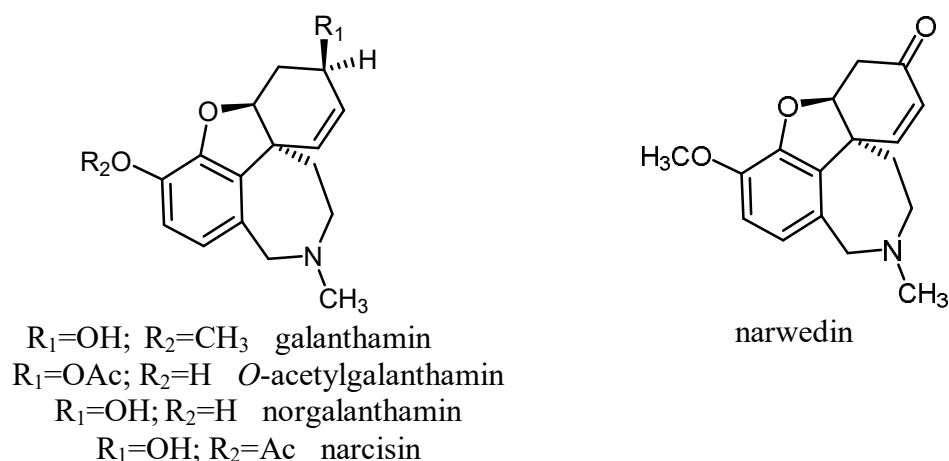
Alkaloidy této skupiny jsou odvozené od 2-benzopyrano[3,4-g]indolu vznikajícího *ortho-para* cyklizací norbelladinu.⁸ Hlavním zástupcem je homolykorin. Z dalších alkaloidů patří do této skupiny hippeastrin, lykorenin, masonin, radiatrin, ungerin, odulin a lykosinin A a B (Obr. 4).¹²



Obr. 4: Struktury vybraných alkaloidů homolykorinového typu

3.1.2.4. Galanthaminový typ

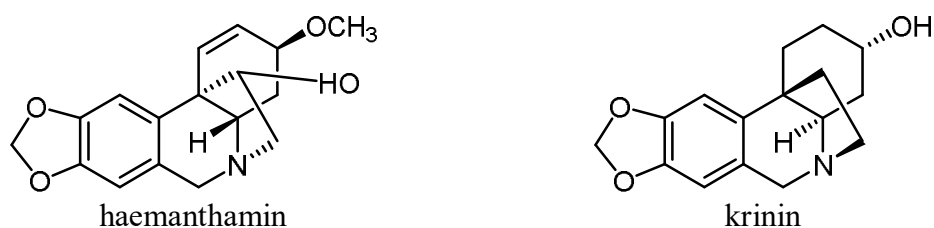
Galanthaminový typ je jedinou skupinou alkaloidů, jejichž struktura vzniká *para-ortho* cyklizací norbelladinu a typické je pro něj dibenzofuranové jádro.^{3,8} Hlavním představitelem je galanthamin, který byl poprvé izolován v roce 1952 z rostliny *Galanthus woronowii*.¹⁴ Dalšími alkaloidy jsou lykoramin, narwedín, narcisin, sanguinin a chlidantin (Obr. 5).⁸



Obr. 5: Struktury vybraných alkaloidů galanthaminového typu

3.1.2.5. Haemanthaminový a krininový typ

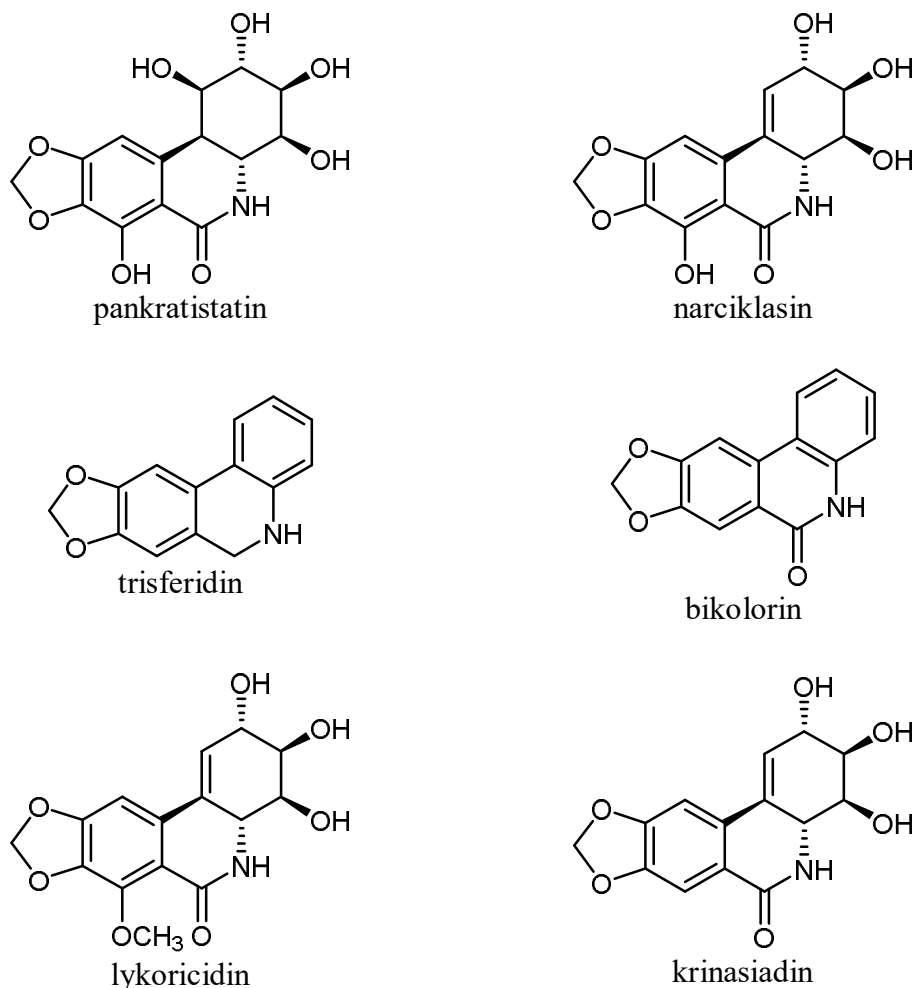
Haemanthaminový a krininový typ, v některé literatuře označované jako α,β -krininový typ, strukturně vychází z 5,10*b*-ethanofenantridinu vzniklého z norbelladinu *para-para* oxidativní cyklizací.⁸ Tyto dva typy se liší pouze v konfiguraci 5,10*b*-ethanového můstku (jedná se o enantiomery¹⁵). Je pro ně typické široké množství zástupců. Hlavními alkaloidy jsou haemanthamin a krinin. Na obrázku (Obr. 6) jsou znázorněny jejich struktury, na kterých je rozdíl v prostorovém uspořádání viditelný. K haemanthaminovému typu řadíme i další alkaloidy, například vittatin, krinamin, haemanthidin, hamayn, bulbispermin, makoin. Ke krininovému typu se zařazuje kromě krininu i ambellin, bufanisin, bufanidrin, 6-hydroxykrinamin a undulatin.¹⁶ Alkaloidy těchto typů patří mezi nejčastěji se vyskytující alkaloidy čeledi Amaryllidaceae.



Obr. 6: Struktury haemanthaminu a krininu

3.1.2.6. Pankratistatinový typ

Do této skupiny spadají alkaloidy odvozené od fenantridinu a podobně jako alkaloidy haemanthaminového typu vznikají cyklizací *para-para*.⁸ Kromě hlavního zástupce pankratistatinu sem patří i narciklasin, trisferidin, bikolorin, lykoricidin a krinasiadin (Obr. 7).^{7,9,12}

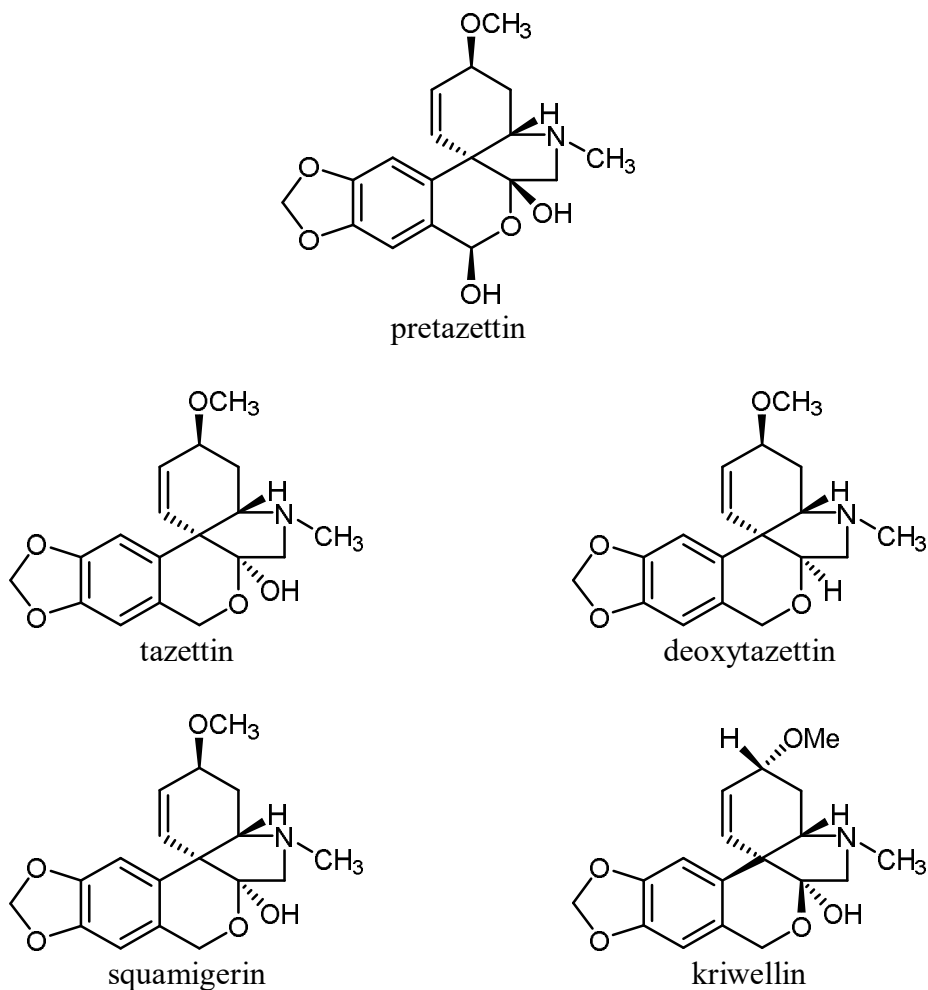


Obr. 7: Struktury alkaloidů pankratistatinového typu

3.1.2.7. Tazettinový typ

Strukturně jsou tyto alkaloidy odvozeny od 2-benzopyrano[3,4-c]indolu⁸ vznikajícího *para-para* oxidativním spojením norbelalladinu, stejně jako se děje u haemanthaminového a krininového typu. Hlavní látka skupiny, tazettin, byla poprvé izolována z *Narcissus tazetta* a podrobněji zkoumána v roce 1934. Tazettin patří mezi nejčastěji se vyskytující Amaryllidaceae alkaloidy, není ovšem přirozený, ale vzniká druhotně přes haemanthamin z chemicky nestálého prekursoru pretazettinu. Kromě již

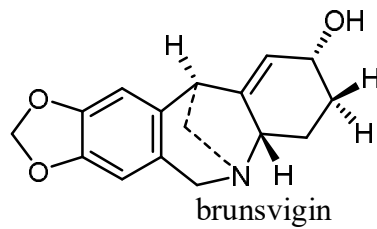
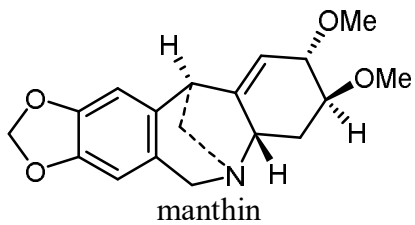
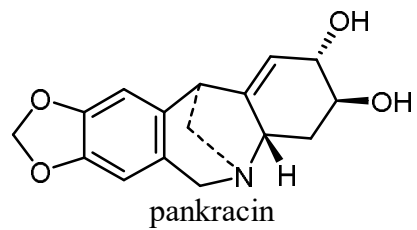
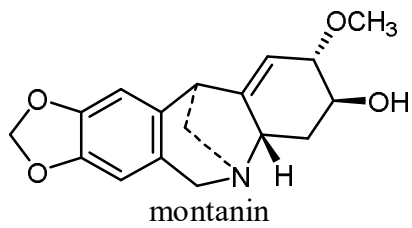
zmíněných alkaloidů, patří do této skupiny deoxytazettin, squamigerin a kriwellin (Obr. 8).^{12,17}



Obr. 8: Struktury vybraných alkaloidů tazettinového typu

3.1.2.8. Montaninový typ

Základem montaninového strukturního typu je 5,11-methanomorfantridin, který vzniká *para-para* cyklizací norbelladinu.⁸ Změnami jeho konfigurace pouze v poloze C-2 a C-3 vznikají hlavní alkaloidy skupiny. Ty byly izolovány v roce 1955. Vzhledem k jejich nízké dostupnosti, možnosti izolace a obsahu malého množství těchto alkaloidů v rostlinách, je pozornost stále více věnována syntetické přípravě a to od alkaloidů haemanthaminového typu. Typickým zástupcem montaninových alkaloidů je montanin. Mezi další zástupce řadíme pankracin, brunsvigin a manthin (Obr. 9).^{12,18}



Obr. 9: Struktury vybraných alkaloidů montaninového typu

3.2. Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a jejich syntetických derivátů

Alkaloidy dělíme dle již zmíněných strukturních odlišností v chemickém vzorci. Struktura a prostorové uspořádání jednotlivých alkaloidů jsou důležité z hlediska jejich biologické aktivity. Lukrativní a nadějně se zdá být studium a výzkum vztahu struktura–účinek.

Široká biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů zahrnuje antibakteriální, antimykotické, antimalarické a protizánětlivé působení. Dále se vyznačují významnou schopností inhibice acetylcholinesterasy (AChE) a z toho vyplývající využití v terapii Alzheimerovy choroby. Výrazná je také protinádorová aktivita, jejímž obrovským kladem je navíc vysoká selektivita k buňkám nádorovým a poměrně nízká toxicita vůči buňkám zdravým a klidovým.³

3.2.1. Protinádorová aktivita

3.2.1.1. Lykorinový typ

Biologický účinek lykorinového strukturního typu je velice rozsáhlý, od inhibice acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE) přes antimalarickou, antiplasmodiální a antivirovou aktivitu až po protinádorové působení. Nejznámější a nejaktivnější látkou tohoto typu je lykorin.

Lykorin se u rostlin projevuje schopností inhibice kyseliny askorbové (blokuje syntézu galaktodehydrogenasy),¹⁹ ovlivňuje vývoj prvoka *Trypanozoma brucei*²⁰ a působí antimykoticky na *Saccharomyces cerevisiae*.²¹ Dokonce je aktivní i proti řadě virů, například polioviru,²² SARS-asociovanému koronaviru,²³ viru planých neštovic.²⁴

Nejznámější a nejúčinnější jsou ovšem jeho účinky protinádorové jak *in vitro* tak především *in vivo*. Pro účinnost na nádorové linie je důležité zachování struktury lykorinu: konformační volnost v kruhu C, stereochemie na spojení kruhů C/D, diolové skupiny na kruhu C.²⁵ Díky tomuto upořádání se váže na 60S jednotku ribozomu peptidyltransferasového centra.²⁵

Cytotoxicita lykorinu byla mimo jiné ověřena na řadě nádorových buněk, jednalo se *in vivo* o myši melanom BL6 a Lewisův plicní karcinom, *in vitro* o HeLa buňky, CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ3 (Tabulka 2).^{26,27,28} Obrovským přínosem je vyvolání apoptózy u rakovinných buněk již v mikromolárních koncentracích²⁶ s minimálním

efektem na buňky zdravé. Jeho aktivita je oproti nádorovým buňkám dokonce až 15-krát větší.²⁵

V rámci testování lykorinu na p-53 negativní linii lidských leukemických promyelocytů HL-60 byl studován mechanismus účinku. Získané výsledky ukázaly, že dochází k zástavě buněčného cyklu v G2/M fázi, zvýšení aktivity kaspáz a vyvolání apoptózy nezávisle na proapoptických stimulech.²⁹

Při podrobnějším testování byly myším s těžkým deficitem SCID implantovány buňky HL-60. Pro zástavu krvetvorby byly myši předem vystaveny ionizujícímu záření. Léčba lykorinem probíhala 18 dnů ve skupinách s dávkou 5 a 10 mg/kg/den. V testech *in vivo* došlo k inhibici růstu promyelocytů a po opakovaném podání ke zvýšení doby přežití v porovnání s kontrolní skupinou.²⁹

Lykorin byl studován i na mnohočetném myelomu KM-3. V tomto případě docházelo k zástavě buněčného cyklu v G0/G1 fázi a nedošlo k reparaci poškozené DNA. V buňkách byla iniciována apoptóza.²⁹ Výsledky byly překvapující, neboť došlo ke snížení počtu životaschopných buněk z 89% na 21% s hodnotou $IC_{50} = 1,25 \mu M$. Porovnáme-li tyto výsledky s běžně užívanou léčbou melfalanem (při jeho užití dochází k poklesu životaschopných buněk z 84% na 10% při koncentraci 3,2 μM), zjistíme, že lykorin je 2,5-krát více selektivní.²³

Toxicitě lykorinu bylo podrobena i pět dalších buněčných linií HL-60, K562, K562/G01, U937 a 6TCM a získány hodnoty 1 μM , 1,7 μM , 7 μM , 1,9 μM a 2 μM . Ukázalo se, že lykorin inhibuje přibližně stejně růst myelogenní leukemie K562 a její imatinib rezistentní formy K562/G01.³⁰

Lykorin byl s dalšími 24 amarylkovitými alkaloidy různých strukturních typů testován vůči toxicitě na buňky MOLT-4, LMTK a HepG2. Na všechny 3 buněčné linie byl lykorin nejaktivnější ($ED_{50} = 0,4; 0,3$ a 13 $\mu g/mL$).³¹ Zajímavá aktivita byla zjištěna také u dvou dalších derivátů lykorinu: pseudolykorinu ($ED_{50} = 0,5; 0,4$ a 10 $\mu g/mL$) a 2-*O*-acetylpseudolykorinu ($ED_{50} = 0,6; 0,6$ a 26 $\mu g/mL$) a jednoho alkaloidu homolykorinového strukturního typu lykoreninu ($ED_{50, HepG2} = 1,2 \mu g/ml$). Ostatní látky byly vůči testovaným buněčným liniím středně až velmi málo aktivní (ED_{50} se pohybuje v rozmezí 9–50 $\mu g/mL$).³¹ Aktivita lykorinu byla prokázána i u následujících třech buněčných linií HL-60-S, HL-60-R a L1210, jejichž životaschopnost se zmenšuje v závislosti na dávce.³²

Dalšími zajímavými látkami skupiny jsou karanin, 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, galanthin a armabellisin. 1-*O*-Acetyllykorin vyvolává apoptózu u Jurkat

leukemické linie buněk, pseudolykorin apoptózu prostřednictvím inhibice proteosyntézy ve stádiu tvorby peptidové vazby (na jiném místě než lykorin). Pseudolykorin se projevuje i aktivitou antivirovou, zejména na RNA a DNA viry, částečně na flavi- a buynaviry. Mechanismus účinku spočívá v blokádě virové DNA polymerasy.³³

Testování bylo uskutečněno i na lymfatickou leukémii P-388. Významné hodnoty *in vitro* poskytly lykorinové varianty chlorid anhydrolykorinu a acetylkarantin s EC_{50} 1,4 a 0,23 $\mu\text{M}/\text{mL}$.³⁴ Navíc po léčbě *in vivo* anhydrolykorinem dávkou 10–20 mg/kg došlo ke zlepšení životní úrovně na 64–69 %.³⁴ *In vitro* toxicitu projevil na tuto buněčnou linii i kriasbetain s hodnocenou $ED_{50} = 0,82 \mu\text{g}/\text{mL}$ a linii KB 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.³⁵

Látky lykorinového typu patřící do této skupiny jsou dále ungeremin, incartin, kriaticidin a hippadin. Z těchto látek se ukázal aktivní pouze ungeremin proti buněčné linii A549, rakovinnou buněčnou linii jater S-180 redukuje *in vitro* na 15%. Jeho *in vitro* testování na myších zjistilo úbytek růstu z 17×10^7 buněk na $8,2 \times 10^6$. Co se týče ostatních látek a linií, byla zjištěna slabá nebo střední toxicita.¹³

Tabulka 2: Přehled IC_{50} vybraných alkaloidů na několik nádorových linií³²

Alkaloidy	Buněčné linie, IC_{50} (μM)					
	CEM	K562	MCF7	HeLa	G-3610	BJ
lykorin	1,6 ± 0,0	3,6 ± 1,2	13,0 ± 2,9	10,6 ± 0,9	5 ± 0,3	1,9 ± 0,1,
haemanthamin	2,1 ± 0,4	3,4 ± 1,6	8,1 ± 3,3	7,0 ± 2,2	3,7 ± 0,4	2,7 ± 0,2
distichamin	4,5 ± 1,6	4,1 ± 0,9	2,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1	14,7 ± 0,1	10,5 ± 1,9
narcipramin	13,3 ± 2,5	> 50	> 50	> 50	> 50	7,9 ± 0,2
homolykorin	15,0 ± 5,3	19,4 ± 0,8	> 50	> 50	32,9 ± 6,0	20,8 ± 2,3
staurosporin ^a	0,023 ± 0,002	nt	0,064 ± 0,002	0,175 ± 0,007	nt	2,2 ± 0,0
galanthamin ^b	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

měřeno po 72 hod, průměr ze 3 na sobě nezávislých měření

nt = nebylo testováno; ^a = pozitivní kontrola; ^b = negativní kontrola

BJ – b. fibroblastomu; CEM – b. lymfoblastická leukémie; G-3610 – b. melanomu; HeLa – b. rakoviny děložního hrdla, K562 – b. myelogenní leukémie; MCF7 – b. rakoviny prsu

3.2.1.2. Haemanthaminový a krininový typ

Druhou nejvýznamnější skupinou Amaryllidaceae alkaloidů je pro protinádorový účinek haemanthaminový a krininový strukturní typ, v některé literatuře označované jako α, β -krininový typ. Z nich se jako nejzajímavější jeví haemanthamin, haemanthidin, hamayn a v poslední době i distichamin, který byl izolován z cibulí *Boophana flava*.³⁶

Již před několiklity lety byl testován 1,2-epoxyambellin, izolovaný z *Crinum latifolium*, na lymfocyty myši sleziny. Jeho aktivita byla průměrná, ovšem při testování této látky společně s ambellinem v poměru 1 : 1, došlo k synergismu účinku a aktivaci

lymfocytů. Při jedné z prací byly v *Crinum latifolium* objeveny dva doposud neznámé alkaloidy krinafolin, epimer ambellinu, a krinafolidin. Krinafolidin se tak stal prvním členem strukturního podtypu alkaloidů se *seco*-B kruhem. Oba tyto alkaloidy byly aktivní na buňky sarkomu. Ve srovnání však krinafolin projevil větší vliv na redukcii buněk. Pro účinek je tedy výhodnější plně cyklizovaný systém připomínající pankratistatinové jádro. Ovlivněním kruhu B kvarternizací dusíku získáme methochlorid krinafolinu, který je 2-krát účinnější než krinafolin.^{37,38}

V roce 2008 byl testován vittatin, izolovaný z rostliny *Hippeastrum vittatum*, na třech buněčných liniích HT-29, H460 a RXF393. Jeho toxicita byla střední. Avšak po testech sumárních extraktů dichlormetanu a butanolu bylo dosaženo velice zajímavých výsledků, u dichlormetanu dokonce 0,62 µg/ml na linii H460.³⁹

Po zjištění, že haemanthidin a krinamin vyvolávají apoptózu u potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123c byl v další práci studován mechanismus účinku haemanthaminu a haemanthidinu, které byly izolovány z cibulí *Zephyranthes robusta* Baker. Došlo k indukci apoptózy u p-53 negativní T-lymfoblastové leukémie Jurkat. Mechanismus účinku byl objasněn jako zástava buněčného cyklu v G1 a G2 fázi a zvýšení exprese p-16 a Chk1 Ser345.⁴⁰

Skupina alkaloidů byla testována na vyvolání apoptózy u sensitivních (Hs683 a B16F10) a apoptózu rezistentních (A549, OE21, U373 a SKMEL) buněčných kmenů. Krininové alkaloidy se k žádnému z kmenů neprojevily výrazně aktivně, zato haemanthaminový typ zastoupený haemanthaminem a haemanthidinem vykázal značnou toxicitu na oba buněčné kmeny. Nejvíce pak haemanthidin na sensitivní linii B16F10.²⁶

Nedávno provedená studie, zabývající se vlivem Amaryllidaceae alkaloidů na střevní nádorové buňky, zjišťovala hodnoty IC₅₀ 13 těchto alkaloidů patřících do pěti strukturních typů: haemanthaminového, krinového, galanthaminového, lykorinového a tazettinového. Výsledkem byla selektivní toxicita haemanthaminu, haemanthidinu a lykorinu vůči oběma zkoumaným liniím Caco-2 a HT-29 s minimálním ovlivněním buněk zdravých střevních fibroblastů FHS-74-Int. Ostatní testované látky nevykázaly významnou toxicitu k nádorovým buňkám. Tyto výsledky byly následně potvrzeny.³

Velkou výhodou haemanthaminu je, že se jedná o druhý/třetí nejvíce se vyskytující alkaloid v rostlinném materiálu, jeho izolace je snadná a velmi dobře krystalizuje ze směsi chloroform/ethanol.

Tabulka 3: Hodnoty IC₅₀ haemanthaminových alkaloidů na střevní buňky Caco-2, HT-29 a zdravou linii střevních fibroblastů FHS-74-Int³

Alkaloidy	Buněčné linie, IC ₅₀ (μM)		
	Caco-2	HT-29	FHS-74-int
haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,47 ± 8,86
haemanthidin	3,3 ± 0,9	1,72 ± 0,11	11,63 ± 0,86
hamayn	17,23 ± 0,93	12,36 ± 0,30	53,31 ± 7,25
lykorin	0,99 ± 0,08	1,02 ± 0,01	22,68 ± 0,09
vinorelbin	0,03 ± 0,00	nt	3,98 ± 0,26

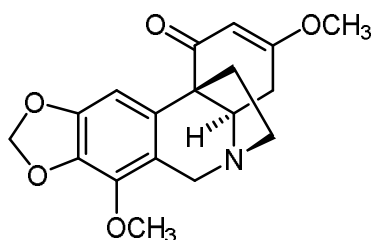
nt netestováno

Caco-2 – nádorová linie buněk tlustého střeva; FHS-74-int – buněčná linie zdravých střevních fibroblastů; HT-29 – nádorová. linie buněk tlustého střeva

Distichamin byl poprvé izolován z cibulí *Boophane disticha*, druhu nacházejícího se hojně v Africe od Súdánu přes sever až po západ a jih. Jedná se o strukturně jedinečnou látku se dvěma vinylovými methoxy skupinami, dvojnou vaznou mezi C-2 a C-3 a obsaženou keto skupinou (α,β nenasycený kruh C) (Obr. 10). Dnes už víme, že je tento alkaloid součástí i rostlinného extraktu z *Boophane haemanthoides*. Tento druh patří mezi vzácné a ohrožené. Vyskytuje se v oblastech se zimními dešťovými srážkami, například v Jižní Africe a částech jižní Namibie. Distichamin je tedy charakteristickou obsahovou látkou rodu *Boophane*, kterou prozatím nenajdeme v žádném jiném druhu. Rod *Boophane* je kromě distichaminu významným zdrojem i jiných haemanthaminových a krininových alkaloidů jako buphanidrinu, buphanisinu, krininu. Dále undulatinu, buphanaminu, nerbowdinu, acetylnerbowdinu, krinamidinu, lykorinu a buphacetinu.³⁶

Z publikací víme, že byl distichamin podroben cytotoxickému působení hned proti několika buněčným liniím. Jako příklad můžeme uvést linie MCF-7, HeLa, G-361, K562, CEM a normální fibroblasty BJ. Ukázalo se, že je aktivní jak na nádorové linie (IC₅₀ = 2,2–14,7 μM) tak zdravé buňky. Nejselektivněji působil na HeLa buňky. Jeho účinnost byla potvrzena o rok později na třech nádorových a jedné zdravé linii.⁴¹

Mechanismus účinku distichaminu je redukce buněčného cyklu v G0/G1 fázi a S fázi a následná zástava G2/M fáze v závislosti na dávce a zvýšení aktivity kaspáz.⁴²



Obr. 10: Struktura distichaminu

3.2.1.3. Pankratistatinový typ

Z pohledu protinádorové aktivity se jedná o jedny z neaktivnějších Amaryllidaceae alkaloidů. Nejzajímavější se zdá být pankratistatin a narciklasin (Obr. 7). Jejich porovnání bylo uskutečněno na 60 nádorových liniích a z výsledků stanovena průměrná hodnota IC_{50} . Nejlépe účinkoval narcikalsin ($0,046 \mu\text{M}$), poté 5-krát slaběji pankratistatin ($0,26 \mu\text{M}$) a 10-krát slaběji lykoricidin ($0,33 \mu\text{M}$).⁴³

Pankratistatin byl objeven v roce 1984 Pettitem a poprvé izolován až v roce 1993 z cibulí havajské lilie *Hymenocallis littoralis*.⁴⁴ Působí toxicky na mnoho typů rakovinného bujení, například leukemii, rakovinu prsu, prostaty, tlustého střeva, ledvin, melanomu, osteosarkomu a dalších. Projevuje se aktivitou již ve velmi nízkých koncentracích ($<1 \mu\text{M}$) s minimálním ovlivněním zdravých buněčných linií a rezistencí k proapoptickým stimulům.⁴⁵

Selektivita účinku pankratistatinu byla zjištěna a následně potvrzena na dvou typech kolorektálního karcinomu (p-53mutovaný HT-29 a p-53wild-type HCT 116) s porovnáním se zdravými střevními fibroblasty (CCD-18Co). Informaci povrdily výsledky ze souběžně probíhajícího testu na buněčných liniích karcinomu prostaty LNCaP a DU145. Jako kontrola byly použity zdravé fibroblasty HDF.⁴⁶

Mechanismus účinku pankratistatinu není prozatím zcela objasněn. Může se jednat o přímé zasažení mitochondrie v nádorové buňce, která hraje zásadní roli v aktivaci apoptózy, kdy mitochondrie náhle sníží produkci ATP rapidním zvýšením reaktivních forem kyslíku v nádorové buňce (u buněk zdravých nebylo pozorováno). Výsledkem je specifické toxické zasažení nádorových buněk.^{3,50}

V jedné z předešlých studií byl pankratistatin podroben společnému testování s lykorinovými alkaloidy galantinem a 9-O-demethylgalanthinem proti nádorové linii HL-60 a HSC-2. Výsledky zjistily potenciální využití jen u pankratistatinu proti oběma liniím (IC_{50} (HL-60) = $0,16 \mu\text{M}$ a IC_{50} (HCS-2) = $1,1 \mu\text{M}$).⁴⁸

Narciklasin (lykoricidinol) byl poprvé izolován roku 1967 z cibulí rodu *Narcissus*.²⁵ Slibné využití má jako GTPasa působící na rakovinu mozku, jeho účinek je cytostatický s hodnotou $IC_{50} = 30\text{--}90$ nM. Jako možný mechanismus účinku se jeví zhoršení cytoskeletální aktivity přes Rho rodinu GTPas a prodloužení faktoru eEF1A.⁴⁹ Narciklasin působí již ve velmi nízkých dávkách silně antimitoticky.⁴⁷ Vysvětlením je výrazná inhibice proteinové syntézy v eukaryotických ribozomech způsobená interakcí s peptidyltransferasovým centrem (60 – větší podjednotka eukaryotických ribozomů) a tím vyvolaná inhibice peptidyltransferasy, enzymu zodpovědného za vznik peptidové vazby. Dále interakcí či tvorbou komplexů s DNA živočišných buněk, interaguje s mikrotubuly dělicího vřeténka a dochází tak k nesprávnému rozchodu chromozomů.⁴ Vykazuje cytotoxické působení vůči buňkám adenokarcinomu MCF-7 a buňkám karcinomu prostaty PC-3 indukcí apoptózy zprostředkovanou aktivací kaspáz.⁵⁰ Velkým pozitivem narciklasinu je fakt, že působí až 250-krát účinněji a specifičtěji na nádorové buňky než buňky lidských fibroblastů Ccd-25-Lu.^{50,25}

3.2.1.4. Tazettinový typ

Tazettin působí pouze mírně až velmi slabě cytotoxicky. Zajímavější látkou této skupiny se z pohledu cytotoxicity jeví pretazettin, který byl testován na buňkách myšičího a lidského lymfomu. Nejúčinněji působí na T-lymfoidní buňky MOLT-4, ale i na buňky Rauscher leukemie, spontánní AKR lymfocytární leukemii a buňky Lewisova karcinomu. Inhibuje aktivitu Pg-P, HeLa buňky a potencuje účinek doxorubicinu vůči rezistentním lymfoidním buňkám u myší.³ V rámci testování byl prokázán účinek proti viru *Herpes simplex*, flavivirům a řadě onkogenních virů přes inhibici RNA-depedentní DNA polymerasy. V některých pracích se hovoří o mechanismu inhibice proteosyntézy skrz zástavu formování peptidové vazby.^{3,8}

3.2.1.5. Homolykorinový typ

Z hlediska biologické aktivity hrají alkaloidy spadající do tohoto strukturního typu roli v inhibici růstu několika nádorových linií, například buněk leukemických MOLT-4, buněk hepatokarcinomu HepG2 a lidských buněk prostaty LNCaP. Jejich cytotoxické působení se ovšem projevuje i na nenádorové buňky myšičích fibroblastů LMTK. Cytotoxickou aktivitou se tedy řadí k méně významným.^{3,8}

3.2.2. Anticholinergní aktivita

Alzheimerova nemoc AD je neurologické degenerativní onemocnění ve většině případů postihující lidi starší 60-ti let žijící převážně v rozvojových zemích. Jedná se o nejčastější typ demence, který způsobuje problémy s pamětí, myšlením a chováním, stupňujícími se v průběhu času tak, že výrazně zasahuje do běžného života.⁵¹ V roce 2015 bylo ve světě evidováno 46,8 milionů případů a předpokládá se, že každých 20 let se počet případů zdvojnásobí. Jen za minulý rok jich přibýlo 9,9 milionu.⁵²

Příčinou onemocnění jsou mikroskopické změny v mozku a tvorba patologických znaků. Jedná se o β -amyloidní plaky, neurofibrilární shluky a ztrátu cholinergní aktivity. Senilní plaky vznikají hromaděním proteinu β -amyloidu v prostoru mezi dystrofickými neurity a mikroglie. Neurofibrilární klubka jsou shluky tau proteinu, který se hromadí uvnitř buněk,⁵³ tím se narušuje komunikace a přenos informace mezi nervovými buňkami. Podle cholinergní hypotézy jsou tyto symptomy způsobeny nedostatečnou aktivitou acetylcholinu (ACh) v mozku z důvodu jeho rozkladu hydrolytickým enzymem acetylcholinesterasou (AChE). V současnosti jsou inhibitory AChE (iAChE) užívány v terapii AD.⁵⁴

Své nové využití mají i inhibitory butyrylcholinesterasy, které podobně jako iAChE dokáží zabránit rozkladu acetylcholinu⁵⁵, pomáhají při snížení β -amyloidu^{56,57} a zranění neurofibrilárního plaku.⁵⁸

Léčba Alzheimerovy choroby je prozatím léčbou symptomatickou. Typickými léčivy jsou galanthamin, donepezil, rivastigmin a takrin. Přestože takrin vykazuje výrazný inhibiční efekt vůči oběma cholinesterasám, je jeho využití z důvodu hepatotoxicity zanedbatelné.⁵⁹

Schopnost ovlivňovat cholinesterasy je spojována především se strukturními typy galanthaminovým a lykorinovým.

3.2.2.1. Galanthaminový typ

Hlavním alkaloidem je galanthamin, který byl poprvé izolován z rostliny *Galanthus woronowii*.¹⁴ Galanthamin způsobuje bradykardii či poruchy atrioventrikulárního přenosu, v CNS i na periférii nervového systému selektivně reverzibilně inhibuje cholinesterasy a alostericky moduluje nikotinové receptory, které způsobují cholinergní transmissi.¹ Jako první Amaryllidaceae alkaloid byl zaveden do klinické praxe v terapii Alzheimerovy choroby pod názvem Reminyl. Jedná se terciární

alkaloid, pro vyvolání jeho biologického účinku a vazbu na enzymy jsou důležitá čtyři místa a to: cyklohexenový kruh a jeho hydroxylová skupina, terciární aminoskupina a methoxyskupina (Obr. 11). Modifikací těchto hlavních míst se může ovlivňovat míra účinku, popřípadě přechod účinku na jiný.¹⁴

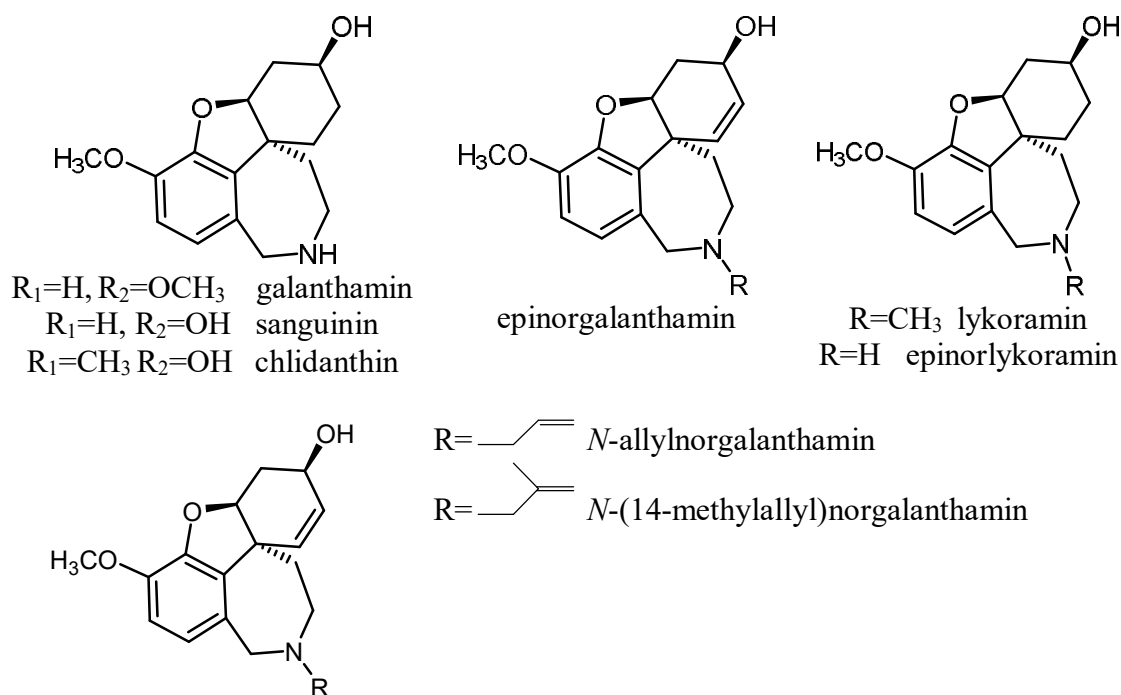
Pro anticholinergní aktivitu byl za další velice zajímavou látku považován polohový izomer galanthaminu nazvaný chlidanthin. V jeho struktuře dochází k záměně hydroxy- a methoxyskupiny. Následné studie bohužel ukázaly, že inhibiční efekt na AChE je vůči galanthaminu výrazně nižší.⁶⁰

Sanguinin, 9-hydroxyderivát galanthaminu, je 10-krát aktivnější než galanthamin (Obr. 11). Jeho využití v praxi je ovšem výrazně limitováno malou schopností pronikat přes hematoencefalickou bariéru kvůli nízkému distribučnímu koeficientu a jeho velmi malému výskytu v přírodě v rostlině *Pancratium illyricum* rostoucí v Itálii.⁶¹ Na základě získaných informací se zrodila myšlenka v důležitosti přítomnosti –OH skupiny nebo chránění –OH skupiny v allylické poloze. Dalšími látkami vykazující až 5-krát vyšší inhibici AChE než galanthamin jsou *N*-deriváty galanthaminu, ve kterých je methylskupina na dusíku nahrazena allylem. Jedná se například o *N*-allylnorgalanthamin, *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin (Obr. 11).⁶² Jejich nevýhodou je však jako nižší distribuční koeficient a špatná dostupnost v biologickém materiálu (jako u sanguininu).

Další důležitou částí v molekule galanthaminu je terciární aminoskupina. Její nepřítomností vzniká epinorgalanthamin (Obr. 11), který působí 10-krát nižší inhibiční aktivitou.⁶³ Potenciálně využitelnými látkami se zdají být deriváty přírodních látek vzniklé *N*-substitucí, jedná se například o *N*-butylkarbamát galanthaminu. *In vitro* testy ukázaly 85% aktivitu na inhibici AChE ve srovnání s galanthaminem a navíc průchod přes hematoencefalickou bariéru.⁶⁴

Již zmíněna přítomnost cyklohexanového kruhu je jednou z nejdůležitějších částí. Potvrzením nám jsou alkaloidy lykoramin a epinorlykoramin, které postrádají dvojnou vazbu cyklohexanového kruhu, což způsobuje ztrátu jejich inhibičních schopností (Obr. 11).⁶⁴

Přesto, že BuChE hraje důležitou roli v pozdním stupni AD, látky působící její inhibici zatím nemůžeme charakterizovat z pohledu vztahu struktura–účinek v důsledku nízkého počtu doposud testovaných Amarylidaceae alkaloidů. Zatím se ani nepodařilo izolovat alkaloid, který by se vyznačoval silnou a žádanou aktivitou vůči tomuto enzymu.



Obř. 11: Přehled galanthaminových struktur s anticholinerní aktivitou

Tabulka 4: Přehled AChE inhibiční aktivity různých Amaryllidaceae alkaloidů^{62,67,69}

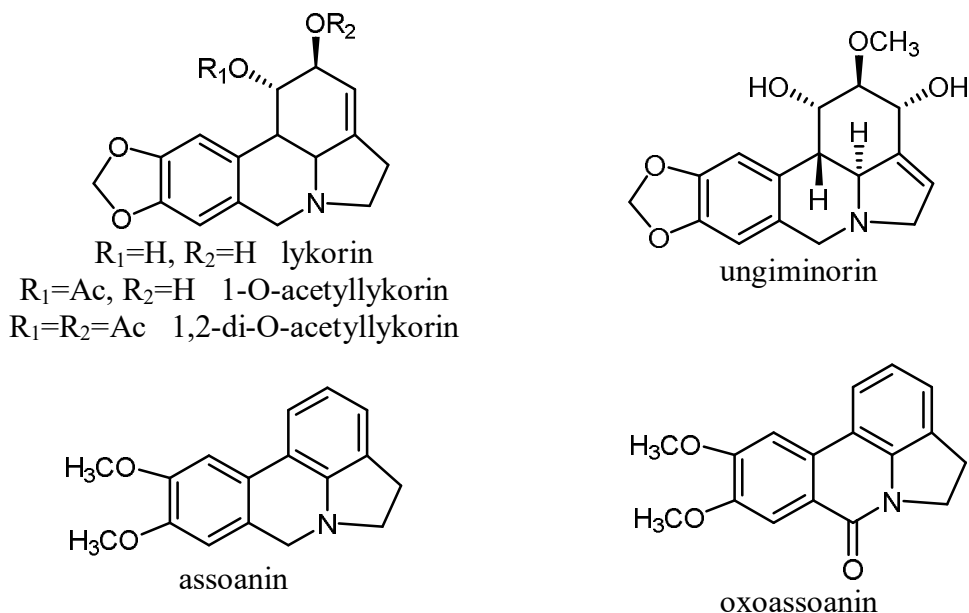
Alkaloidy	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)
galanthamin	1,07 ± 0,18	43,3 ± 1,3
chlidanthin	147 ± 6	422,00 ± 15
sanquinin	0,1 ± 0,01	–
N-allylnorgalanthamin	0,18	–
N-(14-methylallyl)norgalanthamin	0,16	–
11-hydroxygalanthamin	1,61 ± 0,21	–
lykorin	> 500	>1000
1-O-acetyllykorin	0,96 ± 0,04	–
1,2-diacetyllykorin	211 ± 10	–
assoanin	3,87 ± 0,24	–
oxoassoanin	47,21 ± 1,13	–
hippeastidin	99,7 ± 4,1	900 ± 35
undulatin	23,0 ± 1,0	>1000
8-O-demethylmaritidin	28,0 ± 0,9	>1000

3.2.2.2. Lykorinový typ

Při testování tohoto strukturního typu na inhibici vůči AChE, byla u lykorinu zjištěna slabá aktivita. V případě acetylderivátu 1-O-acetyllykorinu je však účinnost 2-

krát vyšší než u galanthaminu. 2-*O*-acetylace a 1,2-diacetylace vede ke ztrátě aktivity látek (Obr. 12).¹¹

Ze získaných výsledků bylo zjištěno a následně i řadou studií a příprav lykorinových analog potvrzeno, že pro inhibiční aktivitu vůči AChE je důležitá derivatizace na C-1 a C-2, především přítomnost acetyl skupiny v poloze C-1.^{11,65}



Obr. 12: Přehled lykorinových struktur s anticholinergní aktivitou

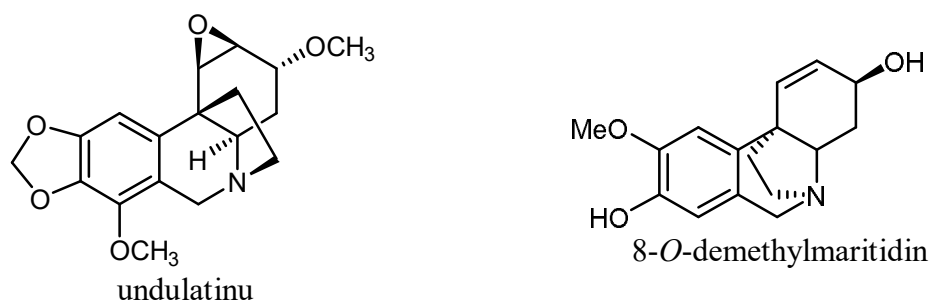
Dokonce až 6-10krát účinnější proti AChE je lykorinový derivát unguiminorin s hodnotou IC₅₀ 0,35 μM a assoanin s hodnotou 3,87 μM. Aktivitu těchto látek vyvolává planarita aromatického kruhu C.¹⁰ Další přírodní látka, oxoassoanin, vykazuje proti AChE slabší aktivitu s hodnotu IC₅₀ 47,21 μM (Obr. 12).²⁵

3.2.2.3. Haemanthaminový a krininový typ

Prvek, díky kterému se tyto typy Amarylidaceae alkaloidů liší, je stereochemie 5,10*b*-ethanového můstku.⁸ Pro vyvolání inhibiční aktivity však stereochemie tohoto můstku nehraje roli. U těchto dvou strukturálních typů byla až na pár výjimek zjištěna jen velmi slabá inhibiční aktivita.

Těmito výjimkami, které se podařilo izolovat v naší laboratoři ze *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans*, jsou undulatin, a 8-*O*-demethylmaritidin, strukturální analog maritidinu (Obr. 13). Jejich míra inhibovat AChE byla sice 10-krát menší než u galanthaminu, přesto se ukázalo, že i ta skupina alkaloidů je určité inhibice AChE schopna.^{66,67}

Ostatní látky tohoto typu izolované ze *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans* nejsou pro svou zanedbatelnou inhibiční aktivitu atraktivní pro využití v terapii Alzheimerovy choroby.



Obr. 13: Struktura undulatinu a 8-*O*-demethylmaritidinu

3.2.2.4. Inhibice prolylloleptidasy

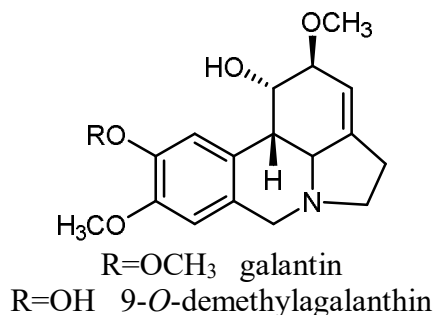
Prolylloleptidasa je cytosolická serinová peptidasa, která hydrolyzuje malé peptidy obsahující prolin. Štěpení probíhá z C-konce prolinových zbytků. Neuropeptidy plnící funkci substrátů tohoto enzymu jsou například vazopresin, substance P a thyreotropní hormon. Tyto látky jsou důležité v ovlivňování kognitivních funkcí a procesu stárnutí, kdy jejich degradace zapříčiněná POP může proces stárnutí urychlit.⁶⁸

Poslední dobou se stává inhibice prolylloleptidasy nadějným cílem v terapii schizofrenie, bipolární poruchy a kognitivních poruch, které se právě u pacientů s AD vyskytují. Prolylloleptidasa se účastní metabolismu inositol-1,4,5, trifosfátu, který hraje důležitou roli v transdukční kaskádě. Inhibitory POP tak ukazují svůj potenciál v léčbě demencí a mohly by se stát podpůrným nástrojem v léčbě AD.^{69,70}

Za zajímavou látku se v rámci této aktivity jeví již zmiňovaný undulatin. Jeho testování probíhalo s dalšími alkaloidy izolovanými z cibulí *Chlidanthus fragrans*. Undulatin jako jediný z testovaných látek vykázal relativně dobrou toxicitu v porovnání s použitým standardem baikalinem. Galanthamin, který se používá v léčbě AD, tuto aktivitu zcela postrádá.

Nejnověji testované látky izolované z cibulí *Zephyranthes robusta* byly galantin a 9-*O*-demethylgalanthin (Obr. 14). Obě látky byly sice na cholinesterasy vyhodnoceny jako zcela neaktivní ($IC_{50} \text{ AChE, BuChE} > 500 \mu\text{M}$), z pohledu inhibice POP byla jejich aktivita relativně zajímavá $IC_{50} \text{ galanthin} = 1,49 \pm 0,14 \text{ mM}$; $IC_{50} \text{ 9-demethylgalanthin} = 0,15 \pm$

0,02 mM). 9-*O*-demethylgalanthin působil proti POP dokonce 4-krát více než baikalin. Vyhodnocení určitého vztahu mezi strukturou a účinkem je prozatím bezpředmětné z důvodu malého počtu otestovaných látek. V současnosti se proto testují další izolované alkaloidy.^{67,71}



Obr. 14: Přehled vzorců alkaloidů testovaných na POP

3.2.3. Antibakteriální aktivita

Zajímavá antibakteriální aktivita byla zjištěna u roslin rodu *Crinum*. Extrakt z *Crinum purpurascens* i jednotlivé alkaloidy izolované z extraktu byly podrobeny účinku několika bakterií. Jednalo se například o bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Salmonella typhi*. Zatímco jednotlivé izolované látky působily jen velmi málo, u sumárního extraktu byly výsledky minimální inibiční i baktericidní koncentrace přibližně 2-krát vyšší než u ciprofloxacinu, který se používá jako standard.⁷²

Ve snaze získat nové látky přírodní povahy na nejrůznější nemoci, byla testována aktivita lykorinu na účinnost proti rybí nemoci způsobenou gramnegativní bakterií *Flavobacterium columnare*.⁷³ Tato nemoc je světově rozšířeným onemocněním ryb, především u sumců, způsobující bakteriální rozpad ploutví a žaber s následným úhynem udušením.⁷⁴ Vzniklé škody se projevují jak v chovech ryb tak v aquaristice.⁷⁵ Účinek látek byl sledován na dvou izolátech ALM-00-173 (genomovar 1) a BioMed (genomovar 2). Proběhlá studie potvrdila silnou antibakteriální aktivitu lykorinu a jeho dvou derivátů, 1-*O*-acetyllykorinu a 1,2-di-*O*-acetyllykorinu.⁷³ Z toho vyplývá, že pro antibakteriální účinek je nezbytná substituce v polohách C1-O nebo C2-O.⁷⁶ Disubstituce v těchto polohách je oproti monosubstituci výhodnější, což ukazují následující tabulky (Tabulka 5 a Tabulka 6).^{25,73}

Tabulka 5: Antibakteriální aktivita lykorinových derivátů vůči genomovaru ALM-00-173 *Flavobacterium columnare*^{25,73}

Alkaloidy			24-h IC ₅₀		MIC	
	24-h IC ₅₀	MIC	RDCF	RDCO	RDCF	RDCO
lykorin	27	29	49	47	100	108
1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin	2	4	3	3	10	11
1- <i>O</i> -acetyllykorin	7,3 ± 1,1	3,3 ± 0	10,4 ± 1,8	9,9 ± 1,7	10	10,8
2- <i>O</i> -acetyllykorin	17,7 ± 8,8	16,6 ± 16,3	27,8 ± 13,8	26,4 ± 13,1	50,5 ± 49,5	54,3 ± 53,2
ungeremin	0,5	1,0	0,28	0,27	1	1,1

Tabulka 6: Antibakteriální aktivita lykorinových derivátů vůči genomovaru BioMed *Flavobacterium columnare*⁷³

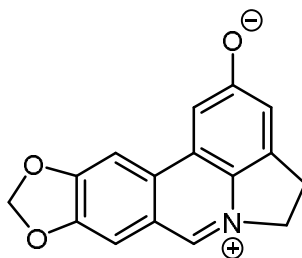
Alkaloidy			24-h IC ₅₀		MIC	
	24h IC ₅₀	MIC	RDCF	RDCO	RDCF	RDCO
lykorin	–	–	–	–	–	–
1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin	10	37	11	15	100	108
1- <i>O</i> -acetyllykorin	9,4 ± 1,2	3,3 ± 0	12,1 ± 1,5	16,9 ± 2,1	10,0	10,8
2- <i>O</i> -acetyllykorin	6,1 ± 0,8	3,3 ± 0	7,8 ± 1,1	10,9 ± 1,5	10,0	10,8
ungeremin	–	–	–	–	–	–

hodnoty –průměr ze 3 na sobě nezávislých měření

24-h IC₅₀ 50% inhibiční koncentrace v mg/l; MIC minimální inhibiční koncentrace v mg/l

RDCF – toxicita vzhledem ke kontrolnímu fluorfenikolu; RDCO – toxicita vzhledem ke kontrolnímu oxytetracyklinu (stejnou toxicitu jakou má kontrola vyjadřuje „1“, hodnoty blízké „1“ ukazují na dobrou aktivitu); -netestováno

Další studovanou látkou byl ungeremin (Obr. 15), jehož antibakteriální aktivita je oproti lykorinu a jeho analogům větší. Sama substituce ungereminu však nepůsobí na aktivitu příznivě, substituovaná analoga mají nižší účinek.²⁵ Do budoucna by důležitou roli proti *Flavobacterium columnare* mohl hrát aromatizovaný kruh C s oxidovanou azomethylovou skupinou v poloze C-7 za přítomnosti 1,3-dioxolového uskupení připojeného na kruh A.²⁵



Obr. 15: Struktura ungereminu

3.2.4. Antimalarická aktivita

Malárie je infekční onemocnění lidí a jiných zvířat způsobené pěti druhy parazitů patřící do rodu *Plasmodium*. Prvoci rodu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* a *Plasmodium ovale* se šíří kousnutím samičky komára rodu *Anopheles* z jedné osoby na druhou. K zoonotickému přenosu z opic na člověka dochází u rodu *Plasmodium knowlesi*.⁷⁷ Nejvíce postiženými oblastmi jsou tropy a subtropy, především subtropická Sahara. Podle údajů Světové zdravotnické organizace se v roce 2015 výrazně snížil počet případů výskytu malárie na 214 milionů i případů úmrtí na malárii na 438 000.⁷⁷

Nejrozšířenějším druhem je *Plasmodium falciparum* odpovědné za vznik rezistence na stávající léčbu.⁷⁸ Rezistence na chlorochin a kontrolované užití analog artemisininu vede k růstu významu izolace nových sloučenin z rostlin a hledání dalších antimalarik.⁷⁹

Přírodní produkty hrály již po staletí hlavní roli v léčbě různých nemocí. Původní obyvatelstvo Jižní Ameriky využívalo k léčbě malárie kůru ze stromu *Cinchona succirubra*. V Číně byla jako antimalarikum využívána rostlina *Artemisia annua*. Na základě těchto informací byly zmíněné rostliny a jejich metabolity podrobeny rozboru s cílem získat nová antimalarická léčiva.⁸⁰

Vhodnost užití ukázaly při testech speciální alkaloidy, alkaloidy čeledi Amaryllidaceae mající vysoký inhibiční potenciál proti druhu *Plasmodium falciparum*, stejně tak jejich deriváty. Osm z nich bylo syntetizováno a testováno proti lékově rezistentnímu kmenu K1 a proti citlivému kmenu FCR3.⁸² Nejúčinnější se zdají být deriváty lykorinu. Z proběhlých studií 27 derivátů vyplývá, že pro vztah struktura–účinek je důležitá přítomnost volné hydroxylové skupiny v poloze C-1 a C-2, nebo esterifikace za vzniku acetátů a isobutyrtů. Pro očekávaný účinek je důležitá přítomnost dvojně vazby mezi C-2 a C-3.^{25,80} Pro skupinu látek odvozených od *seko*-lykorinu (otevřený kruh C) dochází dle výsledků ke zvýšení aktivity u alkaloidů s methylenedioxy skupinou nahrazenou skupinami hydroxylovými nebo acetátovými a methylsubstituentem na dusíku.⁸¹ Z připravených látek vykázaly vhodný potenciál deriváty 1-*O*-(3'S)-hydroxybutanoyllykorin, 1-*O*-(3'R)-hydroxybutanoyllykorin, 1,2-di-*O*-butanoyllykorin a 1-*O*-propanoyllykorin.⁸⁰

Nedávno provedená studie zjistila antimalarickou aktivitu i u haemanthaminového strukturního typu. Pro ni je důležitá opět přítomnost dvojně vazby mezi C-1 a C-2

a volná hydroxylová skupina v poloze C-11.²⁵ Dle výsledů se jako aktivní jevil haemanthamin a 6-deoxyhaemanthamin. Testovaná byla už i řada derivátů, kde nejlepších výsledků dosáhl 3,11-dinikotyl-11-hydroxyvittatin ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,06 \mu M$).^{25,82}

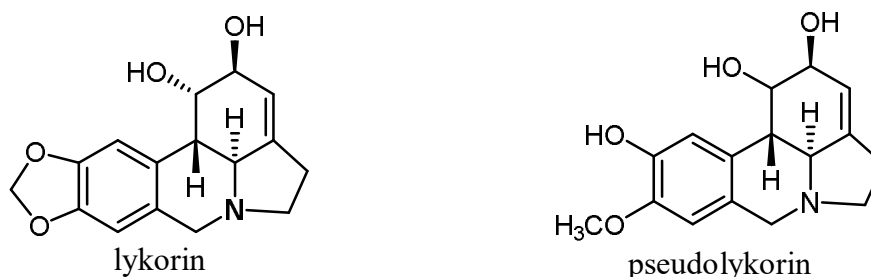
Mezi další biologické aktivity patří antivirotická, antiparazitární, antidepressivní a antikonvulzivní, ty ale prozatím nebyly studovány podrobněji a výsledků je málo.

3.3. Deriváty amarylkovitých alkaloidů vyvolávající cytotoxicitu

3.3.1. Lykorinové deriváty

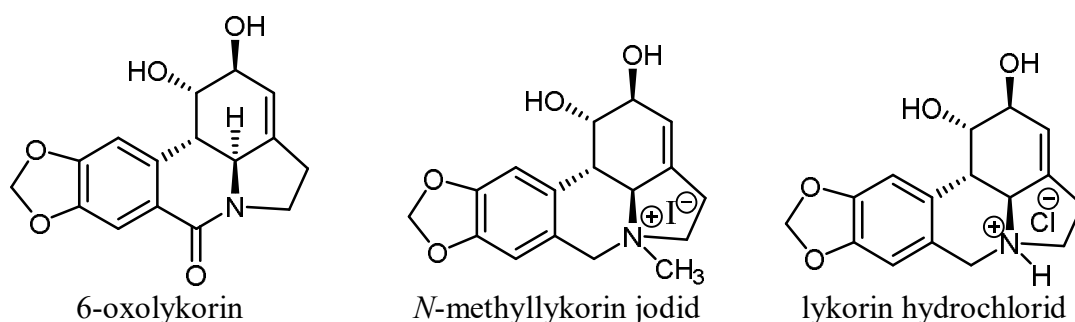
Jak již bylo řečeno v předchozím textu, pro vyvolání cytotoxického účinku alkaloidů typu lykorinu je důležité strukturní uspořádání. Tyto hlavní body vycházejí ze struktury nejzajímavější látky skupiny, lykorinu. Jedná se o konformační volnost v kruhu C, stereochemii na spojení kruhů C/D, diolové skupiny na kruhu C.²⁵

Modifikací kruhu A získáme látky s nižším účinkem, což bylo prokázáno na struktuře lykorinu a pseudolykorinu (Obr. 16). Ve většině prováděných testů byl pseudolykorin méně toxický na nádorové linie a v několika případech působil aktivně na buňky zdravé.²⁸ Ovlivníme-li zároveň s kruhem A substituci na kruhu C, získáme opět látky s nižší cytotoxickou aktivitou. Pro zachování účinku je tedy nutná přítomnost methylenedioxy skupiny na kruhu A.²⁸



Obr. 16: Porovnání struktur lykorinu a pseudolykorinu

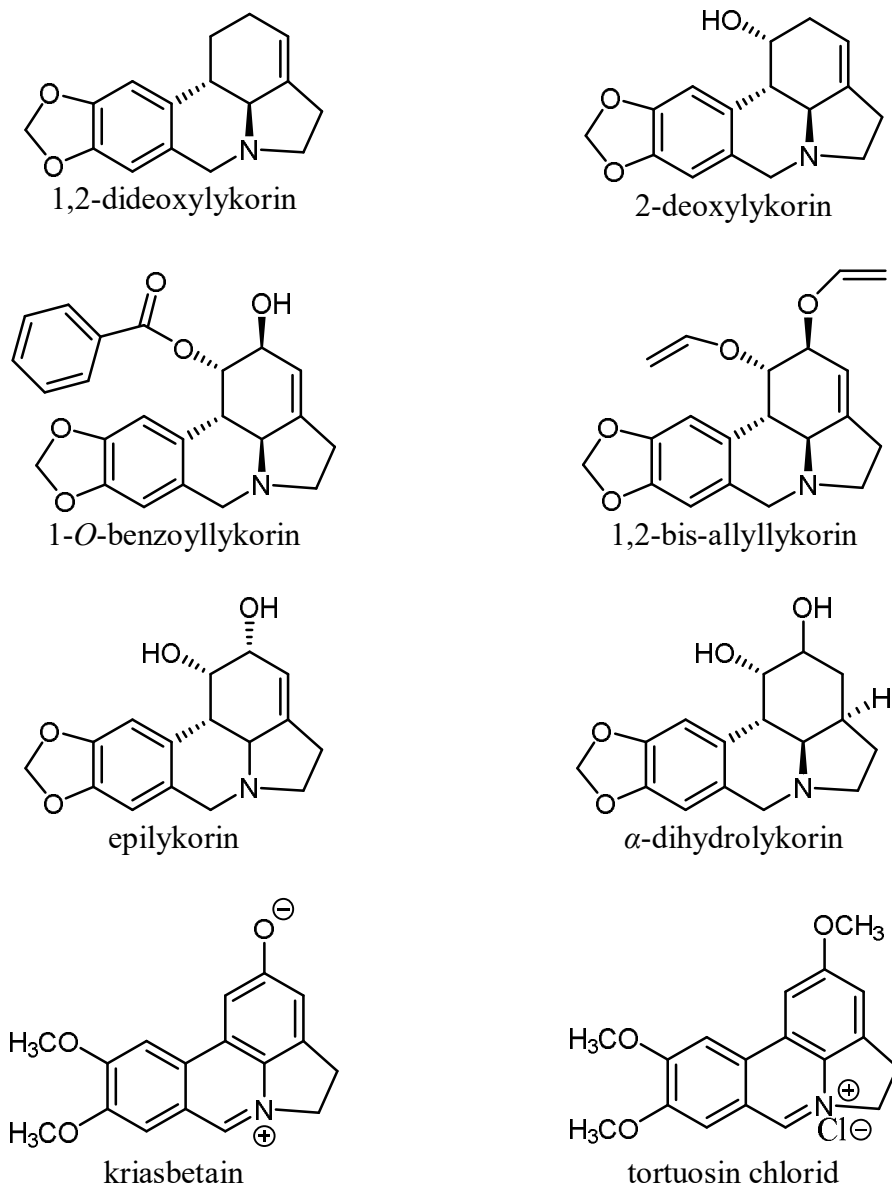
Oxidací kruhu B vzniká cyklický amid – laktam. Takováto změna v molekule není pro účinek žádoucí. Na příkladu 6-oxolykorinu (Obr. 17) byla zjištěna neaktivita ($IC_{50} > 100 \mu M$) vůči několika testovaným liniím. Ve stejné studii vykázal lykorin aktivitu na buňky pohybující se v rozmezí $0,9\text{--}8,5 \mu M$.⁸³ Další možnou obměnou kruhu B je kvarternizace dusíkového atomu, např. u *N*-methyllykorinjodidu (Obr. 17). I tato obměna ve srovnání s lykorinem aktivitu snižuje.^{6,28,84} Jestliže však podrobíme lykorin derivatizaci na dusíku získáme lykorin hydrochlorid (Obr. 17), který vykazuje slibnou toxicitu proti 44 testovaným nádorovým liniím s hodnotami $IC_{50} < 5 \mu M$ a naopak na buněčnou linii normálních lidských fibroblastů nepůsobí ($IC_{50} > 100 \mu M$).^{28,85}



Obr. 17: Porovnání struktur lykorinu s obměnou kruhu B

Kruh C můžeme opět modifikovat na několika místech C-1,2,3 nebo C-4. Na pozicích C-1 a C-2 je vhodná oxoskupina (především $-OH$), jestliže dojde k jejímu odstranění, vzniklé 1,2-di-deoxy (lycoren) a 2-deoxyderiváty (karantin) jsou ve srovnání s lykorinem velmi málo aktivní (Obr. 18).^{6,28,84} Obecně řečeno, látky vzniklé acylací a alkylací na těchto pozicích jsou méně účinné.⁸³ Výjimkami jsou 1-*O*-benzoyllykoricin a 1,2-bis-allyllykoricin (Obr. 18), u nichž zůstává cytotoxický účinek na nádorové lince lidského glioblastomu U373 zachován ($IC_{50} = 0,6 \mu M$ a $0,03 \mu M$).⁸³ Prostorové uspořádání je v biochemii důležité pro vazbu na substrát a vyvolání požadovaného účinku. Jinak tomu není ani v případě lykorinu. Zachované $-OH$ skupiny s jinou stereochemií oproti lykorinu najdeme u 2-epi-lykoricinu (Obr. 18), jehož protinádorový účinek je pouze mírný.²⁸ Zaměříme-li pozornost na dvojnou vazbu kruhu C, můžeme ji hydrogenovat za vzniku dvou izomerů, 4- α a β -dihydrolykoricinu (Obr. 18). Jejich aktivita je mírná.²⁸ Při posunu vazby do pozic 2,3 nebo 4,11 se aktivita také snižuje.^{6,28,83,84}

Ani testování několika látek s aromatizovaným kruhem C nevedlo k požadované aktivitě.²⁸ Výjimkou jsou deriváty ungeremin, ungeremin hydrochlorid, kriasbetain a tortuosin chlorid (Obr. 15, Obr. 18). Na jejich účinku se podílí aromatizovaný kruh B (jako takový ke zvýšení aktivity nevede) a vznik amoniového kationtu. Ungeremin se stal v poslední době běžně testovanou látkou, ze studovaných linií má nejlepší účinek na buňky lidského lymfomu MOLT4 ($IC_{50} = 0,7 \mu M$).⁸⁶ Tortuosin chlorid je pozoruhodná látka, na základě jejího účinku se řadí k nejvíce aktivním sloučeninám lykoricinového typu. Účinnost zjištěná na lidském glioblastomu SF-268 je $GI_{50} = 0,0174 \mu M$.⁸⁷



Obr. 18: Obměny struktury lykorinu na kruhu C

3.3.2. Haemanthaminové a krininové deriváty

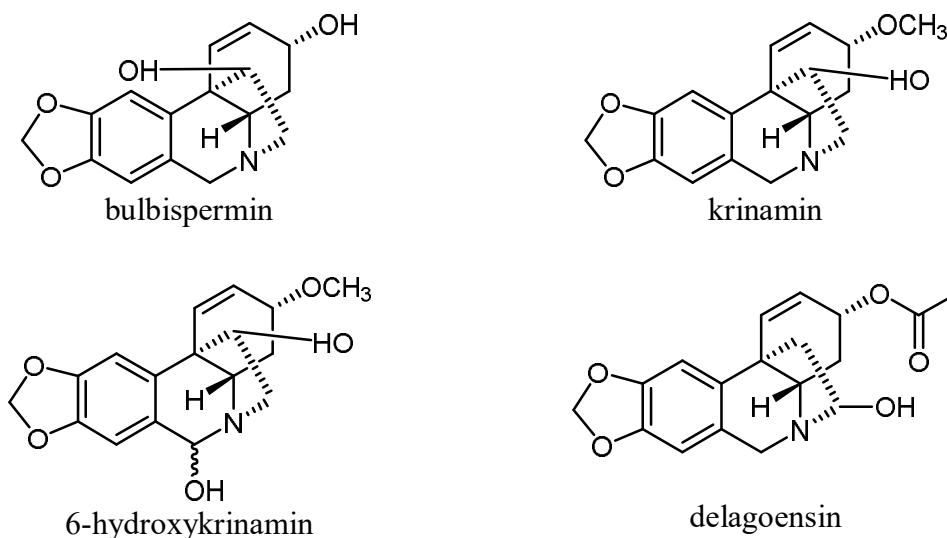
Objasnění a následné zvýšení cytotoxického účinku je u haemanthaminových a krininových alkaloidů cílem studie vztahu struktura–účinek. Ve struktuře existuje několik míst a funkcí, které byly pro účinek shledány jako nezbytné.¹⁶ Jedná se například o neporušené fenantridinové jádro, které je základem účinku u alkaloidů pankratistatinového typu. Dokladem tohoto tvrzení jsou již zmíněné alkaloidy krinafolin a méně účinný krinafilidin s otevřeným kruhem B (*seco*-B). Kvarternizace dusíku není pro účinek žádoucí.¹⁶

Na kruhu A se jedná o přítomnost metylenedioxy skupiny. 8-*O*-demethylmaritidin, který tuto skupinu postrádá, je méně aktivní. Procesem, který naopak domnělou cytotoxicitu zvyšuje je oxygenace a to z důvodu podobnosti s pankratistatinovým strukturním typem. Takový potenciál můžeme vidět u distichaminu (Obr. 10).¹⁶

Pro účinek jsou dále vhodné malé substituenty s vnitřní (bulbispermin) nebo vnější (krinamin) schopností tvorby vodíkové donorakceptorové vazby v poloze C-11 (β k dusíkovému atomu). Méně vhodné už jsou substituce na α uhlíku vzhledem k dusíku na C-6 (6-hydroxykrinamin) nebo C-12 (delagoensin) (Obr. 19).¹⁶

V působení na většinu buněčných linií hraje roli poloha 5,10*b*-etanového můstku, účinné látky byly však nalezeny jak v haemanthaminovém tak krininovém typu.¹⁶

Zmíněné charakteristické rysy jsou cílem výzkumu vedoucího k získání látek použitelných v klinické praxi.

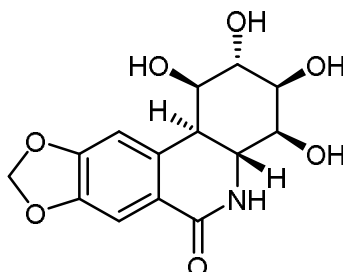


Obr. 19: Obměny haemanthaminové struktury

3.3.3. Deriváty pankratistatinu a narciklasinu

Pankratistatin (Obr. 7) a jeho deriváty jsou podrobovány testům za účelem najít látky s vyšší cytotoxickou aktivitou. SAR studie (vztah struktura–účinek) pankratistatinu naznačily, že pro protinádorovou aktivitu je důležitá přítomnost 7-hydroxyskupiny a zachování amino inositolového motivu. Pro její zvýšení je vhodný velký hydrofóbní zbytek na C-1. Jestliže odstraníme další kyslík z kruhu A (jiný než v poloze 7 v OH-skupině), snížíme tím účinek v porovnání s pankratistatinem 100-krát,

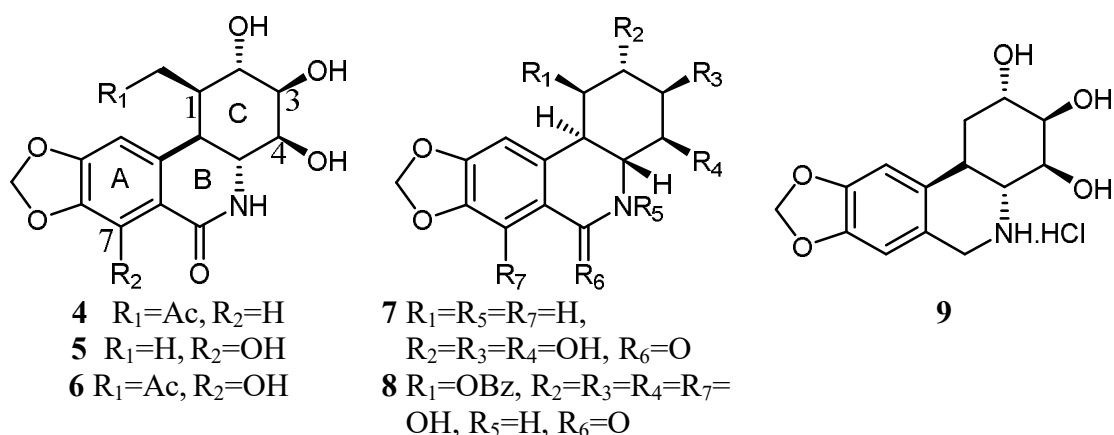
s 7-deoxypankratistatinem 10-krát.⁸⁸ Pro zachování účinku se zdá být důležité *trans* spojení kruhu B/C, *cis* uspořádání kruhu vede ke ztrátě aktivity. Důležitost je přisuzována i C-2, C-3, C-4 hydroxyskupinám, avšak nahradíme-li polyhydroxyskupiny pankratistatinu skupinami methoxylovými, zvýší se tím afinita ke kaspáze 3 v buňkách Jurkat.⁸⁹



Obr. 20: Struktura 7-deoxypankratistatinu

Molekula narciklasinu (Obr. 7) se dá modifikovat na pěti místech různými substituenty, jak můžeme vidět v tabulce (Tabulka 8). Podle výsledků, které přehledně shrnuje, můžeme usuzovat vztahy mezi strukturou a účinkem. Různé derivatizace v polohách R-4 a R-5 vedou ke vzniku látek, které cytotoxicitu postrádají. Pro účinek derivátů narciklasinu jsou tedy důležité: R-4 volný laktamový karbonyl, R-5 volná hydroxylová fenolická skupina a přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky C-1 a C-10. Při monoesterifikaci hydroxyskupiny v poloze R-1 dojde *in vitro* k zachování či zvýšení protinádorové aktivity, způsobené nejspíše hydrolyzou esteru.²⁵ Například u 7-*O*-methylderivátu lykoricindiolu (substituce na R-5) se na rozdíl od narciklasinu snížil účinek o dva až tři řády.^{lit}

Studie několika spolupracovníků objevila potenciální proléčivo narciklasinu,⁹⁰ narciklasin 4-*O*- β -D-glukopyranosid (18 v Tabulka 8), s protinádorovou účinností podobnou narciklasinu a vysokou orální biodostupností.⁹¹ Jeho výhodou je malá degradace < 20 % po působení média s pH = 2 po dobu 1 hodiny a vysoká stabilita 92 % ve fyziologickém pH = 7. Díky tomuto proléčivu dochází po perorálním podání ke zvýšené dostupnosti narciklasinu na 52 %. Při testování na dva modely glioblastomu GBM dokonce projevil narciklasin 4-*O*- β -D-glukopyranosid aktivitu při dávce 1mg/kg, zatímco narciklasin nikoli.⁴⁹ Svými vlastnostmi se tak zařadil k vhodným kandidátům pro testování účinku po perorálním a intravenózním podání.



Obr. 21: Analoga pankratistatinu

Tabulka 7: Hodnoty IC_{50} pankratistatinu a jeho vybraných derivátů na různé nádorové linie (Obr. 21)^{88,92}

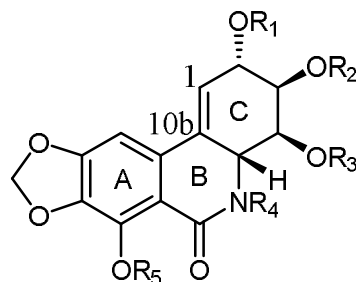
Testovaná analoga	Buněčné linie, IC_{50} (μM)			
	BXPC-3	DU-145	NCI-H460	MCF-7
1	0,061	0,046	0,098	0,071
2	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
3	$0,77 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,06$
4	$0,34 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,27$	$0,53 \pm 0,01$	$1,81 \pm 1,2$
5	$0,22 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$
6	$0,07 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,47$
7	0,039	0,021	0,03	0,017
8	0,0044	0,00049	0,00023	0,00072
9	14	> 10,2	10,8	10,8


1 pankratistatin, **2** narciklasin, **3** lykoricidin (Obr. 7)

BXP-3 – buněčná linie adenokarcinomu pankreatu; DU-145 – b. rakoviny prostaty;

NCI-H460 – b. rakoviny plic; MCF-7 b. adenokarcinomu prsu

Tabulka 8: Hodnoty IC₅₀ narciklasinu a jeho vybraných derivátů na různé nádorové linie⁴⁹



Testovaná analoga						Buněčné linie, IC ₅₀ (μM)							
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	PC-3	U373	BxPC3	LoVo	A549	MCF-7	Median	Stabilita %
2	H	H	H	H	H	0,03	0,03	0,03	0,09	0,03	0,06	0,03	100
10	H	H	H	H	Et	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	96
11	H	H	H	Et	H	> 10 ,	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	100
12	Ac	H	H	H	H	0,1	0,1	0,07	0,3	0,1	0,4	0,1	20
13	Bz	H	H	H	H	0,03	0,03	0,004	0,05	0,04	0,2	0,04	82
14	PrCO	H	H	H	H	0,005	0,03	0,003	0,05	0,03	0,03	0,03	29
15	Ac	H	H	H	Ac	0,3	0,06	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	56
16	H	H	SO ₃ Na	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	100
17	OTBS	C(Me) ₂		H	H	> 10	2	8	3	> 10	4	> 10	nt
18	H	H	H	H		0,8	0,7	1	2	2	2	1,5	92

nt netestováno, OTBS *o*-*tert*-butyldimethylsilyl

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál, chemikálie a metody

4.1.1. Amaryllidaceae alkaloidy

Veškeré použité alkaloidy byly izolovány v dostatečném množství na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za účelem studia vztahu struktura–účinek. Pro syntetické obměny byly vybrány alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin izolované z cibulí *Zephyrantes robusta*.⁶⁷ Výběr se uskutečnil na základě již provedených studií, které ukázaly jejich potenciál pro využití v chemoterapii.^{7, 16,93}

4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla

- Etanol, p.a. (Penta)
- Chloroform, p.a. (Penta)
- Pyridin, p.a. (Penta)
- Acetanhydrid, $\geq 99\%$ (Acros)
- Isobutyrylanhydrid, $\geq 99\%$ (Acros)
- Propionylanhydrid, $\geq 99\%$ (Acros)
- Jodid draselný, p.a. (Penta)
- Kyselina chlorovodíková, p.a. (Penta)
- Dusičnan bismutitý zásaditý, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)
- Kyselina vinná, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)
- Metanol, LC-MS chromasolv (Fluka)
- Dragendorffovo činidlo (připravováno v laboratoři)⁹⁵

4.1.3. Materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

- Kieselgel SiO₂ 60 F254, Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC; hloubka vrstvy 0,2 mm.
- Silikagel 60 GF254, Merck; pro přípravu litých desek.

4.1.4. Vytvářecí soustavy pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

S1: cHx : Et₂NH – 9 : 1

S2: cHx : Et₂NH – 95 : 5

S3: To : Et₂NH – 95 : 5

4.1.5. Strukturní analýza připravených derivátů

4.1.5.1. GC-MS analýza

GC-MS analýza byla použita za účelem určení molekulové hmotnosti připravených látek. K analýzám byl použit plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v EI režimu při 70 eV. K separaci byla použita kolona typu DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Teplotní rozsah byl od 100–300 °C, přičemž v rozmezí teplot od 100–180 °C vzrůstala teplota o 15 °C/min. Při dosažení 180 °C byla po dobu jedné minuty tato teplota udržována a následně stoupala do 300 °C rychlostí 5 °C/min a poté opět na této hodnotě udržována 40 minut.

Teplota nástřiku vzorku na kolonu byla 280 °C s rychlostí průtoku nosného plynu (hélia) 0,8 ml/min. Detekční rozmezí *m/z* 35–600. Koncentrace nastříkovaného vzorku v metanolu byla 1 mg/ml.

Získané známé látky byly porovnány s daty v literatuře, strukturně nepopsané látky byly charakterizovány poprvé.

4.1.5.2. ESI-MS analýza

Látky obtížně ionizující za podmínek měření EI spekter byly analyzovány za účelem získání hodnot *M_r* pomocí ESI ionizace na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Látky pro prováděné experimenty byly rozpuštěny v metanolu (1 mg/ml).

4.1.5.3. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza)

Tato metoda byla použita za účelem určení přesné hodnoty nově připravených, v literatuře dosud nepopsaných sloučenin. Hmotnostní spektra byla měřena spektrometrem s vysokým hmotnostním rozlišením UHPLC Waters Acquity I-Class s ionizací elektrosprejem v kladném módu, a kombinovaným analyzátozem – kvadrupól s analyzátozem doby letu Waters Synapt G7-Si. Vzorky byly měřeny v roztoku MeCN. Následně došlo k porovnávání teoretického m/z experimentálně zjištěným.

4.1.5.4. NMR analýza

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 případně CD_3OD při teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$ na spektrometru Varian Iniova 500 pracujícím při $499,87\text{ MHz}$ pro ^1H jádra a $125,70\text{ MHz}$ pro ^{13}C jádra. K ozařování a detekci signálu byla použita OneNMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl_3 jsou u atomů ^1H $\delta = 7,26\text{ ppm}$ a u atomů ^{13}C $\delta = 77,0\text{ ppm}$, pro CD_3OD jsou u atomů ^1H $\delta = 3,30\text{ ppm}$ a u ^{13}C $\delta = 49,0\text{ ppm}$. Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

4.1.5.5. Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů při $20\text{ }^\circ\text{C}$ na automatickém polarimetru ADP 220 BS v prostředí metanolu nebo etanolu a specifická otáčivost byla dopočtena dle vzorce:

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

t – teplota měření

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

α – naměřená otáčivost [$^\circ\text{C}$]

c – koncentrace naměřeného alkaloidu [$\text{g} \times 100\text{ ml}^{-1}$]

l – délka kyvety [dm]

4.1.6. Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin

4.1.6.1. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

Inhibiční aktivita těchto enzymů byla měřena na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření prováděl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a to ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany, pod vedením plk. doc. PharmDr. Daniela Juna, Ph.D. Podrobný popis této metody je možno nalézt v následující literatuře (Cahlíková et al., 2011).⁶⁰

4.1.6.2. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči POP

Měření inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase bylo uskutečněno ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany Hradec Králové. Měření prováděla Mgr. Martina Hrabínová. Podrobný popis metody je možno nalézt v následující literatuře (Cahlíková et al., 2015).⁹⁴

4.1.6.3. Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů

Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze. Testování prováděl Ing. Ivo Doskočil a podrobný popis prováděných experimentů je možno nalézt v následující literatuře (Doskočil et al., 2015).⁹³

Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů na dalších liniích bylo dále provedeno ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, za využití systému xCELLigence. Testování prováděl RNDr. Radim Havelek, Ph.D.

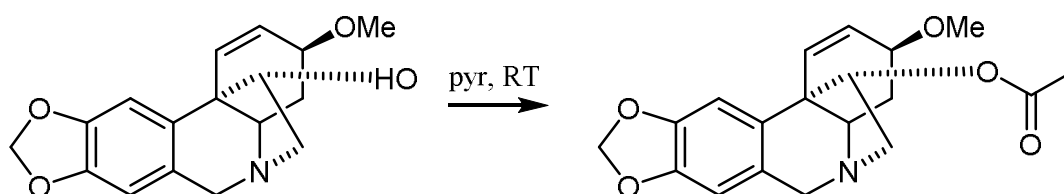
4.2. Přípravy syntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidů a jejich strukturní identifikace

Alkaloidy použité pro přípravu polosyntetických analog byly vybrány s ohledem na jejich biologickou aktivitu a na skutečnost, zda byly tyto látky izolovány v množstvích dovolujících přípravu cílených analog. Z těchto důvodů byly pro přípravu pilotních derivátů vybrány alkaloidy haemanthidin, haemanthamin a lykordin izolované z cibulí rostliny *Zephyranthes robusta*.⁶⁷

Struktury syntetizovaných látek byly určeny na základě interpretace hmotnostních spekter, ¹H- a ¹³C-NMR spekter, optické otáčivosti a porovnáním získaných dat s literaturou.^{1,2} Nově získané látky byly strukturně charakterizovány.

4.2.1. Syntéza a strukturní analýza derivátů haemanthaminu

4.2.1.1. Příprava 11-*O*-acetylhaemanthaminu (LC-6)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄

Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₁₉H₂₁NO₅

Molární hmotnost: 343,38

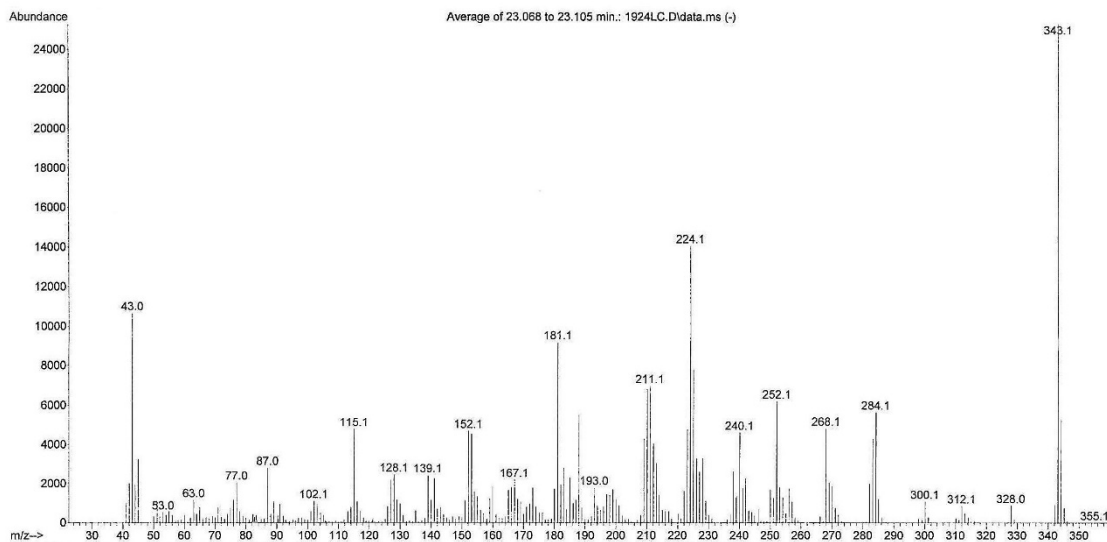
Obr. 22: Schéma syntézy 11-*O*-acetylhaemanthaminu

15 mg (0,05 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno v 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 100 μl (1,06 mmol) acetanhydridu. Směs byla míchána při pokojové teplotě 3 hodiny. Reakční směs byla poté odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To : Et₂NH 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 14 mg 11-*O*-acetylhaemanthaminu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 82 %.

Strukturní analýza 11-*O*-acetylhaemanthaminu (LC-6)

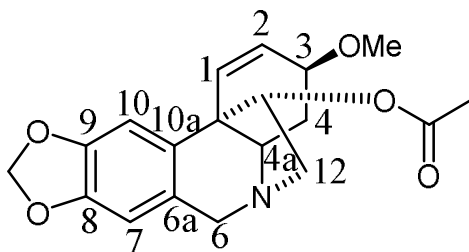
EI-MS studie

EIMS $m/(\%)$: 343 (M^+ , 100); 300 (4); 284 (17); 268 (12); 252 (16); 224 (28); 211 (16); 188 (11); 181 (19).



Obr. 23: EI-MS studie 11-*O*-acetylhaemanthaminu

NMR studie



Obr. 24: Struktura 11-*O*-acetylhaemanthaminu

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸²

6.89 (1H, s, H-10), 6.46 (1H, s, H-7), 6.32 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1), 6.15 (1H, dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 10.0$ Hz, H-2), 5.89 (2H, s, OCH_2O), 4.97 (1H, t, $J = 5.0$ Hz, H-11), 4.37 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-6), 3.84 (1H, br s, H-3), 3.75 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-6), 3.61 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-12), 3.39 (2H, m, H-4a, H-12), 3.35 (3H, s, OMe), 2.07 (2H, m, H-4), 1.96 (3H, s, OCOCH_3).

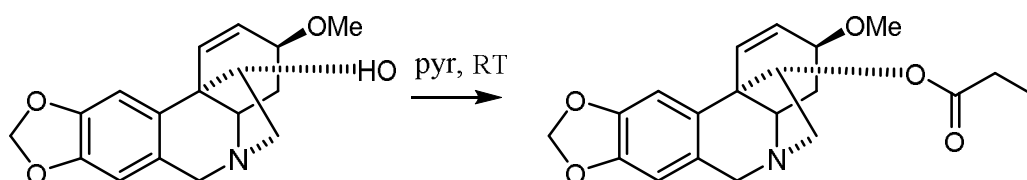
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸²

169.8 (s, OCOCH_3), 146.5 (s, C-9), 146.3 (s, C-8), 133.8 (s, C-10a), 129.3 (d, C-2), 127.2 (d, C-1), 125.8 (s, C-6a), 106.4 (d, C-7), 103.7 (d, C-10), 100.7 (t, OCH_2O), 79.9 (d, C-11), 72.2 (d, C-3), 62.7 (d, C-4a), 60.7 (t, C-12), 60.1 (t, C-6), 56.3 (q, OMe), 49.0 (s, C-10b), 27.8 (t, C-4), 21.0 (q, OCOCH_3).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5,6^\circ$ (c 0.98, EtOH).

4.2.1.2. Příprava 11-*O*-propionylhaemanthaminu (LC-12)



Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$

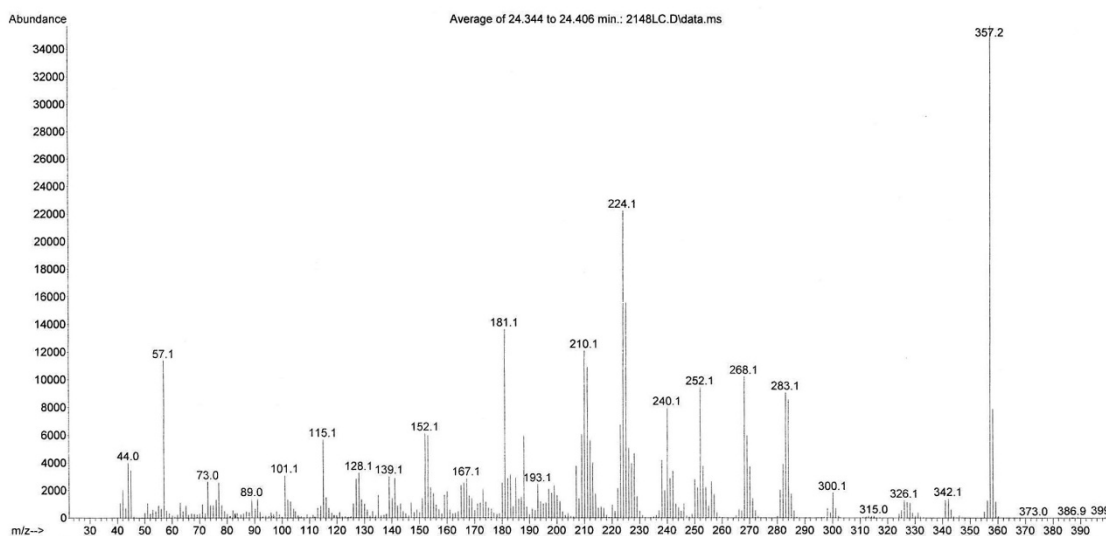
Molární hmotnost: 357,41

Obr. 25: Schéma syntézy 11-*O*-propionylhaemanthaminu

56 mg (0,186 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 150 μl (1,17 mmol) propionylanhydridu. Směs byla míchána při pokojové teplotě 12 hodin. Reakční směs byla poté odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla $\text{To} : \text{Et}_2\text{NH}$ 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 30 mg 11-*O*-propionylhaemanthaminu ve formě bezbarvého oleje. Výtěžek reakce byl 45 %.

Strukturní analýza 11-*O*-propionylhaemanthaminu (LC-12)

EI-MS studie

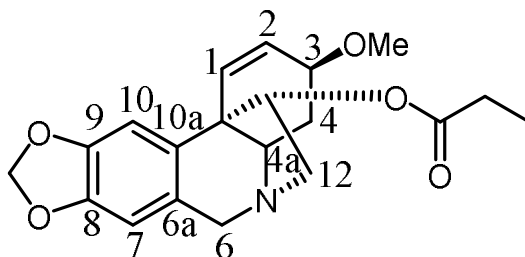


Obr. 26: EI-MS studie 11-*O*-propionylhaemanthaminu

ESI-HRMS studie

m/z experimentální – 358,1657 (*m/z* teoretická – C₂₀H₂₃NO₅ [M+H]⁺ 358,1649)

NMR studie



Obr. 27: Struktura 11-*O*-propionylhaemanthaminu

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.89 (1H, s, H-10), 6.45 (1H, s, H-7), 6.33 (1H, d, *J* = 10,3 Hz, H-1), 6.13 (1H, dd, *J* = 10,3 Hz, *J* = 4,9 Hz, H-2), 5.89–5.87 (2H, m, OCH₂O), 4.96 (1H, dd, *J* = 7,3 Hz, *J* = 6,8 Hz, H-11), 4.33 (1H, d, *J* = 17,1 Hz, H-6), 3.84–3.79 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, d, *J* = 17,1 Hz, H-6), 3.42–3.32 (2H, m, H-12), 3.34 (3H, s, OCH₃), 3.29 (1H, dd,

$J = 14,2 \text{ Hz}$, $J = 3,9 \text{ Hz}$, H-4a), 2.30–2.16 (2H, m, OCOCH₂), 2.06–1.99 (1H, m, H-4), 1.93 (1H, dt, $J = 13,7 \text{ Hz}$, $J = 3,9 \text{ Hz}$, H-4), 1.08 (3H, t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, CH₃).

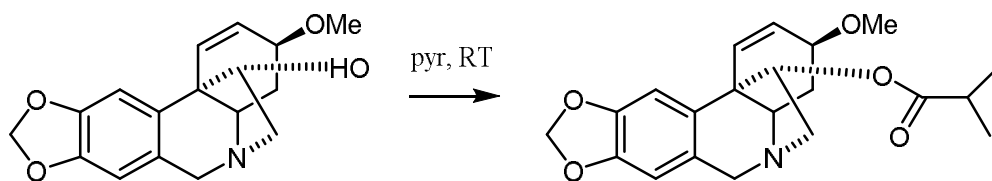
¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

173.3 (OCO), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 134.3 (C-10a), 129.3 (C-1), 127.7 (C-2), 126.5 (C-6a), 106.5 (C-7), 103.9 (C-10), 100.8 (OCH₂O), 80.0 (C-11), 72.5 (C-3), 62.7 (C-6), 61.2.7 (C-4a), 60.6 (C-12), 56.4 (OCH₃), 49.2 (C-10b), 28.3 (C-4), 27.8 (OCOCH₂), 9.0 (CH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{20} = -8,3^\circ$ (c 0.792, CHCl₃).

4.2.1.3. Příprava 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu (LC-11)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄

Molární hmotnost: 371,43

Sumární vzorec: C₂₁H₂₅NO₅

Molární hmotnost: 371,43

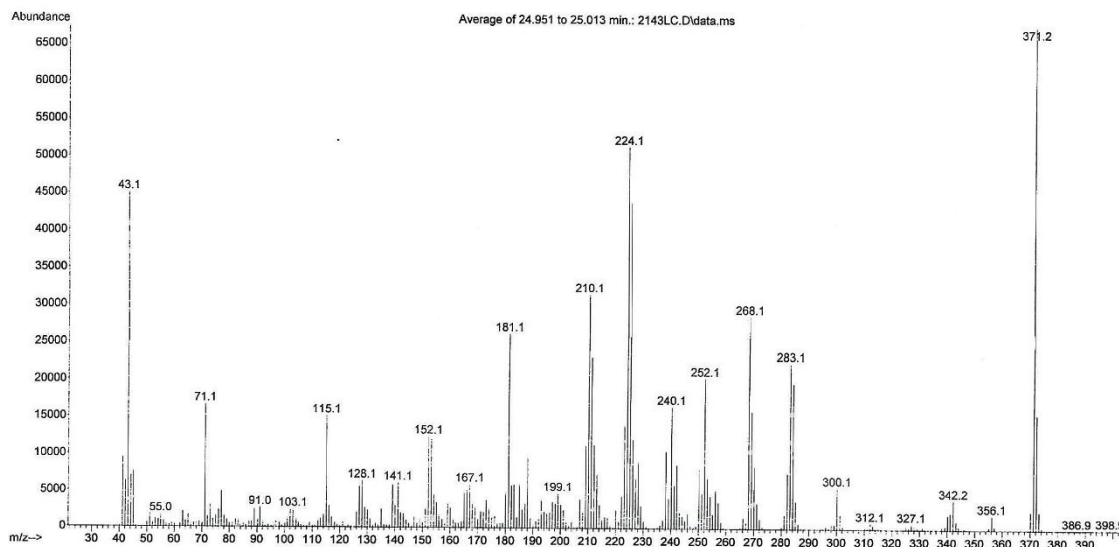
Obř. 28: Schéma syntézy 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu

64 mg (0,212 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 150 μ l (0,905 mmol) isobutyrylanhydridu. Směs byla míchána při pokojové teplotě 12 hodin. Reakční směs byla poté odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To : Et₂NH 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 21,5 mg 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu ve formě bezbarvého oleje. Výtěžek reakce byl 27 %.

Strukturní analýza 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu (LC-11)

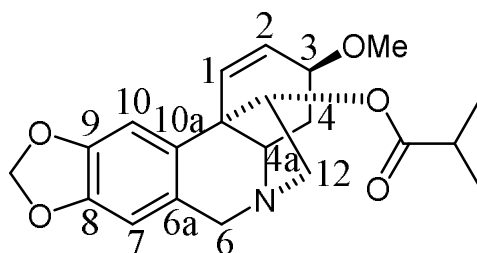
EI-MS studie

EIMS $m/(\%)$: 371 (M^+ , 100); 342 (6); 300 (12); 283 (30); 268 (35); 252 (20); 224 (53); 181 (24).



Obr. 29: EI-MS studie 11-*O*-isobutyrylhaemnthaminu

NMR studie



Obr. 30: Struktura 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸²

6.90 (1H, s, H-10), 6.45 (1H, s, H-7), 6.32 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-1), 6.13 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz, $J = 4,9$ Hz, H-2), 5.89–5.87 (2H, m, OCH₂O), 4.93 (1H, dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 3,4$ Hz, H-11), 4.34 (1H, d, $J = 16,6$ Hz, H-6), 3.83–3.79 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, d, $J = 17,1$ Hz, H-6), 3.42–3.32 (2H, m, H-12), 3.35 (3H, s, OCH₃), 3.28 (1H, dd,

$J = 14,2 \text{ Hz}$, $J = 3,4 \text{ Hz}$, H-4a), 2.49–2.38 (1H, m, OCOCH), 2.07–2.00 (2H, m, H-4), 1.10 (3H, d, $J = 6,9 \text{ Hz}$, CH₃), 1.10 (3H, d, $J = 6,9 \text{ Hz}$, CH₃).

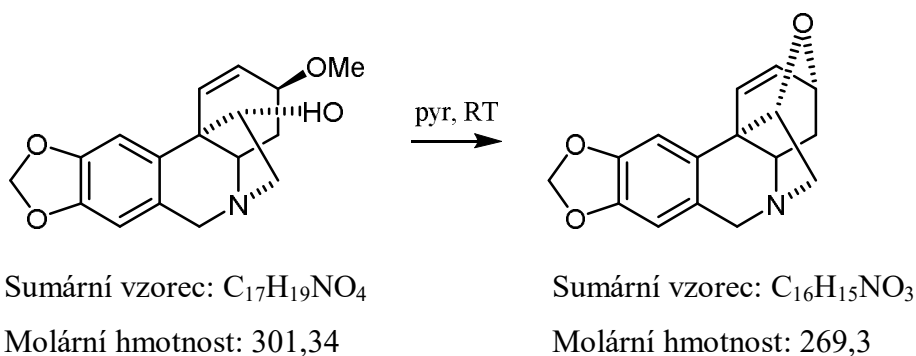
¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):⁸²

175.9 (OCO), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 134.3 (C-10a), 129.3 (C-1), 127.7 (C-2), 126.5 (C-6a), 106.5 (C-7), 103.9 (C-10), 100.8 (OCH₂O), 79.7 (C-11), 72.6 (C-3), 62.7 (C-6), 61.2 (C-4a), 60.6 (C-12), 56.4 (OCH₃), 49.2 (C-10b), 33.8 (C-4), 28.3 (OCOCH), 19.0 (CH₃), 18.6 (CH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{20} = +3,8^\circ$ (c 1.3, EtOH).

4.2.1.4. Příprava apohaemanthaminu (LC-25)



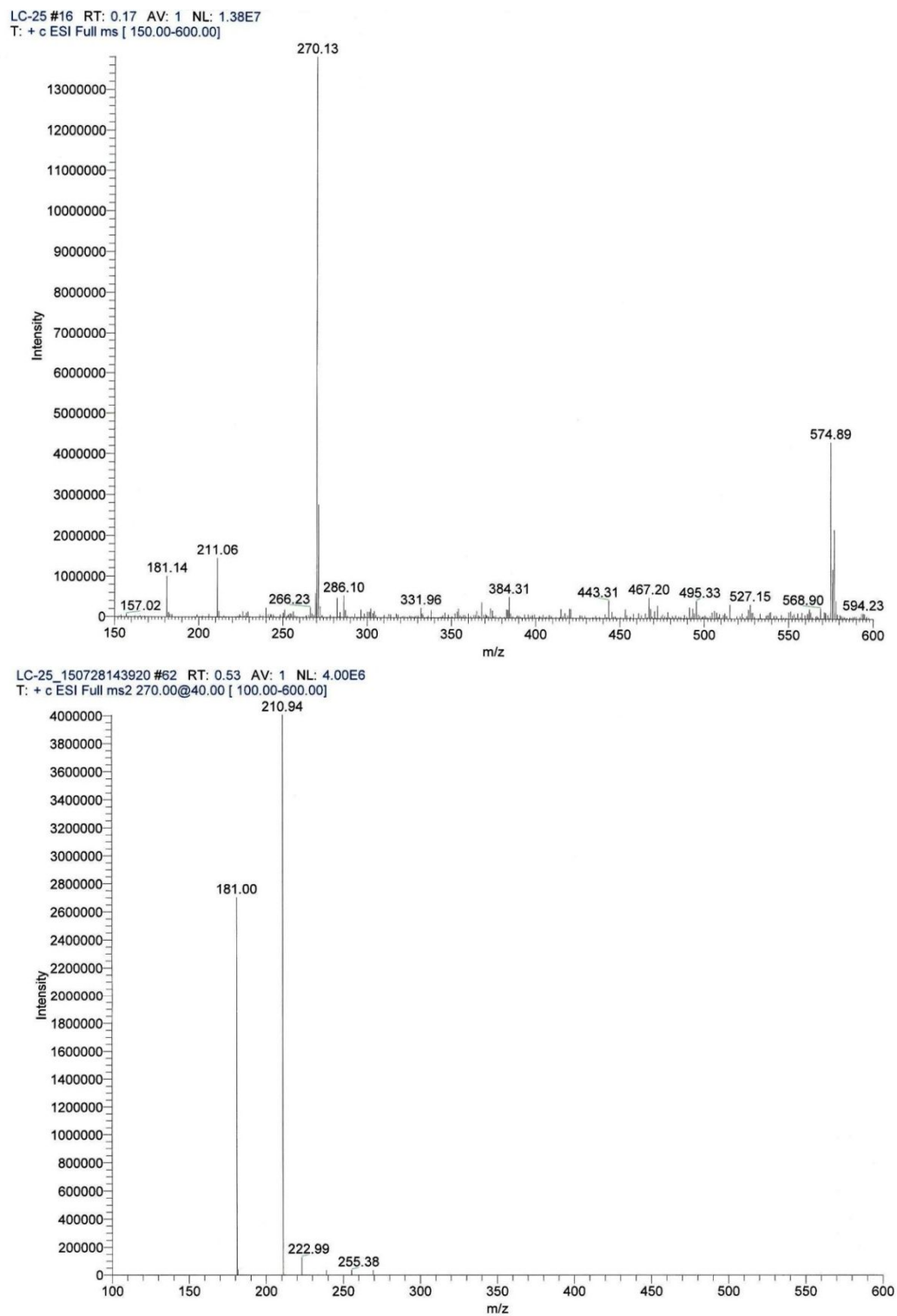
Obr. 31: Schéma syntézy 11-*O*-apohaemanthaminu

80 mg (0,265 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno v 5 ml 6M HCl a zahřáto na 100 °C. Směs byla zahřívána po dobu 4 hodin. Po zchladnutí reakční směsi byl přidán 10% Na₂CO₃ do pH hodnoty 9–10. Směs byla extrahována třikrát 20 ml CHCl₃. Organická fáze byla odpařena do sucha a přečištěna za využití preparativní TLC s mobilní fází To : Et₂NH 95 : 5. Bylo získáno 19 mg bílé pevné látky apohaemanthaminu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 27 %.

Strukturální analýza apohaemanthaminu (LC-25)

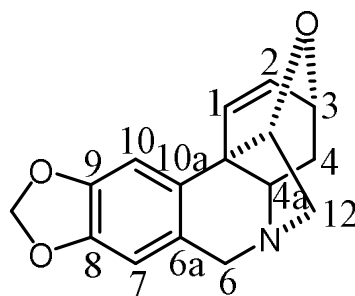
ESI-MS studie

ESI-MS $m/[M+H]^+$ 270(100). MS/MS $m/210,94$ (100), 181,00 (70).



Obr. 32: MS (nahore) a MS2 (dole) studie apohaemanthaminu

NMR studie



Obr. 33: Struktura apohaemanthaminu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸²

6.91 (1H, s, H-10), 6.80 (1H, dd, $J = 3.1$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H-2), 6.71 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-1), 6.57 (1H, s, H-7), 5.91 (1H, br s, OCH_2O), 5.90 (1H, br s, OCH_2O), 4.40 (1H, br s, H-3), 4.34 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-6), 3.81 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-6), 3.69 (1H, s, H-11), 3.21 (2H, s, H-12), 3.19 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, H-4a), 1.87 (2H, m, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , MeOD, 25 °C):⁸²

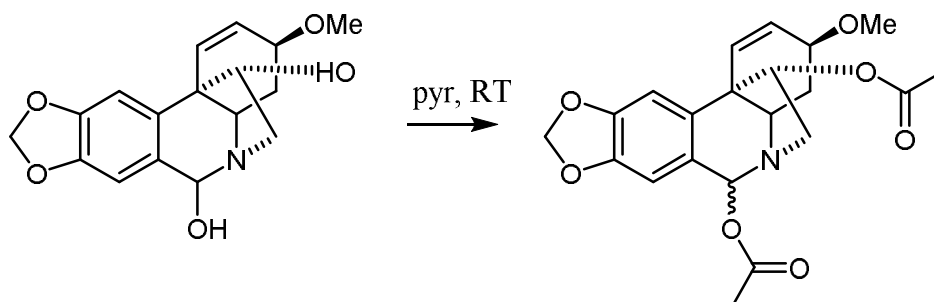
147.0 (s, C-9), 146.8 (s, C-8), 137.4 (d, C-2), 130.1 (s, C-10a), 128.5 (d, C-1), 124.9 (s, C-6a), 106.0 (d, C-7), 105.6 (d, C-10), 100.7 (t, OCH_2O), 80.2 (d, C-11), 64.6 (d, C-3), 60.5 (t, C-12), 60.3 (d, C-4a), 58.6 (t, C-6), 49.0 (s, C-10b), 34.1 (t, C-4).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +91,5^\circ$ (c 0.6, MeOH).

4.2.2. Syntéza a strukturní analýza derivátů haemanthidinu

4.2.2.1. Příprava 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu (LC-4)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₅

Molární hmotnost: 317,34

Sumární vzorec: C₂₁H₂₃NO₇

Molární hmotnost: 401,42

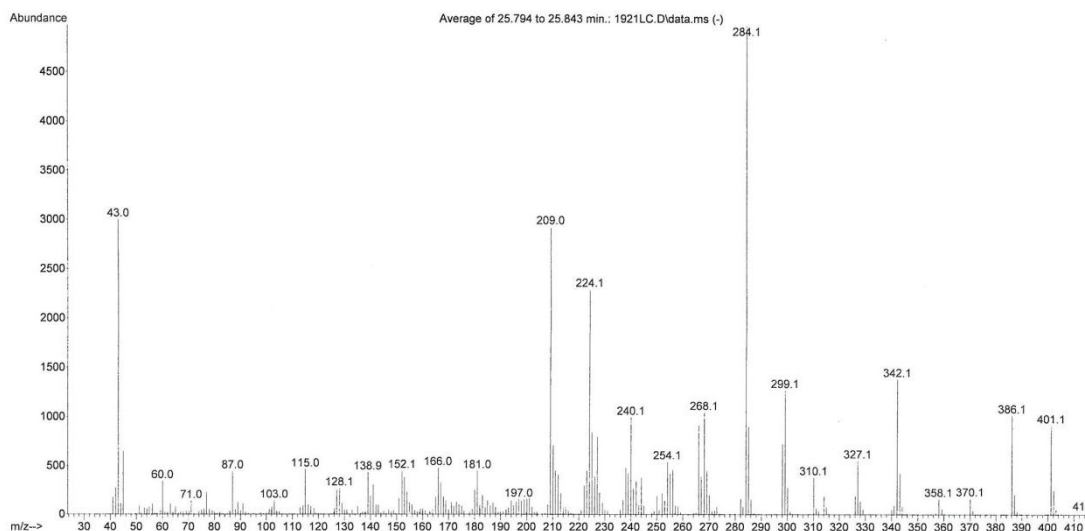
Obr. 34: Schéma syntézy 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu

20 mg (0,063 mmol) haemanthidinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně byl přidán 1 ml (10,6 mmol) acetanhydridu. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 3 hodiny, poté byla odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze cHx : Et₂NH 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 15,5 mg 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 61 %.

Strukturální analýza 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu (LC-4)

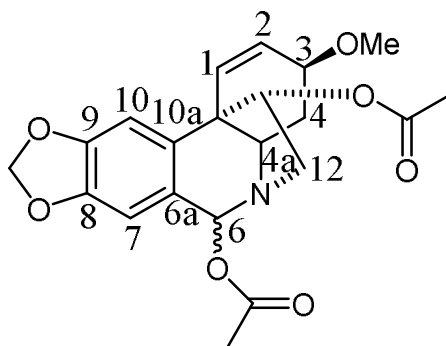
EI-MS studie

EIMS $m/(\%)$: 401 (M^+ , 32); 386 (20); 359 (19); 342 (47); 327 (16); 299 (36); 284 (100); 268 (37); 254 (27); 224 (49); 209 (66); 181 (18).



Obr. 35: EI-MS studie 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu

NMR studie



Obr. 36: Struktura 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸²

6.89 (1H, s, H-7), 6.63 (1H, s, H-10), 6.31 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-1), 6.18 (1H, dd, $J=4.8$ Hz, $J=10.2$ Hz, H-2), 6.12 (1H, s, H-6), 5.90 (2H, s, OCH_2O), 4.90 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-11), 3.85 (1H, br s, H-3), 3.62 (2H, m, H-12, H-4a), 3.43 (1H, d,

$J = 7.2$ Hz, H-12), 3.35 (3H, s, OMe), 2.12 (3H, s, OCOCH₃), 1.97 (3H, s, OCOCH₃), 1.92 (2H, m, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):⁸²

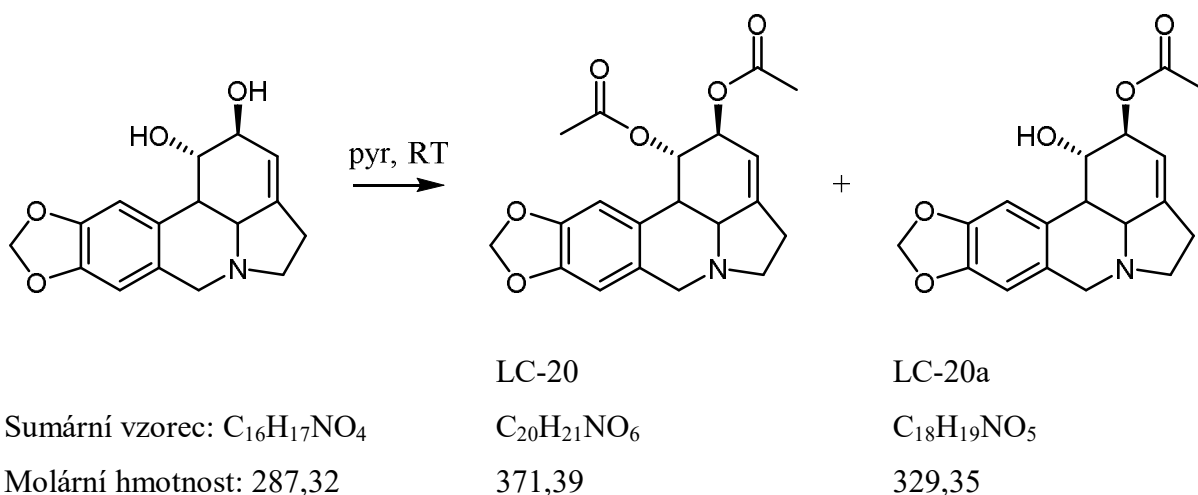
170.1 (s, OCCOCH₃), 169.9 (s, OCCOCH₃), 148.1 (s, C-9), 146.5 (s, C-8), 136.1 (s, C-10a), 129.6 (d, C-2), 126.6 (d, C-1), 124.6 (s, C-6a), 108.3 (d, C-7), 103.4 (d, C-10), 101.0 (t, OCH₂O), 86.3 (d, C-6), 78.5 (d, C-11), 72.0 (d, C-3), 58.2 (d, C-4a), 56.3 (q, OMe), 55.6 (t, C-12), 48.8 (s, C-10b), 27.6 (t, C-4), 21.2 (q, OCOCH₃), 20.9 (q, OCOCH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0,7^\circ$ (c 1.19, EtOH).

4.2.3. Syntéza a strukturní analýza derivátů lykorinu

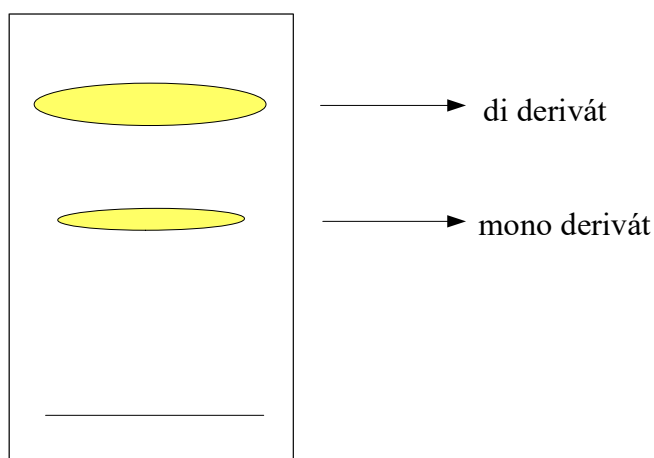
4.2.3.1. Příprava 1,2-di-*O*-acetyllykorinu (LC-20)



Obr. 37: Schéma syntézy 1,2-di-*O*-acetyllykorinu

40 mg (0,139 mmol) lykorinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 100 μ l (1,06 mmol) acetanhydridu. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 4 hodiny, poté byla odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze $To : Et_2NH$ 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 47 mg 1,2-di-*O*-acetyllykorinu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 91 %.

Z preparační desky byla izolována i druhá zóna, která byla promyta a bylo získáno 12 mg látky ve formě bílých krystalů, která byla na základě strukturní analýzy identifikována jako 2-*O*-acetyllykorin. Jedná se o vedlejší produkt reakce.

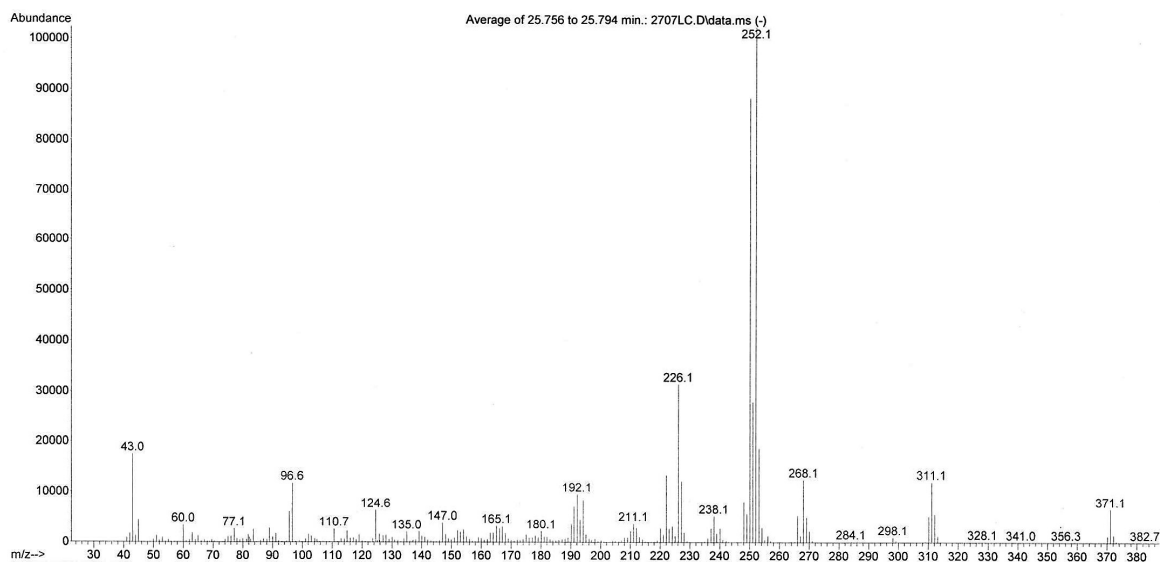


Obr. 38: TLC

Strukturální analýza 1,2-di-*O*-acetyllykorinu (LC-20, hlavní produkt reakce)

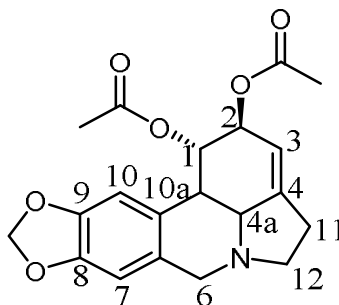
EI-MS studie

EIMS $m/(\%)$: 371 ($[M]^+$, 17); 311 (16); 268 (13); 252 (100); 238 (4); 226 (31); 222 (9); 192 (4).



Obr. 39: EI-MS 1,2-di-*O*-acetyllykorinu

NMR studie



Obr. 40: Struktura 1,2-di-*O*-acetyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸⁰

6.73 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, s, H-7), 5.89 (2H, br s, OCH_2O), 5.71 (1H, s, H-1), 5.51 (1H, s, H-3), 5.23 (1H, s, H-2), 4.14 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.51 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.35 (1H, dd, $J = 4.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H-12), 2.86 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-10b), 2.75 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4a), 2.62 (2H, br s, H-11), 2.39 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 17.4$ Hz, H-12), 2.05 (3H, s, OCOCH_3), 1.93 (3H, s, OCOCH_3) ppm.

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸⁰

169.7 (s, OCOCH_3), 169.5 (s, OCOCH_3), 146.1 (s, C-8), 146.0 (s, C-9), 145.8 (s, C-4), 129.1 (s, C-6a), 126.3 (s, C-10a), 113.5 (d, C-3), 107.0 (d, C-7), 104.8 (d, C-10), 100.7 (t, OCH_2O), 70.6 (d, C-2), 68.9 (d, C-1), 60.9 (d, C-4a), 56.6 (t, C-6), 53.3 (t, C-12), 40.2 (d, C-10b), 28.4 (t, C-11), 20.9 (q, OCOCH_3), 20.7 (q, OCOCH_3).

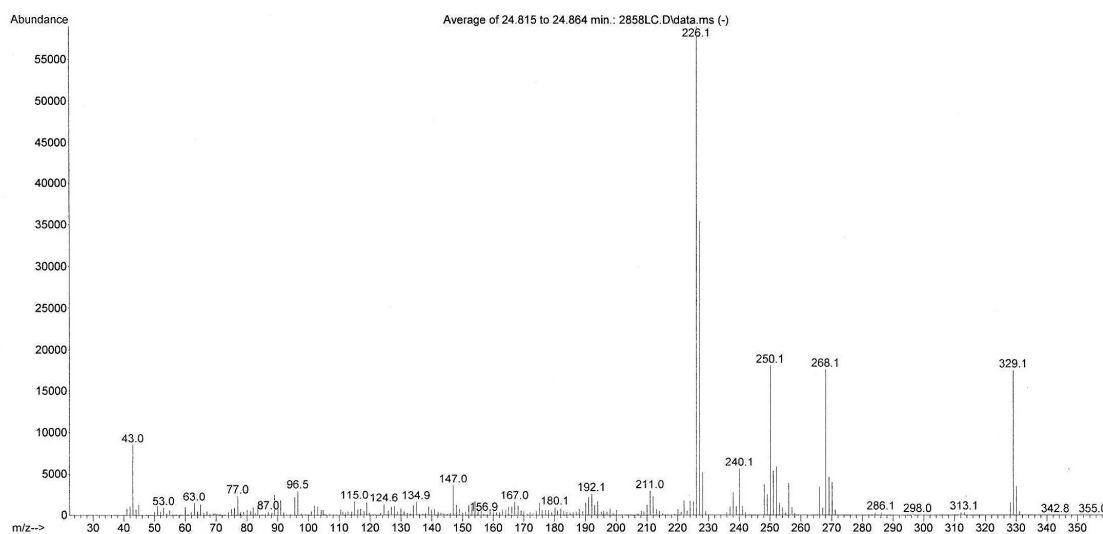
Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3,9^\circ$ (c 0.1, MeOH).

Strukturální analýza 2-*O*-acetylykorinu (LC-20a, vedlejší produkt reakce)

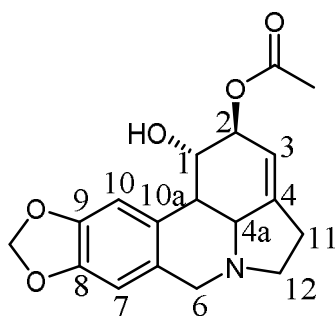
EI-MS studie

EIMS m/z (%): 329 (M^+ , 52); 268 (37); 250 (24); 240 (9); 226 (100); 192 (3).



Obr. 41: EI-MS 2-*O*-acetylykorinu

NMR studie



Obr. 42: Struktura 2-*O*-acetyllykorinu

^1H NMR (400 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸¹

6.81 (1H, s, H-11), 6.60 (1H, s, H-8), 5.94 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, OCH_2O), 5.92 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, OCH_2O), 5.47 (1H, m, H-3), 5.32 (1H, m, H-2), 4.52 (1H, s, H-1), 4.14 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-7 β), 3.53 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-7 α), 3.37 (1H, ddd, $J = 9.0, 4.5, 4.5$ Hz, H-5 β), 2.79 (1H, br d, $J = 10.4$ Hz, H-11c), 2.71 (1H, br d, $J = 10.4$ Hz, H-11b), 2.65 (2H, overlapped, H_2 -4), 2.38 (1H, ddd, $J = 8.9, 8.9, 8.9$ Hz, H-5 α), 2.09 (3H, s, COCH_3).

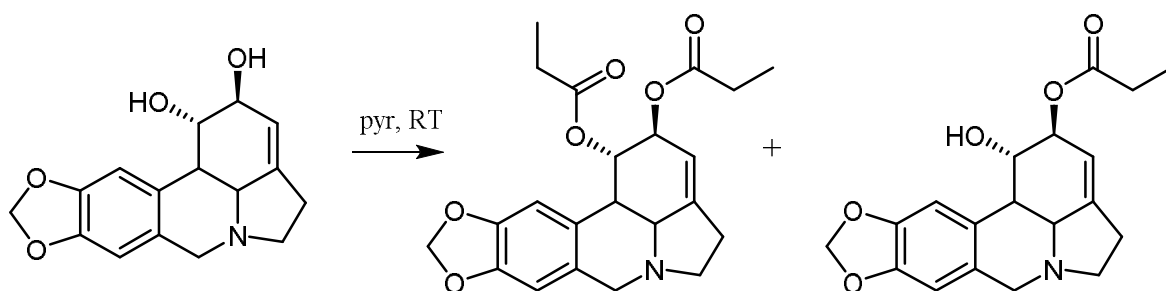
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸¹

170.6 (OCOCH_3), 146.6 (C-10), 146.4 (C-9), 146.0 (C-3a), 130.2 (C-11a), 127.0 (C-7a), 113.6 (C-3), 107.7 (C-8), 104.6 (C-11), 101.0 (OCH_2O), 73.7 (C-2), 69.4 (C-1), 60.7 (C-11c), 58.3 (C-7), 57.0 (C-5), 41.8 (C-11b), 29.4 (C-4), 21.3 (OCOCH_3).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30,8^\circ$ (c 0.052, CHCl_3).

4.2.3.2. Příprava 1,2-di-*O*-propionyllykorinu (LC-37)



LC-37

LC-37a

Sumární vzorec: $C_{16}H_{17}NO_4$

$C_{22}H_{25}NO_6$

$C_{19}H_{21}NO_5$

Molární hmotnost: 287,32

399,44

343,38

Obr. 43: Schéma syntézy 1,2-di-*O*-propionyllykorinu

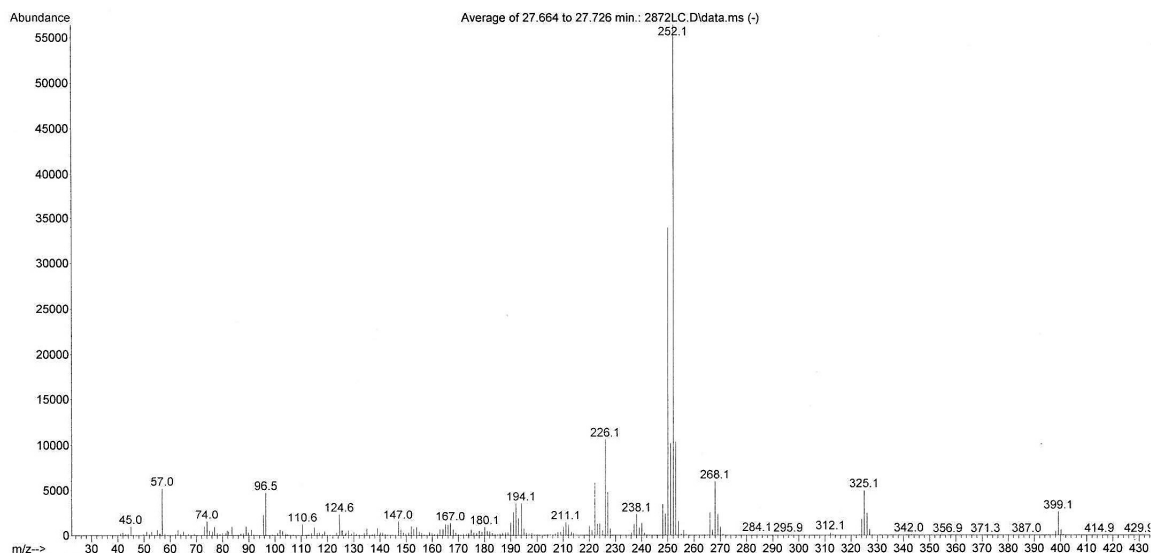
40 mg (0,139 mmol) lykorinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 100 μ l (0,78 mmol) propionylanhydridu. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 4 hodiny, poté byla odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze byla $To : Et_2NH$ 95 : 5 a následně $cHx : Et_2NH$ 95 : 5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 32,5 mg 1,2-di-*O*-propionyllykorinu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 58 %.

Z preparační desky byla izolována i druhá zóna, která byla promyta. Získalo se 10,5 mg látky ve formě bílých krystalů identifikovaných na základě strukturní analýzy jako 2-*O*-propionyllykorin. Jedná se vedlejší produkt reakce (Obr. 38).

Strukturní analýza 1,2-di-*O*-propionyllykorinu (LC-37, hlavní produkt reakce)

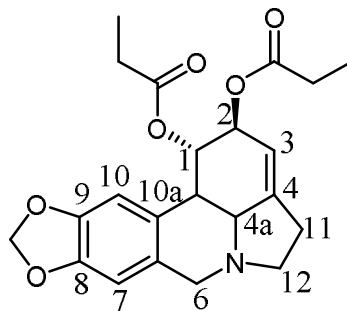
EI-MS studie

EIMS m/z (%): 399 (M^+ , 7); 325 (13); 268 (11); 252 (100); 226 (19); 194 (5).



Obr. 44: EI-MS studie 1,2-di-*O*-propionyllykorinu

NMR studie



Obr. 45: Struktura 1,2-di-*O*-propionyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁸⁰

6.73 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, s, H-7), 5.90 (2H, br s, OCH_2O), 5.73 (1H, s, H-1), 5.52 (1H, s, H-3), 5.24 (1H, s, H-2), 4.15 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.52 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.36 (1H, ddd, $J = 4.7$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, H-12), 2.88 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-10b), 2.78 (1H, $J = 10.4$ Hz, H-4a), 2.63 (2H, br s, H-11), 2.41 (1H, m, H-12), 2.33 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 2.19 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 1.14 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):⁸⁰

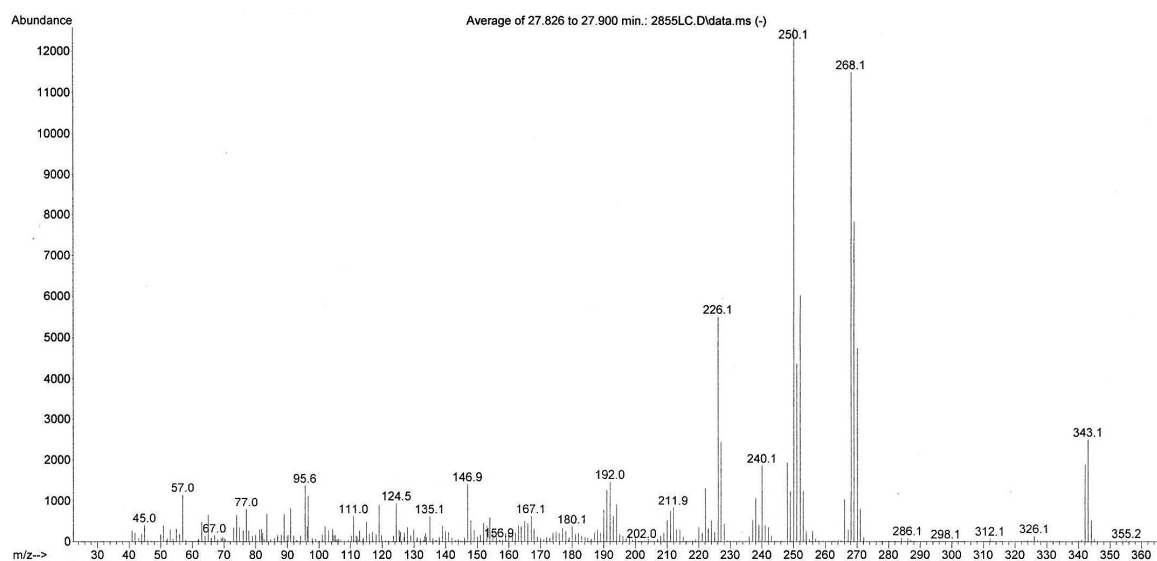
173.2 (s, C=O), 172.9 (s, C=O), 146.1 (s, C-8), 146.0 (s, C-9), 145.6 (s, C-4), 129.0 (s, C-6a), 126.4 (s, C-10a), 113.7 (d, C-3), 107.0 (d, C-7), 104.8 (d, C-10), 100.7 (t, OCH₂O), 70.5 (d, C-2), 68.8 (d, C-1), 61.0 (d, C-4a), 56.6 (t, C-6), 53.4 (t, C-12), 40.3 (d, C-10b), 28.4 (t, C-11), 27.3 (t, CH₂CH₃), 27.2 (t, CH₂CH₃), 8.7 (q, CH₂CH₃), 8.7 (q, CH₂CH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +111,2^\circ$ (c 0.16, MeOH).

Strukturní analýza 2-*O*-propionyllykorinu (LC-37a, vedlejší produkt reakce)

EI-MS studie

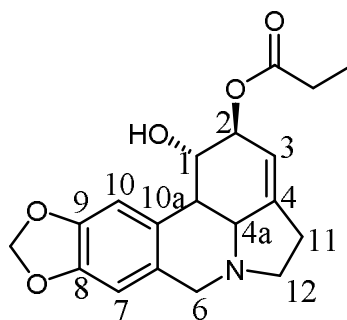


Obr. 46: EI-MS studie 2-*O*-propionyllykorinu

ESI-HRMS studie

m/z experimentální – 344,1506 (m/z teoretická – $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 344,1492)

NMR studie



Obr. 47: Struktura 2-*O*-propionyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

6.82 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, s, H-7), 5.94 (2H, dd, $J = 11,3$ Hz, $J = 1,5$ Hz, OCH₂O), 5.50–5.47 (1H, m, H-1), 5.36–5.33 (1H, m, H-3), 4.52 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, d, $J = 13,7$ Hz, H-6), 3.55 (1H, d, $J = 13,7$ Hz, H-12), 3.41–3.34 (1H, m, H-4a), 2.83 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-10b), 2.72 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-12), 2.69–2.64 (2H, m, H-11, H-6), 2.37 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, OCOCH₂), 1.17 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, CH₃).

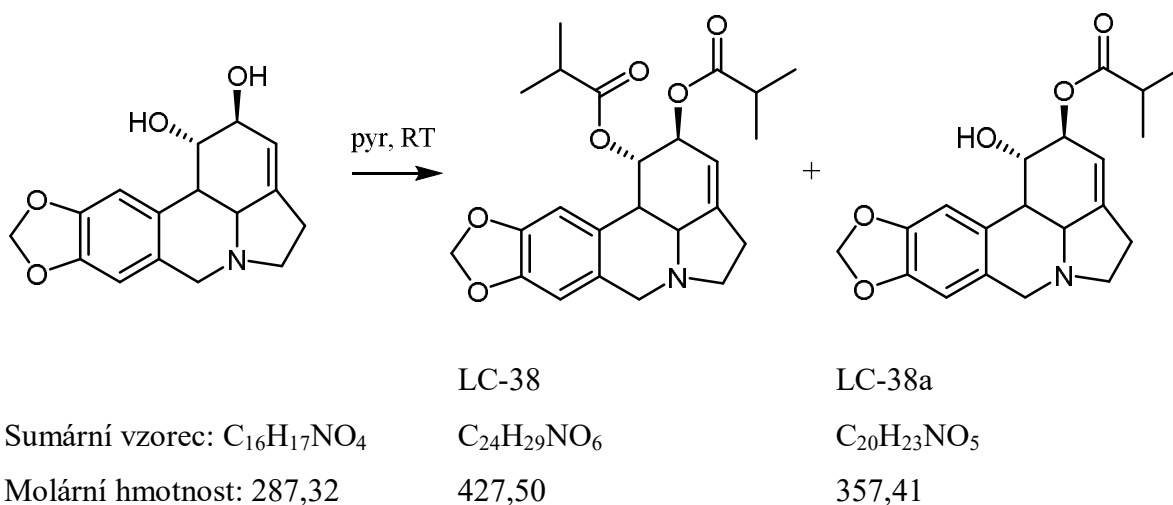
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

174.0 (OCOCH₂CH₃), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 145.9 (C-4), 130.0 (C-6a), 127.1 (C-10a), 113.8 (C-3), 107.7 (C-7), 104.6 (C-10), 101.0 (OCH₂O), 73.5 (C-2), 69.4 (C-1), 60.7 (C-4a), 57.0 (C-6), 53.7 (C-12), 41.8 (C-10b), 29.7 (C-11), 28.7 (OCOCH₂), 9.1 (CH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36,4^\circ$ (c 0.121, CHCl_3).

4.2.3.3. Příprava 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu (LC-38)



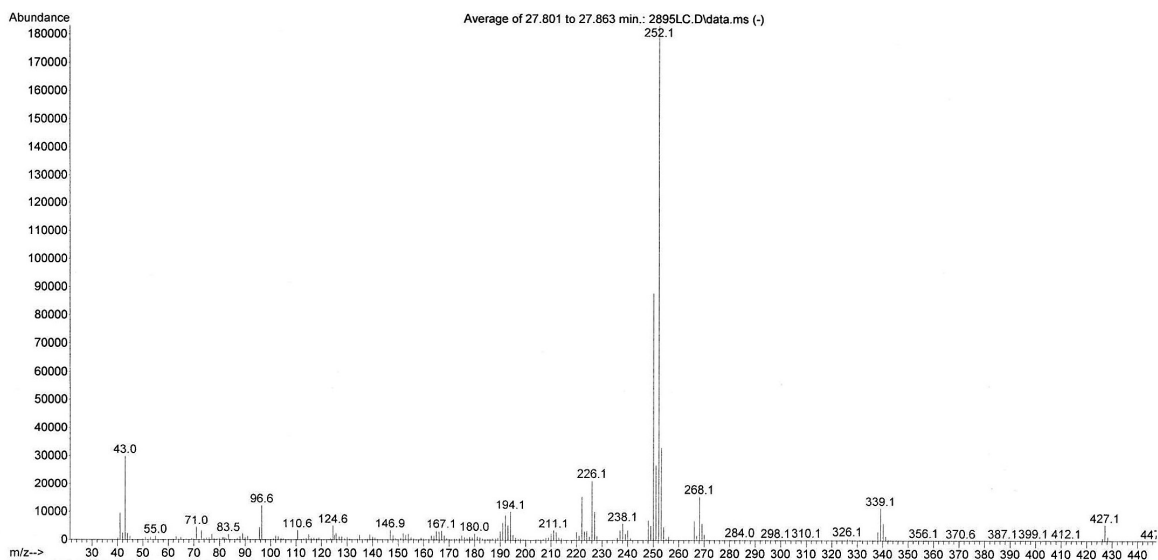
Obr. 48: Schéma syntézy 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu

40 mg (0,139 mmol) lykorinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Následně bylo přidáno 100 μ l (0,603 mmol) isobutyrylanhydridu. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 4 hodiny, poté byla odpařena do sucha a chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze $cHx : Et_2NH$ 9 : 1. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta a odpařena. Bylo získáno 9,5 mg 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 16 %.

Z preparační desky byla izolována i druhá zóna. Ta byla promyta a získaly se 2 mg látky ve formě bílých krystalů, na základě strukturní analýzy identifikovaných jako 2-*O*-isobutyryllykorin. Jedná se vedlejší produkt reakce (Obr. 38).

Strukturální analýza 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu (LC-38, hlavní produkt reakce)

EI-MS studie

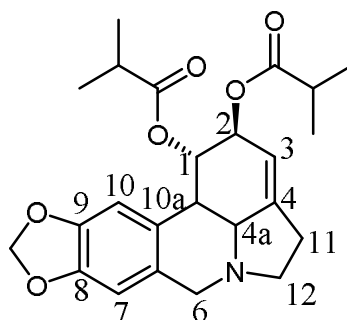


Obr. 49: EI-MS studie 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu

ESI-HRMS studie

m/z experimentální – 428,2074 (*m/z* teoretická – C₂₄H₂₉NO₆ [M+H]⁺ 428,2068)

NMR studie



Obr. 50: Struktura 1,2-di-*O*-isobutyryllykorinu

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25°C):

6.81 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, s, H-7), 5.94 (2H, dd, *J* = 9,3 Hz, *J* = 1,5 Hz, OCH₂O), 5.49–5.46 (1H, m, H-1), 5.34–5.31 (1H, m, H-3), 4.49 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, d, *J* = 13,7 Hz, H-6), 3.56 (1H, d, *J* = 14,2 Hz, H-6), 3.41–3.35 (1H, m, H-12), 2.85 (1H, d, *J* = 10,8 Hz, H-4a), 2.73 (1H, d, *J* = 10,8 Hz, H-10b), 2.70–2.65 (3H, m, H-11, H-12),

2.60–2.53 (1H, m, OCOCH), 1.19 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, CH₃), 1.18 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25°C):

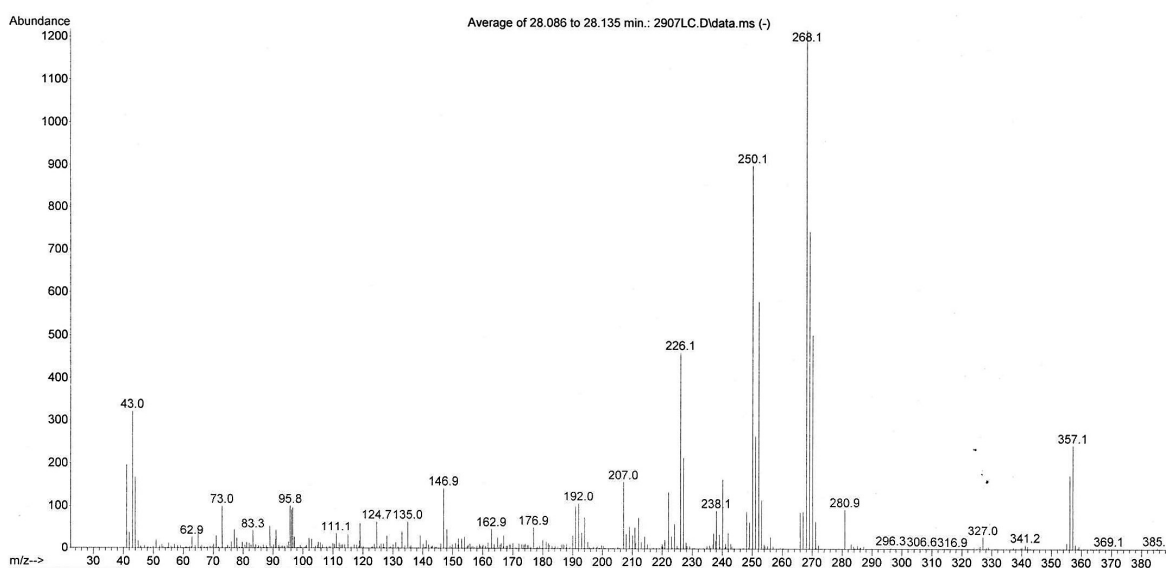
176.6 (OCOCHCH₃CH₃), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 145.7 (C-4), 129.9 (C-6a), 127.1 (C-10a), 113.8 (C-3), 107.7 (C-7), 104.6 (C-10), 101.0 (OCH₂O), 73.2 (C-2), 69.3 (C-1), 60.6 (C-4a), 56.9 (C-6), 53.7 (C-12), 41.7 (C-10b), 34.0 (C-11), 28.7 (OCOCH), 19.0 (CH₃), 18.9 (CH₃).

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{20} = -41,1^\circ$ (c 0.112, CHCl₃).

Strukturní analýza 2-*O*-isobutyryllykorinu (LC-38a, vedlejší produkt reakce)

EI-MS studie

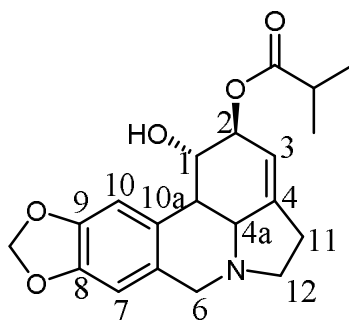


Obr. 51: EI-MS studie 2-*O*-isobutyryllykorinu

ESI-HRMS studie

m/z experimentální – 358,1653 (m/z teoretická – C₂₀H₂₃NO₅ [M+H]⁺ 358,1649)

NMR studie



Obr. 52: Struktura 2-*O*-isobutyryllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

6.73 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-7), 5.90 (2H, dd, $J = 3,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz, OCH₂O), 5.71 (1H, s, H-1), 5.53–5.50 (1H, m, H-3), 5.23–5.20 (1H, m, H-2), 4.17 (1H, d, $J = 14,2$ Hz, H-6), 3.53 (1H, d, $J = 14,2$ Hz, H-6), 3.41–3.35 (1H, m, H-12), 2.89 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-4a), 2.79 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-12), 2.69–2.63 (2H, m, H-11), 2.61–2.51 (2H, m, OCOCH), 2.45–2.36 (1H, m, H-10b), 1.19 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH₃), 1.16 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, CH₃), 1.03 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH₃), 0.94 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

175.9 (OCO), 175.8 (OCO), 146.3 (C-9), 146.2 (C-8), 145.8 (C-4), 129.3 (C-6a), 126.6 (C-10a), 113.9 (C-3), 107.2 (C-7), 105.1 (C-10), 100.9 (OCH₂O), 70.7 (C-2), 69.0 (C-1), 61.3 (C-4a), 56.9 (C-6), 53.6 (C-12), 40.7 (C-10b), 33.9 (C-11), 33.8 (OCOCH), 28.6 (OCOCH), 18.9 (CH₃), 18.8 (CH₃), 18.7 (CH₃), 18.6 (CH₃).

Optická otáčivost

nezměřeno (nedostatečné množství látky)

5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava polosyntetických derivátů

V rámci této diplomové práce se podařilo připravit pilotní deriváty od alkaloidů haemanthaminu, haemanthidinu a lykorinu. Od haemanthaminu byly připraveny 11-*O*-acetylhaemanthamin (LC-6), 11-*O*-propionylhaemanthamin (LC-12), 11-*O*-isobutyrylhaemanthamin (LC-11) a apohaemanthamin (LC-25). Všechny látky byly získány v množstvích, která umožňovala kompletní strukturní analýzy i vybrané biologické testy. Látky LC-6, LC-11 a LC-25 byly připraveny podle literatury.⁸² Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 27–82 %, což až na výtěžek 11-*O*-isobutyrylhaemanthaminu odpovídá výchozím informacím. Látka LC-12 byla připravena vůbec poprvé. V rámci této práce byla kompletně popsána NMR a MS data.

Vzhledem k omezenému množství haemanthidinu byl od tohoto alkaloidu připraven pouze jeden derivát a to 6,11-di-*O*-acetylhaemanthidin (LC-4), který byl již dříve syntetizován a testován. Jeho výtěžek neodpovídá literatuře.⁸²

Vzhledem k široké biologické aktivitě lykorinu a jeho dobré dostupnosti, byla v rámci této diplomové práce započata příprava rozsáhlejší série jeho derivátů za účelem testování vybraných biologických aktivit. Dle literatury⁸⁰ byly připraveny látky 1,2-di-*O*-acetyllykorin (LC-20), 2-*O*-acetyllykorin (LC-20a) a 1,2-di-*O*-propionyllykorin (LC-37). Výtěžky jednotlivých reakcí byly v dobré shodě s literaturou. Látky 2-*O*-propionyllykorin (LC-37a), 1,2-di-*O*-isobutyryllykorin (LC-38) a 2-*O*-isobutyryllykorin (LC-38a) byly připraveny vůbec poprvé. Z důvodu malého výtěžku (pouze 2 mg) 2-*O*-isobutyryllykorinu (LC-38a) bude nutné pro změření optické otáčivosti a biologických testů reakci zopakovat. Zbytek těchto látek byl kompletně popsán (NMR, MS).

5.2. Screening biologických aktivit

5.2.1. Inhibiční aktivity vůči AChE, BuChE a POP

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie se dlouhodobě testují látky přírodního a nově i polysyntetického původu na jejich inhibici vůči erytrocytární acetylcholinesterase, sérové butyrylcholinesterase a prolyloligopeptidase.

V rámci testů inhibiční aktivity připravených látek vůči AchE a BuChE byly prozatím studovány látky LC-11, LC-12, LC-37 a LC-38. Ostatní budou testovány v blízké budoucnosti.

Látky testované v první sérii vůči AchE a BuChE nevykázaly zajímavou inhibiči těchto enzymů pro využití v terapii Alzheimerovy choroby až na 1,2-di-*O*-isobutyryllykorin, jehož hodnota $IC_{50, BuChE} = 36,21 \pm 3,77 \mu M$ a poskytuje tak možnost dalšího testování. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 9).

Tabulka 9: Hodnoty IC_{50} testovaných derivátů vůči AchE a BuChE

Testované sloučeniny		IC_{50} (μM)	
		AChE	BuChE
11- <i>O</i> -propionylhaemanthamin	LC-12	2768,75 \pm 604,58	437,73 \pm 38,28
11- <i>O</i> -isobutyrylhaemanthamin	LC-11	876,63 \pm 101,01	120,53 \pm 14,59
1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorin	LC-37	935,28 \pm 227,83	511,05 \pm 70,68
1,2-di- <i>O</i> -isobutyryllykorin	LC-38	301,38 \pm 22,78	36,21 \pm 3,77

Vzhledem k roli POP jako podpůrné terapie v léčbě AD, byla snaha testovat připravené deriváty i na jejich inhibiční aktivitu vůči POP. Většina testovaných látek bohužel nešla změřit z důvodu špatné rozpustnosti a vypadávání látek z roztoku v průběhu testu. Jednalo se o isobutyrylhaemanthamin (LC-11), 1,2-di-*O*-acetyllykorin (LC-20), 2-*O*-acetyllykorin (LC-20a), 1,2-di-*O*-propionyllykorin (LC-37) a 1,2-di-*O*-isobutyryllykorin (LC-38). Jedinou látkou, kterou bylo možné otestovat, byl pouze 11-*O*-propionylhaemanthamin. Výsledky studie ukázaly vůči POP zajímavé hodnoty a jeho potenciál pro další testování. V tabulce (Tabulka 10) můžeme vidět srovnání 11-*O*-propionylhaemanthaminu se standardem baikalinem.

Tabulka 10: Srovnání propionylhaemanthaminu vůči POP se standardem

Testované sloučeniny		POP IC_{50} (mM)
11- <i>O</i> -propionylhaemanthamin	LC-12	0,284 \pm ,011
baikalin		0,194 \pm 0,014

5.2.2. Protinádorová aktivita

Studované látky jsou v rámci spolupráce s Fakultou agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze, dlouhodobě testovány na jejich toxicitu vůči střevním nádorovým liniím Caco-2 a HT-29 a jedné zdravé linii střevních fibroblastů FHS-74-int. Vzhledem k náročnosti biologických testů byly

prozatím testovány dva připravené deriváty lykorinu a to 1,2-di-*O*-acetyllykorin (LC-20) a 1,2-di-*O*-propionyllykorin (LC-37) za použití standardu vinorelbinu. Jak je vidět z následující tabulky (Tabulka 11), ani jedna látka nevykázala požadovanou toxicitu vůči některé z testovaných buněčných linií.

Tabulka 11: Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů na vybrané střevní buněčné linie

Testované sloučeniny		IC ₅₀ (μM)		
		Caco-2	HT-29	FHS-74int
1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin	LC-20	> 10	> 10	> 10
1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorin	LC-37	> 10	> 10	> 10
vinorelbin	–	0,04 ± 0,01	nt	0,4 ± 0,1

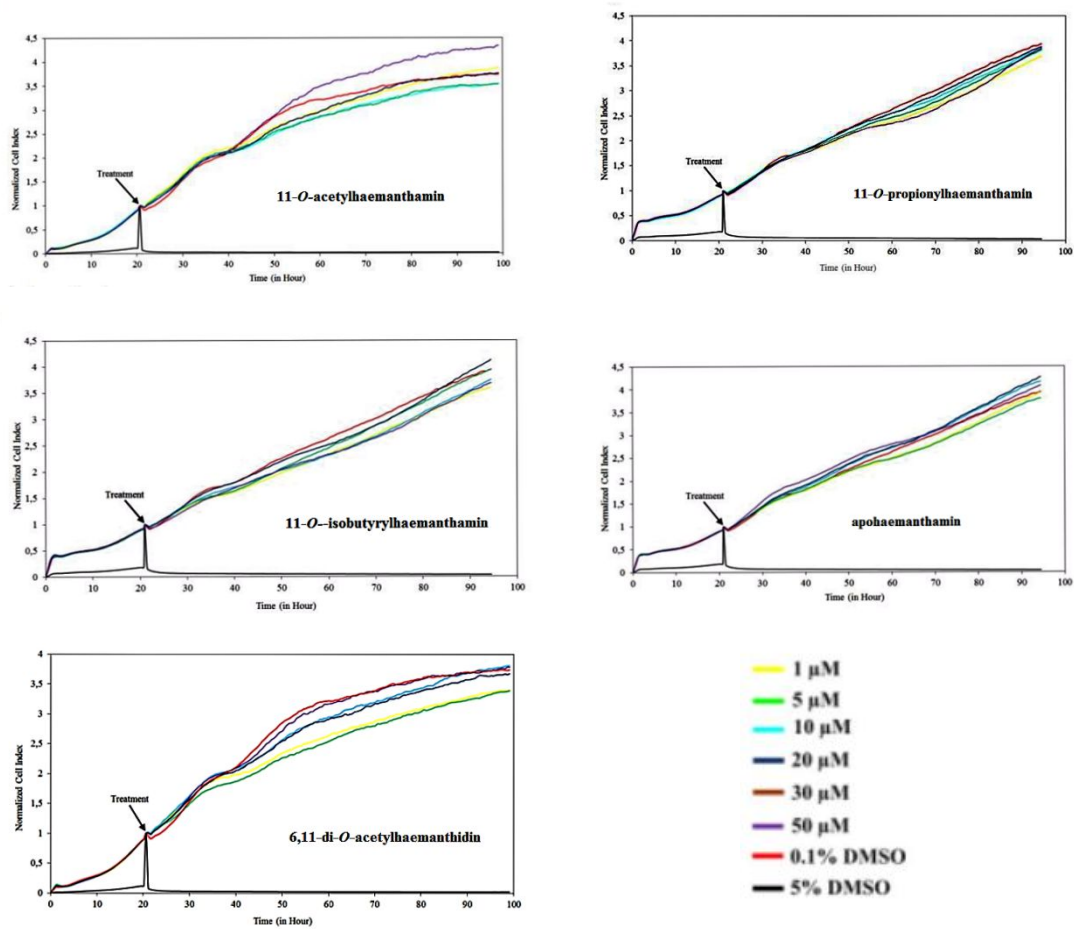
nt netestováno

5.2.3. Stanovení cytotoxicity za využití metody xCELLigence

Připravené deriváty byly dále studovány ve spolupráci s Fakultou chemicko-technologickou, Univerzity Pardubice, za využití metody RTCA SP na přístroji xCELLigence na buňkách adenokarcinomu prsu SK-BR-3. Tato metoda umožňuje sledování buněk v reálném čase. Buňky byly po 24 hodinách ovlivňovány vybranými koncentracemi zvolených alkaloidů a DMSO. Tento vliv byl sledován po dobu delší než 72 hodin v závislosti na konkrétním experimentu.

Křivky na obrázku (Obr. 53) zaznamenávají proliferaci buněk SK-BR-3 v čase po působení jednotlivých koncentrací připravených alkaloidů. Pro negativní kontrolu byl použit 0,1% DMSO, na obrázku znázorněno zelenou křivkou. Pozitivní kontrola, ke které byl použit 5% DMSO, je znázorněna černě. Při této koncentraci nastává buněčná smrt a již nedochází k obnově buněčné proliferace. Změna v proliferaci buněk SK-BR-3 je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu a změřena přístrojem xCELLigence. Získaná data jsou průměrem hodnot ze tří opakovaných měření. Šipka na obrázku znázorňuje čas přidání derivátu, negativní a pozitivní kontroly.

Všechny testované látky se pohybují kolem zelené křivky bez rozdílu koncentrací, což znamená, že nepůsobí cytotoxicky.



Obr. 53: Analýza buněčné proliferace v reálném čase

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Čeď Amaryllidaceae je zajímavou skupinou rostlin, která obsahuje řadu významných látek. Po chemické stránce se jedná o isochinolinové alkaloidy, které tvoří samostatnou skupinu látek. Tyto sekundární metabolity jsou pro čeď Amaryllidaceae charakteristické a v žádné jiné čedi je nenajdeme. Amarylkovité alkaloidy se projevují řadou biologických aktivit. Jako potenciální léčiva se využívají v léčbě nádorových onemocnění jako induktory apoptózy a inhibitory různých fází buněčného cyklu. Výzkum se v dnešní době soustředí na hledání látek, které by působily toxicky na nádorové buňky a nepůsobily na buňky zdravé, tzv. selektivních látek. Haemanthamin, haemathidin a lykorin, vybrané na základě předchozích studií, tuto aktivitu vykazují.

Předmětem této diplomové práce bylo nasyntetizovat sérii derivátů od zmíněných alkaloidů (jednalo se o acetyl-, propionyl- a isobutyrylderiváty). Látky vznikaly reakcí s příslušným anhydridem v prostředí pyridinu a pro jejich získání a přečištění byla využita preparační TLC. Připravené látky byly identifikovány především pomocí GC-MS a NMR. Většina derivátů od haemanthaminu vznikala ve formě bezbarvého oleje, zbytek derivátů krystalizoval ve formě bílých amorfních látek.

Při přípravě derivátů lykorinu vznikal jednak 1,2-di-*O*-derivát jako hlavní produkt reakce tak vedlejší produkt 2-*O*-derivát. Pro studium vztahu struktura–účinek byl do biologických testů zařazen i 1-*O*-acetyllykorin, který byl izolován na našem pracovišti z cibulí *Nerine bowdenii*.⁹⁶ Až na 2-*O*-isobutyryllykorin byly všechny látky připraveny v dostatečném množství umožňující jak strukturní analýzu tak provedení biologických testů.

Získané látky byly podrobeny biologickým testům na nádorové buňky střev Caco-2, HT-29 a linii zdravých fibroblastů FHS-74-int i určení jejich inhibiční schopnosti vůči erytrocytární AChE, sérové BuChE a POP.

Ve spolupráci s Fakultou agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze, proběhlo testování cytotoxicity za využití MTT testu. Z důvodu časové náročnosti prozatím jen u 1,2-di-*O*-acetyllykorinu a 1,2-di-*O*-propionyllykorinu. V porovnání s použitým standardem vinorelbinem nepůsobí látky toxicky na nádorové ani zdravé buňky.

Látky byly navíc v rámci cytotoxicity podrobeny testu RTCA na Fakultě chemicko-technologické, Univerzity Pardubice. Bohužel ani jedna z testovaných látek

nevykázala zajímavou aktivitu proti buněčné linii SK-BR-3. Opět byla testována pouze část připravených derivátů, zbývající látky budou studovány v nejbližším možném termínu.

V klinické praxi se amarylkovité alkaloidy využívají jako inhibitory AChE v léčbě AD.¹ Nyní se ukazuje, že v pozdních stádiích má na AD vliv další enzym, BuChE.^{55,56} Při hledání nových látek se tak výzkum zaměřil na látky s výhodnou duální aktivitou, tzv. duální inhibitory. Z tohoto důvodu se připravené látky testují na AChE i BuChE a nyní navíc i POP. Hladina prolyloligopeptidasay se jeví jako důležitá v rozvoji kognitivních funkcí a neurodegenerativních poruch, proto se její inhibice ukazuje jako výhodná.⁵⁷

Ze čtyř otestovaných látek na inhibici AChE a BuChE se žádná neprojevila zajímavou aktivitou. Výjimkou je 1,2-di-*O*-isobutyryllykorin, jehož hodnota vůči BuChE je $IC_{50} = 36,21 \pm 3,77 \mu M$. V rámci spolupráce s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany, byla měřena aktivita vůči POP. Ze šesti testovaných látek nešla většina změřit z důvodu špatné rozpustnosti a vypadávání látek z roztoku. Jediným výsledkem je tak inhibiční aktivita 11-*O*-propionylhaemanthaminu, $IC_{50} = 0,284 \pm ,011 \mu M$.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Martin Doležal et, al. *Karolinum*, **2013**. ISBN 978-80-246-2382-5
- 2 World Health Org. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (staženo 16. 6. 2016)
- 3 Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy*, **2013**, 107, 701-708.
- 4 Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Report*. **2013**, 30, 849-868.
- 5 <http://www.rostliny.net/celed/Amaryllidaceae> (staženo 25. 3. 2016)
- 6 Evidente A, Kornienko A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*, **2009**, 8, 449-459.
- 7 Kornienko A, Evidente A, Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and its Congeners. *Chemical Reviews*. **2008**,108, 1982-2014.
- 8 Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni LB, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, **2011**, 2, 65-100.
- 9 Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Weber J, Bley T, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Changes in a polar metabolites during in vitro organogenesis of *Pancreatium maritimum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2010**, 48k 827-835.
- 10 Cahlíková L. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva, Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2013**.
- 11 Nakagawa Y, Uyeo S, Yayima H. The double bond in lycorine. *Chem. Ind.* 1965, 1238-1239.
- 12 Nekolná P. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod *Lycoris*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2015**.
- 13 Nair JJ, van Staden. J. Cytotoxicity studies of Lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural Product Communications*, **2014**, 9, 1-2.
- 14 Krejčová G, Ševelová L. Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy*, **2003**, 1, 37-44.
- 15 Andrade de JP, Guo Y, Font-Bardia M, Calvet T, Dutilh J, Viladomat F, Codina C, Nair JJ, Zuanazzi JAS, Bastida J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*, **2014**, 103, 188-195.
- 16 Nair JJ, Bastida J, Viladomat F, van Staden J. Cytotoxic Agents of the Crinane Serie of Amaryllidaceae Alkaloids. *Natural Product Communications*, **2012**, 7, 1677-1688.
- 17 Wildman WC, Bailey DT. Pretazettine. *Journal of American Chemical Society*, **1967**, 89, 5514-5515.

- 18 Cedrón JC, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Gutiérrez D, Flores N, Bucio MA, Pérez-Hernández N, Joseph-Nathan P. Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD. *Organic Letters*, **2009**, 11, 1491-1494.
- 19 Arrigoni O, Liso RA, Calabrese G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature*, **1975**, 256, 513-514.
- 20 Mackey ZB, Baca AM, Mallari JP, Apsel B, Shelat A, Hansell EJ, Chiang PK, Wolff B, Guy KR, Williams J. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. *Chemical Biology and Drug Design*, **2006**, 67, 355-363.
- 21 Del Giudice L, Massardo DR, Pontieri P, Wolf K. Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: null alleles of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rhoO petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **2005**, 354, 9-14.
- 22 Hwang Y-C, Chu JJ, Yang PL, Chen W, Yates MV. Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Research*, **2008**, 77, 232-236.
- 23 Li Y, Liu J, Tang L-J, Shi Y-W, Ren W, Hu W-X. Apoptosis induced by lycorine in KM-3 cells is associated with G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology Reports*, **2007**, 17, 377-384.
- 24 Dneg L, Dai P, Ciro A, Smee DF, Djaballah H, Shuman S. Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. *Journal of Virology*, **2007**, 81, 13392-13402.
- 25 He M, Qu C, Gao O, Hu X, Hong X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *Royal Society of Chemistry Advances*, **2015**, 5, 16562-16574.
- 26 Van Goietsenoven G, Andolfi A, Lallemand B, Cimmino A, Lamotal-Theys D, Gras T, Abou-Donia A, Dubois J, Lefranc F, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*. **2010**, 73, 1223-1227.
- 27 Lamoral-Theys D, Decaestecker C, Mathieu V, Dubois J, Kornienko A, Kiss R, Evidente A, Pottier L. Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2010**, 10, 41-50.
- 28 Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Gras T, Bruyère C, Dubois J, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 52, 6244-6256.
- 29 Liu J, Li Y, Tang LJ, Thang GP, Hu WX. Treatment of lycorine in SCID mice model with human APL cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **2007**, 61, 229-234.

- 30 Liu X-S, Jiang J, Jiao X-Y, Wu Y-E, Lin J-H, Cai Y-M. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters*, **2007**, 274, 16-24.
- 31 Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergonon S, Codina C, Lobstein A, Anton R. cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **1995**, 61, 77-79.
- 32 Duy HH, Shankar S, Takemoto DJ. Anticancer activities of 2,5,8,9-substituted 6-oxo-1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthridines on multi-drug-resistant phenotype 1 cells. *Anticancer Research*, **1997**, 17, 2435-2442.
- 33 Cheesman L, Nair JJ, Staden van J. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**, 140, 405-408.
- 34 Pettit GR, Gaddamidi V, Goswami A, Cragg GM. Antineoplastic agents. 99. *Amaryllis beladonna*. *Journal of Natural Products*, **1984**, 47, 796-801.
- 35 Ghosal S, Kumar Y, Singh SK, Kumar A. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 21. Ungeremine and criasbetaine, two antitumor alkaloids from *Crinum asiaticum*. *Journal of Chemical Research (S)*, **1986**, 112-113.
- 36 Nair JJ, Manning JC, van Staden J. Distichamine, a chemotaxonomic marker for the genus *Boophane* Herb. (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany*, **2012**, 83, 89-91.
- 37 Ghosal S, Saini KS, Arora VK. 1,2-Epoxyambelline, an immunostimulant alkaloid from *Crinum latifolium*. *Journal of Chemical Research*, **1984**, 7, 232-233.
- 38 Ghosal S. Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 24. Criafoline and crinafolidine, two antitumor alkaloids from *Crinum latifolium*. *Journal of Chemical Research*, **1986**, 9, 312-313.
- 39 Silva AFS, de Andrade JP, Machado KRB, Rocha AB, Apel MA, Sobral MEG, Henriques AT, Zuanazzi JAS. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, **2008**, 15, 882-885.
- 40 McNulty J, Nair JJ, Codina C, Bastida J, Pandey S, Gerasimov J, Griffin C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 1068-1074.
- 41 Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes require antiapoptotic MCL-1. *Nature*, **2003**, 426, 671-676.
- 42 Inuzuka HC, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Mase RS, Zhai B, Wan L, Gutierrez A, Lau AW, Xiao Y, Christie AL, Aster J, Settleman J, Gygi SP, Kung AL, Look T, Nakayama KI, DePinho RA, Wei W. SCF^{FBW7} regulates cellular apoptosis by targeting MCL-1 for ubiquitylation and destruction. *Nature*, **2011**, 471, 104-109.
- 43 Pettit GR, Melody N, Harald DL. Antineoplastic Agents. 511. Direct Phosphorylation of Phenpanstatin and Pancratistatin. *Journal of Natural Products*, **2004**, 67, 322-327.

- 44 Pettit GR, Gaddamidi V, Cragg GM, Herald DL, Sagawa Y. Isolation and structure of pancratistatin. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*. **1984**, 24, 1693-1694.
- 45 Pettit GR, Pettit GR 3rd, Backhaus RA, Boyd M, Meerow AW. Antineoplastic Agents. 256. Cell growth inhibitory isocarbostryls from *Hymenocallis*. *Journal of Natural Product Communication*, **1993**, 56, 1682-1687.
- 46 Griffin C, McNulty J, Pandey S. Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic cancer cells. *International Journal of Oecology*. **2011**, 38, 1549-1556.
- 47 Ceriotti G. Narciclasine: an antimitotic substance from narcissus bulbs. *Nature*, **1967**, 213, 595-596.
- 48 Jitsuno M, Yokosuka A, Sakagami H, Mimaki Y. Chemical constituents of the bulbs of *Habranthus brachyandrus* and their cytotoxic activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2009**, 57, 1153-1157.
- 49 Ingrassia L, Lefranc F, Dewelle J, Pottier L, Mathieu V, Spiegl-Kreinecker S, Sauvage S, El Yazidi M, Dehoux M, Berger W. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 52, 1100-1114.
- 50 Dumont P, Ingarssia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. The Amatyllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the dech receptor and/or mitochondrial pathway in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **2007**, 9, 766-776.
- 51 http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp
(staženo 3. 5. 2016)
- 52 World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Nakl. Alzheimer' Disease International.
- 53 Selkoe DJ. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer' disease. *Trends Cell Biology*, **1998**, 8, 447-453.
- 54 Wang Y-H, Wan Q-L, Gu C-D, Luo H-R, Long C-L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylchoiesterase. *Chemistry Central Journal*, **2012**, 6, 6-96.
- 55 Walsh R, Roockwood K, Martin E, Darvesh S. Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galanthamine and citalopram. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, 1810, 1230-1235.
- 56 Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamszarz J, Hollowax HW, Giordano T. Selective burytylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments leasing and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proccedings of the National Academy of Sciences USA*, **2005**, 102, 17213-17218.
- 57 Furukawa-Hibi Y, Alkam T, Nitta, Matsuyama A, Mizoquchi S, Suzuki K, Moussaoui S, Yu Qs, Greig NH, Nagai T. Butyrylcholinesterse inhibitors ameliorative cognitive dysfunction induced by amyloid-[beta] peptide in mice. *Behavioural Brain Research*, **2011**, 1, 222-229.
- 58 Darvesh S, Cash MK, Reid GA, Martin E, Mitnitski A, Geula C. Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic

- APP_{SWE}/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **2012**, 71, 2-14.
- 59 Ibach B, Haen E. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, **2004**, 10, 231-251.
- 60 Cahlíková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanocá K, Jahodář L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **2011**, 6, 603-606.
- 61 Iannello C, Pigni NB, Antognoni F, Poli F, Maxia A, de Andrade JP, Bastida J. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancratium illyricum* L. *Fitoterapia*, **2014**, 92, 163-167.
- 62 Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. *N*-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 2263-2266.
- 63 López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* species. *Life Science*, **2002**, 71, 2521-2529.
- 64 Han SY, Sweeney JE, Bachman ES. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, 27, 673-687.
- 65 Wang Y-H, Wan Q-L, Gu CD, Luo H-R, Long C-L. Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal*, **2012**, 6, 96.
- 66 Nair JJ, Staden JV. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications*, **2012**, 7, 959-962.
- 67 Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chemistry and Biodiversity*, **2013**, 10, 1120-1127.
- 68 Puttonen KA, Lehtonen S, Raasmaja A, Männistö PT. A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro-Prolinal, inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase translocation and production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposed to 6-hydroxydopamine. *Toxicology in Vitro*, **2006**, 20, 1446-1454.
- 69 Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, **2013**, 8, 1541-1544.
- 70 Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1997**, 56, 427-434.
- 71 Šafratová M, Novák Z, Kulhánková A, Kuneš J, Hrabínová M, Jun D, Macáková K, Opletal L, Cahlíková L. Revised NMR data for 9-*O*-Demethylgalanthine: an

- alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Natural Product Communications*, **2014**, 9, 787-788.
- 72 Iannello C, Bastida J, Bonvicini F, Antognoni F, Gentilomi GA, Poli F. Chemical composition and in vitro antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Natural Product Research*, **2014**, 28, 704-710.
- 73 Tan CX, Schrader KK, Mizuno CS, Rimando AM. Activity of Lycorine Analogues against the Fish Bacterial Pathogen *Flavobacterium columnare*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 5977-5985.
- 74 <http://www.akvarijni.cz/nemoci.html> (staženo 5. 5. 2016)
- 75 Wagner BA, Wise DJ, Khoo LH, Terhune JS. The epidemiology of bacterial disease in food-size channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, **2002**, 14, 263-272.
- 76 Schrader KK, Andolfi A, Cantrell CL, Cimmino A, Duke SO, Osbrink W, Wedge DE, Evidente AA. A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential products for pest management. *Chemistry and Biodiversity*, **2000**, 7, 2261-2280.
- 77 World Malaria Report 2015. World Health Organization. France. ISBN 978 92 4 156515 8.
- 78 Na-Bangchang K, Karbwang J. Fundam. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **2009**, 23,387.
- 79 Sener B, Orhan I, Satayavivad J. Antimalarial activity of some alkaloids and the plant extracts of Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*, **2003**, 17, 1220-1223.
- 80 Cedrón JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo ÁG., Estévez-Braun A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2010**, 18, 4694-4701.
- 81 Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otaguro K, Yamada H, Omura S, Takayama H. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris trabii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 10182-10189.
- 82 Cedrón JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo ÁG., Estévez-Braun A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2012**, 20, 5464-5472.
- 83 Evdokimov NM, Lamoral-Theys D, Mathieu V, Andolfi A, Frolova LV, Pelly SC, Van Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R, Evidente A, Kornienko A. In search of a cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 7252-7261.
- 84 Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA, van Slambrouck S, Kornienko A. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica*, **2009**, 75, 501-507.

- 85 Cao Z, Yu D, Fu S, Zhang G, Pan Y, Bao M, Tu J, Shang B, Guo P, Yang P, Zhou Q. lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicology Letters*, **2013**, 218, 174-185.
- 86 Barthelme HU, Niederberger E, Roth T, Schulte K, Tang WC, Boege F, Fiebig H-H, Eisenbrand G, Marko D. Lycobetaine as a selective topoisomerase II β poison and inhibits the growth of human tumour cells. *British Journal of Cancer*, **2001**, 85, 1585-1591.
- 87 Stark LM, Lin X-F, Flippin LA. Total synthesis of Amaryllidaceae pyrrolophenanthridinium alkaloids via the Ziegler-Ullmann reaction: Tortuosine, criasbetaine and ungeremine. *Journal of Organic Chemistry*, **2000**, 65, 3227-3230.
- 88 Vshyvenko S, Scattolon J, Hudicky T, Romero AE, Kornienko A. Synthesis of C-1 Homologues of Pancratistatin and their Preliminary Biological Evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21, 4750-4752.
- 89 Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty, Pandey S. Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International*, **2007**, 7, 1-7.
- 90 Dumont P, Ingarssia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathway in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **2007**, 9, 766-776.
- 91 Abou-Donia AH, De Giulio A, Evidente A, Gaber M, Habib A-A, Lanzetta R, El Din AAS. Narciclasine-4-O- β -D-glucopyranoside, a glucosyloxy amidic phenanthridone derivative from *Pancratium maritimum*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3445-3448.
- 92 Ingrassia L, Lefranc F, Mathieu V, Darro F, Kiss R. Amaryllidaceae Isocarbostryl Alkaloids and Their Derivatives as Promising Antitumor Agents. *Clinical and Translational Oncology*, **2008**, 1, 1-13.
- 93 Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, **2015**, 13, 394-398.
- 94 Cahlíková L, Hulová L, Hrainová M, Chlebek J, Hošťálková A, Adamcová M, Šafratová M, Jun D, Opletal L, Ločárek M, Macáková K. Isoquinoline alkaloids as potential prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, **2015**, 103, 192-196.
- 95 Šafratová. Biologicky aktivní metabolity rostlin 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* a jejich biologická aktivita. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2013**.
- 96 Vaněčková N, Hošťálková A, Šafratová M, Kuneš J, Hulcová D, Hrabínová M, Doskočil I, Štěpánková Š, Opletal L, Nováková L, Jun D, Chlebek J, Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RCS Advances*, **2016**, 6, 80114-80120.

8. PŘEHLED OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Cesta syntézy hlavních typů Amaryllidaceae alkaloidů	11
Obr. 2:	Struktury alkaloidů norbelladinového typu	14
Obr. 3:	Struktury vybraných alkaloidů lykorinového typu.....	14
Obr. 4:	Struktury vybraných alkaloidů homolykorinového typu.....	15
Obr. 5:	Struktury vybraných alkaloidů galanthaminového typu.....	16
Obr. 6:	Struktury haemanthaminu a krininu	16
Obr. 7:	Struktury alkaloidů pankratistatinového typu	17
Obr. 8:	Struktury vybraných alkaloidů tazettinového typu	18
Obr. 9:	Struktury vybraných alkaloidů montaninového typu	19
Obr. 10:	Struktura distichaminu.....	25
Obr. 11:	Přehled galanthaminových struktur s anticholinerní aktivitou	29
Obr. 12:	Přehled lykorinových struktur s anticholinerní aktivitou	30
Obr. 13:	Struktura undulatinu a 8- <i>O</i> -demethylmaritidinu	31
Obr. 14:	Přehled vzorců alkaloidů testovaných na POP	32
Obr. 15:	Struktura ungereminu	33
Obr. 16:	Porovnání struktur lykorinu a pseudolykorinu	36
Obr. 17:	Porovnání struktur lykorinu s obměnou kruhu B.....	37
Obr. 18:	Obměny struktury lykorinu na kruhu C.....	38
Obr. 19:	Obměny haemanthaminové struktury.....	39
Obr. 20:	Struktura 7-deoxypankratistatinu	40
Obr. 21:	Analoga pankratistatinu	41
Obr. 22:	Schéma syntézy 11- <i>O</i> -acetylhaemanthaminu	47
Obr. 23:	EI-MS studie 11- <i>O</i> -acetylhaemanthaminu	48
Obr. 24:	Struktura 11- <i>O</i> -acetylhaemanthaminu.....	48
Obr. 25:	Schéma syntézy 11- <i>O</i> -propionylhaemanthaminu	49
Obr. 26:	EI-MS studie 11- <i>O</i> -propionylhaemanthaminu	50
Obr. 27:	Struktura 11- <i>O</i> -propionylhaemanthaminu.....	50
Obr. 28:	Schéma syntézy 11- <i>O</i> -isobutyrylhaemanthaminu.....	51
Obr. 29:	EI-MS studie 11- <i>O</i> -isobutyrylhaemnthaminu.....	52
Obr. 30:	Struktura 11- <i>O</i> -isobutyrylhaemanthaminu	52
Obr. 31:	Schéma syntézy 11- <i>O</i> -apohaemanthaminu.....	53

Obr. 32: MS (nahore) a MS2 (dole) studie apohaemanthaminu.....	54
Obr. 33: Struktura apohaemanthaminu	55
Obr. 34: Schéma syntézy 6,11-di- <i>O</i> -acetylhaemanthidinu.....	56
Obr. 35: EI-MS studie 6,11-di- <i>O</i> -acetylhaemanthidinu	57
Obr. 36: Struktura 6,11-di- <i>O</i> -acetylhaemanthidinu	57
Obr. 37: Schéma syntézy 1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorinu	59
Obr. 38: TLC.....	59
Obr. 39: EI-MS 1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorinu.....	60
Obr. 40: Struktura 1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorinu.....	60
Obr. 41: EI-MS 2- <i>O</i> -acetyllykorinu.....	61
Obr. 42: Struktura 2- <i>O</i> -acetyllykorinu	62
Obr. 43: Schéma syntézy 1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorinu.....	63
Obr. 44: EI-MS studie 1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorinu.....	64
Obr. 45: Struktura 1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorinu	64
Obr. 46: EI-MS studie 2- <i>O</i> -propionyllykorinu	65
Obr. 47: Struktura 2- <i>O</i> -propionyllykorinu	66
Obr. 48: Schéma syntézy 1,2-di- <i>O</i> -isobutyryllykorinu.....	67
Obr. 49: EI-MS studie 1,2-di- <i>O</i> -isobutyryllykorinu	68
Obr. 50: Struktura 1,2-di- <i>O</i> -isobutyryllykorinu	68
Obr. 51: EI-MS studie 2- <i>O</i> -isobutyryllykorinu	69
Obr. 52: Struktura 2- <i>O</i> -isobutyryllykorinu.....	70
Obr. 53: Analýza buněčné proliferace v reálném čase.....	74

9. PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1: Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, hlavní zástupci a příklady rodů, ze kterých byly izolovány (převzato a zkráceno z literatury)	12
Tabulka 2: Přehled IC ₅₀ vybraných alkaloidů na několik nádorových linií.....	22
Tabulka 3: Hodnoty IC ₅₀ haemanthaminových alkaloidů na střevní buňky Caco-2, HT-29 a zdravou linii střevních fibroblastů FHS-74-Int	24
Tabulka 4: Přehled AChE inhibiční aktivity různých Amaryllidaceae alkaloidů	29
Tabulka 5: Antibakteriální aktivita lykorinových derivátů vůči genomovaru ALM-00-173 <i>Flavobacterium columnare</i>	33
Tabulka 6: Antibakteriální aktivita lykorinových derivátů vůči genomovaru BioMed <i>Flavobacterium columnare</i>	33
Tabulka 7: Hodnoty IC ₅₀ pankratistatinu a jeho vybraných derivátů na různé nádorové linie (Obr. 21).....	41
Tabulka 8: Hodnoty IC ₅₀ narciklasinu a jeho vybraných derivátů na různé nádorové linie	42
Tabulka 9: Hodnoty IC ₅₀ testovaných derivátů vůči AChE a BuChE	72
Tabulka 10: Srovnání propionylhaemanthaminu vůči POP se standardem	72
Tabulka 11: Hodnoty IC ₅₀ testovaných derivátů na vybrané střevní buněčné linie	73

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
Bz	benzoyl
CDCl ₃	chloroform
CD ₃ OD	tetradeuterometanol
cHx	cyklohexan
CNS	centrální nervový systém
DMSO	dimethylsulfoxid
ED	koncentrace, která vyvoává efekt u 50% populace
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
ESI-HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
Et	etyl
Et ₂ NH	diethylamin
GC	plynová chromatografie
GTPasa	guanosintrifosfatasa
iAChE	inhibitor acetylcholinesterasy
IC ₅₀	koncentrace, při které dochází in vitro k 50% inhibici aktivity
LC	kapalinová chromatografie
LC-4, 6, ...	pracovní označení syntetizovaných látek
MeCN	acetonitril
Mr	molekulová hmotnost
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
NMR	nukleární magnetická rezonance
OTBS	<i>o-terc</i> -butyldimethylsilyl
PgP	P-glykoprotein
POP	prolyloligopeptidasa
ppm	pars per milion
PrCO	propionyl

pyr	pyridin
p-53	transkripční faktor v buňce
RT	pokožová teplota
RTCA	analýza buněk v reálném čase (angl. real time cell analysis)
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie (angl. severe combined immunodeficiency disease)
SAR	vztak struktura–účinek (angl. structure–activity relationship)
SARS	těžký akutní respirační syndrom (angl. severe acute respiratory syndrome)
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
To	toluen

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Zuzana Kavková

Školitel: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva

Předmětem této diplomové práce bylo připravit deriváty alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a zabývat se jejich biologickými účinky. Tyto alkaloidy jsou známé jak svou antibakteriální, antivirotickou, antifungální, antimalarickou a inhibiční aktivitou vůči AChE, BuChE a POP tak cytotoxickým působením proti nádorovým buňkám.

Dosavadní studie, zabývající se protinádorovou aktivitou došly k závěru, že nejvíce aktivní Amaryllidaceae alkaloidy jsou typu lykorinového, haemanthaminového, krininového a pankratistatinového. Jejich biologická aktivita úzce souvisí se strukturou. Obměnou různých částí struktury dochází k objasnění vztahu struktura–účinek a poznání důležitosti uspořádání, které je nezbytné pro vyvolání účinku.

Podle těchto informací byly pro práci vybrány alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin. Bylo připraveno 11 derivátů identifikovaných převážně pomocí GC-MS a NMR. Tyto deriváty byly testovány na širokou škálu nádorových linií. Bohužel se neprokázalo, že by nějaká ze syntetizovaných látek vykazovala dostatečnou toxicitu vůči nádorovým buňkám a zároveň neovlivňovala buňky zdravé a klidové. Zdá se tedy, že připravené látky nebudou, co se týká toxicity k nádorovým liniím, využity k dalším experimentům. Nadějný se pro další testy vůči BuChE zdá být 1,2-di-*O*-isobutyryllykorin ($IC_{50} = 36,21 \pm 3,77 \mu M$) a vůči POP 11-*O*-propionyaemanthamin ($IC_{50} = 0,284 \pm 0,011 \mu M$).

Klíčová slova: Amaryllidaceae, protinádorová aktivita, POP, alkaloidy, haemanthamin, haemanthidin, lykorin

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Zuzana Kavková

Supervisor: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Alkaloids of family Amaryllidaceae and their analogues
as potential drugs

The object of this diploma thesis was to prepare derivatives of alkaloids of Amaryllidaceae family and to deal with their biological activity. These alkaloids are famous for their antibacterial, antiinfectives, antifungal, antimalarial and inhibitory activity against AChE, BuChE and POP and also for cytotoxic effect against cell lines.

In the current studies about anticancer activity it was found that the most active alkaloids are Amaryllidaceae alkaloids of these types: lycorine, crinine and pancratistatine. Their biological activity relates closely with their structure. The changes of different parts of the structure can explain the relationship between structure and activity, and also the importance of their organization which is necessary for starting the activity.

Based on this finding were for the experiments chosen alkaloids like haemanthamine, haemanthidine and lycorine. An eleven derivatives were prepared and identified mostly by GC-MS and NMR. These derivatives were tested on a wide spectrum of tumor lines. Unfortunately, none of the synthesized substances had shown sufficient cytotoxicity against tumor lines and without affecting healthy and quiescent cells. Therefore it seems that the prepared substances will not be used for future experiments in case of toxicity to tumor lines. For the future experiments seems promising 1,2-di-*O*-isobutyryllycorine ($IC_{50} = 36,21 \pm 3,77 \mu M$) towards BuChE and 11-*O*-propionyhaemanthamine ($IC_{50} = 0,284 \pm 0,011 \mu M$) towards POP.

Keywords: Amaryllidaceae, anticancer activity, POP, alkaloids, haemanthamine, haemanthidine, lycorine

