

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, rod *Nerine*

Alkaloids of the family Amaryllidaceae, genus *Nerine*

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Adéla Hodulová

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 2018

Adéla Hodulová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za poskytnuté materiály, vstřícný přístup a odborné rady při zpracování této práce. Dál bych chtěla poděkovat Katedře farmaceutické botaniky za vstřícnost a ochotu pomoci při řešení nejrůznějších problémů.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 5 |
| 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE..... | 7 |
| 3. ČELEĎ AMARYLLIDACEAE..... | 8 |
| 4. ROSTLINY RODU <i>NERINE</i> | 10 |
| 4.1 Využití rodu rostlin <i>Nerine</i> v tradiční medicíně..... | 11 |
| 4.2 <i>Nerine bowdenii</i> a její taxonomické zařazení | 11 |
| 4.2.1 Taxonomické zařazení ²⁰ | 11 |
| 4.2.2 Výskyt rostlin rodu <i>Nerine</i> | 12 |
| 4.2.3 <i>Nerine bowdenii</i> | 13 |
| 4.2.4 <i>Nerine filifolia</i> | 27 |
| 4.2.5 <i>Nerine filamentosa</i> | 29 |
| 4.2.6 <i>Nerine undulata</i> | 31 |
| 4.2.7 <i>Nerine sarniensis</i> | 33 |
| 4.2.8 Další rostliny rodu <i>Nerine</i> | 41 |
| 5. DISKUZE A ZÁVĚR..... | 45 |
| 6. LITERATURA..... | 46 |
| 7. SEZNAM ZKRATEK..... | 51 |

1. ÚVOD

Farmakognozie se řadí mezi nejstarší farmaceutické disciplíny¹. Tato disciplína se vyvinula v období, kdy rostlina sloužila člověku jako surovina, tedy jako zdroj potravy. Docházelo k postupnému odhalování jak léčivých i toxických účinků obsahových látek, které byly postupně využívány nejen k léčbě nemocí, ale i jako prostředky k otravám. V této době byly léčivé zdroje využívány minimálně upravované, buď jen jako sušené nebo extrahované vínem či uchovávané v medu. Po rozdělení léčitelství na dva samostatné obory – farmacii a medicínu v roce 1240 Friedrichem II. Štaufským, se farmakognozie začala vyvíjet výraznějším způsobem.²

Potenciál rostlinných metabolitů je historicky známou a potvrzenou skutečností.³ V současné době mají přírodní léčiva nezastupitelné místo v terapii.² Svědčí o tom stále narůstající počet článků o léčivých drogách, dále článků o léčivých rostlinách jako zdroj léčivých látek s potencionálním využitím ve farmacii při hledání nových léčiv. Existuje široká skupina sekundárních metabolitů rostlin, které hrají významnou roli na cestě léčiva. Příkladem může být alkaloid galanthamin, který se od roku 2000 začal používat pro terapii Alzheimerovy choroby. Alkaloid galanthamin byl poprvé izolován v roce 1952 z cibule sněženky *Galanthus woronowii* čeledi Amaryllidaceae.⁴ Galanthamin působí jako reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE a zároveň představuje allosterický modulátor nikotinových receptorů, na nichž potencuje účinnost acetylcholinesterázy (AChE).⁵ Popis jeho biologické aktivity vedl ke zvýšení pozornosti k čeledi Amaryllidaceae. Díky tomu jsou rostliny této čeledi postupně podrobně studovány po fytochemické stránce.

Rostliny čeledi Amaryllidaceae tvoří čeleď cibulovin, která obsahuje okrasné druhy, jako jsou rod *Amaryllis*, *Narcissus*, *Galanthus* nebo *Nerine*. Rostliny této čeledi nacházejí také využití v tradiční čínské medicíně a u původních obyvatel Jižní Afriky.⁵

Tyto látky disponují vedle schopnosti inhibice acetylcholinestrázy i dalšími biologickými aktivitami. Mezi jeden z nejvýznamnějších účinků čeledi Amaryllidaceae patří jejich protinádorová aktivita. Další zajímavé účinky těchto Amaryllidaceae alkaloidů jsou antivirové, antimykotické, antibakteriální a analgetické. Zástupci jednotlivých strukturních typů se od sebe mohou lišit svou biologickou aktivitou.

Jedním z nejobsáhlejších rodů čeledi Amaryllidaceae je rod *Nerine*. Zástupci tohoto rodu jsou hojně studováni nejen po fytochemické stránce, ale i po stránce biologické aktivity. Náplní této práce je sestavení souboru sekundárních metabolitů,

především amarylkovitých alkaloidů, které byly z tohoto rodu doposud izolovány a shrnutí poznatků o jejich biologické aktivitě.

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Vypracovat přehled rostlin rodu *Nerine* po fytochemické stránce.
2. Vytvořit přehled alkaloidů, které byly doposud izolovány z rostlin rodu *Nerine*.
3. Shrnout současné poznatky o biologické aktivitě alkaloidů izolovaných z rostlin rodu *Nerine*.

3. ČELEĎ AMARYLLIDACEAE

Rostliny čeledi Amaryllidaceae (Amarylkovité) jsou jednoděložné, víceleté, cibulovité, krytosemenné rostliny, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky, zčásti se vyskytují i od mírného pásma až k subalpínskému stupni. V současné době patří mezi nejvíce studované čeledi rostlin. Tato rostlinná čeleď zahrnuje kolem 1100 druhů rozdělených do více než 75 rodů.^{4,6} Celá řada těchto rostlin je hojně pěstována k okrasným účelům. Zástupce v podobě narcisů (*Narcissus*), bledulí (*Leucojum*) a sněženek (*Galanthus*) je možno najít i v České republice.⁴

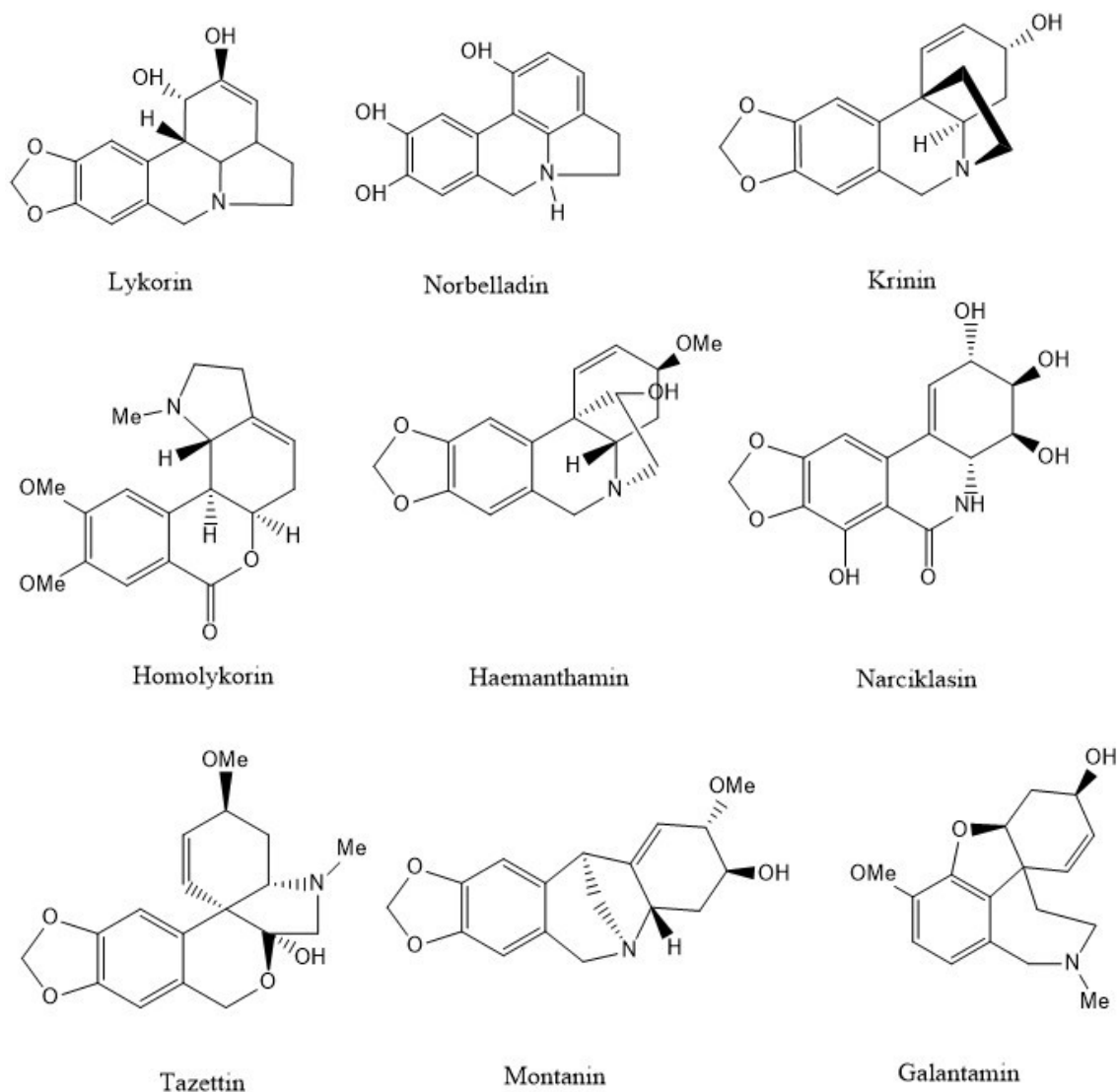
V posledních dvaceti letech je této čeledi ze strany vědců věnována značná pozornost především z důvodu obsahových látek, které disponují širokým spektrem biologických aktivit, potenciálně využitelných v terapiích celé řady onemocnění.⁴ Alkaloidy jsou sekundárními metabolity rostlin, charakteristické obsahové látky amarylkovitých rostlin. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak v nejvyšším množství je najdeme v cibuli. Každý rod amarylkovitých rostlin obsahuje řadu alkaloidů, z nichž je většinou určitý strukturní typ pro daný rod charakteristický a vyskytuje se v něm ve vyšších koncentracích. Ostatní typy alkaloidů jsou pak přítomny v menším množství. Řada z izolovaných alkaloidů má výrazné účinky na aktivitu fyziologicky významných enzymů.⁷

První lékařské použití rostlin z čeledi Amaryllidaceae, pochází z doby působení Hippokrata z Kou, který již ve 4. století před Kristem použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze k léčbě nádorů v oblasti dělohy.⁸ V době středověku se využití extraktu z narcisů rozšířilo dále do Číny, Severní Afriky, Střední Ameriky a do arabské medicíny.^{4,6} Z toho vyplývá široké využití těchto rostlin v nejrůznějších částech světa.⁹

Strukturní objasnění alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, biologické profily a jejich syntéza byly shrnuty v posledních letech v několika příkladových pracích.¹⁰ Jako první alkaloid z této čeledi byl izolován z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877 lykorin. Jeho struktura byla objasněna Nagakawa a spol. v roce 1956.¹¹

Do dnešní doby bylo popsáno a izolováno přes 500 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě nebo ve skupinách napříč celou čeledí Amaryllidaceae.⁴ Alkaloidy se dělí do několika strukturních typů, konkrétně do devíti hlavních lykorinový typ, belladinový typ, krininový typ, homolykorinový typ, haemanthaminový typ, narciklasinový typ,

tazettinový typ, montaninový typ a galanthaminový typ, znázorněno na (Obr. 1.), a celé řady dalších jako například galasinový typ, kripowellinový typ, buflavinový typ, gracilinový typ a augustaminový. Intenzivně je studován výskyt jednotlivých alkaloidů, jejich množství v různých částech rostliny a v neposlední řadě je studována biologická aktivita těchto látek. Mezi nejvýznamnější aktivity se pak řadí inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze a cytotoxická aktivita.⁶



Obrázek 1: Základní strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

4. ROSTLINY RODU *NERINE*

Čeleď Amaryllidaceae se skládá ze 70 rodů, jedním z nich je rod *Nerine*. Rod *Nerine*, druhý největší po rodu *Narcissus* čítá asi 30 druhů rostlin.¹² Vyskytuje se na jihu Afriky, konkrétně v Namibii, Botswaně, Lesothu, Svazijsku a v Jihoafrické republice.¹³

Duncan v roce 2002 rozdělil rod *Nerine* do 3 skupin založených na růstovém období: zimní rostoucí duh, vyskytující se v oblastech zimních srážek, stálezelené druhy a letní rostoucí druhy v oblastech letních srážek typických pro Východní Kapsko.¹⁴

Rostliny rodu *Nerine* jsou cibulovité trvalky, kvetoucí na podzim, rostoucí v oblastech s letními srážkami a chladnými, suchými zimami.¹³ Nejvhodnější místa pro růst jsou především travnaté savany, vlhké skály vyšších poloh a také se hojně vyskytují kolem cest.^{12,13}

Většina rodu *Nerine* vyžaduje slunné podnebí. Druhy jako například *N.bowdenii*, *N.humilis* a *N.sarniens* dávají přednost lokalitám s ranním sluncem a odpoledním stínem. Naopak *N.filifolia*, *N.krigei* se daří na místech, kde svítí slunce po celý den. Zimní druhy jako jsou např. *N.pudica*, *N.ridleyi* a *N.sarniensis* rostou špatně ve velmi vlhkém podnebí.¹⁵

Rostliny rodu *Nerine* jsou velmi dekorativní, a tedy vhodné k okrasnému pěstování.¹⁵

Tabulka 1: Skupiny rostlin rodu *Nerine* založené na růstovém období¹⁶:

| Zimní rostoucí druh | | Letní rostoucí druh | Stálezelené druhy |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>N.appendiculata</i> | <i>N.gracilis</i> | <i>N.humilis</i> | <i>N-angustifolia</i> |
| <i>N.bowdenii</i> | <i>N.hesseoides</i> | <i>N.pudica</i> | <i>N.filifolia</i> |
| <i>N.frithii</i> | <i>N.krigei</i> | <i>N.sarniensis</i> | <i>N.flexuosa</i> |
| <i>N.filamentosa</i> | <i>N-laticoma</i> | | <i>N.masonorum</i> |
| <i>N.gaboronensis</i> | <i>N.marincowitzii</i> | | |
| <i>N.gibsonii</i> | <i>N.pancrotoides</i> | | |
| <i>N. platypetala</i> | <i>N.rehmanii</i> | | |
| <i>N.transvaalensis</i> | <i>N.undulata</i> | | |

4.1 Využití rodu rostlin *Nerine* v tradiční medicíně

Využití rostlin čeledi Amaryllidaceae v tradiční medicíně a lidovém léčitelství je známo již od dob starověku. Zástupci rostlin této čeledi jsou využívány v mnoha zemích a kulturách po celém světě. Používají se například jako obvazy na hojení ran nebo pro kožní a zažívací potíže.^{9,17}

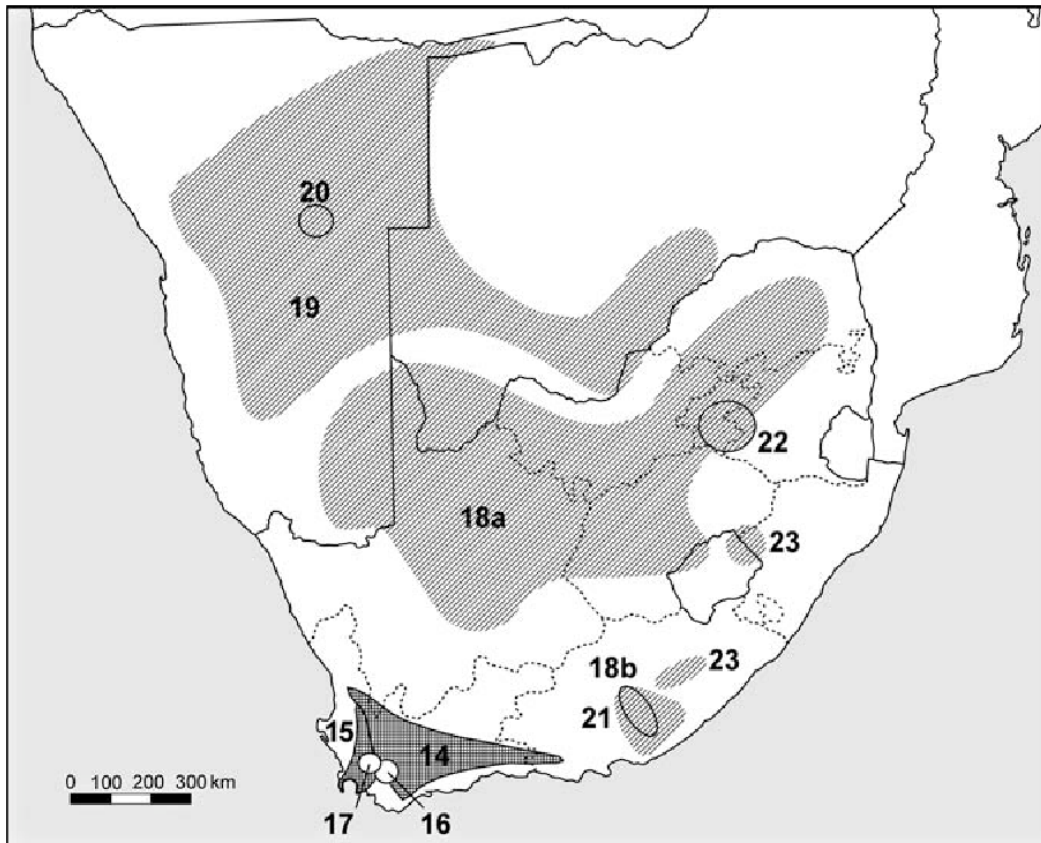
V lidovém a léčitelství a tradiční medicíně má rod *Nerine* své zastoupení. *Nerine bowdenii* se využívá k léčbě kašle, nachlazení a neurodegenerativních poruch.^{13,17} *Nerine filifolia* je vhodná pro léčbu bolesti zad, nachlazení, kašle dále na neplodnost a také při potížích s ledvinami a játry.^{6,18}

4.2 *Nerine bowdenii* a její taxonomické zařazení

4.2.1 Taxonomické zařazení¹⁹

| | |
|----------------|--|
| Říše | rostliny (<i>Plantae</i>) |
| Podříše | cévnaté rostliny (<i>Tracheophyta</i>) |
| Kmen | Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>) |
| Třída | Jednoděložné (<i>Liliopsida</i>) |
| Řád | Chřestotvaré (<i>Asparagales</i>) |
| Čeleď | Amarylkovité (<i>Amaryllidaceae</i>) |
| Rod | <i>Nerine</i> |

4.2.2 Výskyt rostlin rodu *Nerine*



Obrázek 2: Mapa výskytu rostlin rodu *Nerine*²⁰

Tabulka 2 : Členění mapy

| Číslo na mapě | Druh rostliny <i>Nerine</i> |
|---------------|-----------------------------|
| 14. | <i>Nerine humilis</i> |
| 15. | <i>Nerine sarniensis</i> |
| 16. | <i>Nerine pudica</i> |
| 17. | <i>Nerine ridleyi</i> |
| 18., 18A | <i>Nerine laticoma</i> |
| 19. | <i>Nerine duparquetiana</i> |
| 20 | <i>Nerine pusilla</i> |
| 21. | <i>Nerine undulata</i> |
| 22. | <i>Nerine krigei</i> |
| 23. | <i>Nerine bowdenii</i> |

4.2.3 *Nerine bowdenii*

Nerine bowdenii je endemický druh čeledi Amaryllidaceae původem z provincie KwaZulu-Natal a východní provincie Cape v Jižní Africe a je široce používána jako okrasná květina.¹² Druh *N.bowdenii* byl poprvé popsán v roce 1904 Veitchem.¹⁴ V Jižní Africe kvete od února do května, na severní polokouli v podzimních měsících.²¹ Jedná se o letní, vytrvalé, opadavé byliny s podzemní cibulkou, úzkými řemenitými dlouhými listy ve dvou řadách světle zelené barvy, květy v okolíku na přímém stvolu, květní stopky lysé, květy nálevkovité s úzkými okvětními lístky, které mají růžové nebo vzácně bílé zbarvení na okraji zvlňžené a nazpět stočené. Tyčinky se ohýbají směrem nahoru nebo dolů a obsahují krémově zbarvený pyl, stigma má krátké stigmatické laloky. Plodem je tobolka s tenkými membránovými stěnami. *Nerine bowdenii* je odolná i nižším teplotám, cení se její tolerance vůči chladu.^{22,23}



Obrázek 3: *Nerine bowdenii*²³

V roce 2011 bylo identifikováno z čerstvých cibulí *N. bowdenii* 22 alkaloidů patřících do krininového, lykorinového, belladinového a haemanthaminového strukturního typu. Devatenáct alkaloidů bylo identifikováno na základě jejich retenčních časů a hmotnostních spekter. Tyto alkaloidy jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.3).

Struktury 13, 14 a 22 zůstaly nezjištěné. Vzhledem k nízké koncentraci struktur 13 a 14 je jejich případná izolace z rostlinného materiálu a identifikace problematická. Hmotnostní spektrum sloučeniny 22 nebylo nalezeno ani v databázích ani v literatuře.

Nejvíce dominoval v cibulích *N.bowdenii* belladin (4; 49,9%), dále ambellin (17; 9,1%) a *N*-demethylbelladin (7; 8,5%).¹³

Široká škála alkaloidů Amaryllidaceae byla v nedávných studiích hodnocena pro jejich inhibiční aktivitu vůči AChE (acetylcholinesteráza) *in vitro* s pozitivní kontrolou galanthaminu nebo fysostigminu. Výsledky těchto studií ukázaly, že AChE inhibiční aktivita je spojena s alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu. Alkaloidy krininového typu vykazují většinou jen slabou aktivitu proti AChE a z toho vyplývá, že stereochemie nemá žádný vliv na inhibiční aktivitu AChE. Alkaloidní extrakt z čerstvých cibulí z *N.bowdenii* vykazoval poměrně slabou inhibiční aktivitu vůči AChE ($IC_{50} = 87,9 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$), což je v souladu s výše uvedenými závěry, neboť zde nebyly detekovány alkaloidy typu galanthaminu a alkaloidy typu lykorinu byly zastoupeny pouze v nízké koncentraci (2,9%).¹³

Na druhé straně extrakt z *N.bowdenii* vykazoval slibnou inhibiční aktivitu proti HuBuChE (lidská butyrylcholinesteráza) s hodnotou $IC_{50} 14,8 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$. BuChE (butyrylcholinesteráza) hraje důležitou roli v různých stádiích Alzheimerovy choroby (AD), ale zatím byl testován pouze omezený počet alkaloidů na jejich inhibiční aktivitu.¹³

Relativně překvapivá byla slabá aktivita cholinesterázy izolovaného alkaloidu belladinu, který byl dříve izolován pouze z *Nerine filifolia*. Ve srovnání s jeho alkaloidním extraktem z *Nerine bowdenii*, kde dominoval (49,9%), je zřejmé, že inhibiční aktivita HuBuChE *N.bowdenii* musí být spojena s nějakou další sloučeninou přítomnou v malém množství.

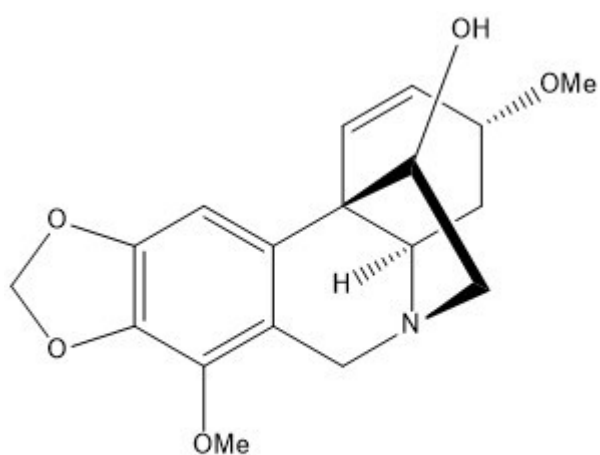
Tabulka 3: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS analýzy z cibulích *N. bowdenii*¹³

| Alkaloid | Retenční čas | % zastoupení |
|--|--------------|--------------|
| 1. Buphanasin, izomer I | 25,34 | 1,4 |
| 2. Buphanasin, izomer II | 25,47 | 0,7 |
| 3. Krinin | 26,45 | 1,3 |
| 4. Belladin | 26,65 | 49,9 |
| 5. Karanin | 27,10 | 0,2 |
| 6. Acetylkaranin | 27,24 | 2,6 |
| 7. <i>N</i> -demethylbelladin | 27,64 | 8,5 |
| 8. Acetylfalkatin | 28,49 | 0,1 |
| 9. Buphanidrin | 28,82 | 2,9 |
| 10. Buphanamin | 28,94 | 1,1 |
| 11. Krinamin | 29,34 | 1,9 |
| 12. Powellin | 29,67 | 0,3 |
| 13. A13 ^c | 30,07 | 0,4 |
| 14. A14 ^c | 30,19 | 0,3 |
| 15. Undulatin | 31,14 | 3,6 |
| 16. 11- <i>O</i> -Acetylbambellin | 31,24 | 4,5 |
| 17. Ambellin | 31,49 | 9,1 |
| 18. Acetylnorbowdin | 32,10 | 0,7 |
| 19. Krinamidin | 32,62 | 0,4 |
| 20. Bowdensin | 32,75 | 2,9 |
| 21. 11- <i>O</i> -Acetyl-1,2-epoxyambellin | 33,52 | 0,4 |
| 22. A22 ^c | 33,87 | 6,8 |

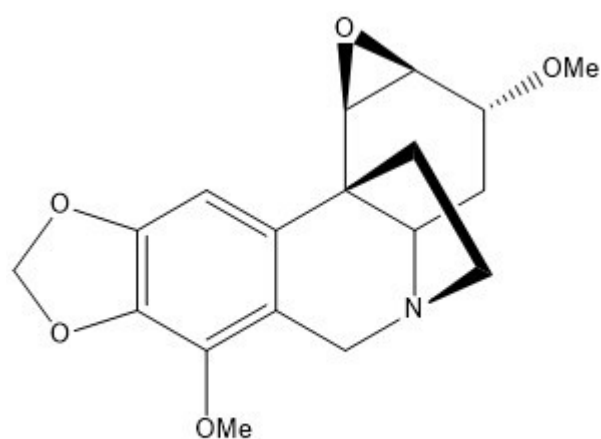
Ve studii z roku 2010 bylo izolováno v biotechnologicky řízené frakci pět alkaloidů z *Nerine bowdenii*, které byly testovány na jejich inhibiční účinek vůči AChE. Jednalo se o ambellin, 11-*O*-acetylbambellin, buphanisin, undulatin a galanthamin. Hodnoty IC₅₀ studovaných alkaloidů a jejich struktury jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 4) a obrázku (Obr.4).¹⁸

Undulatin se ukázal jako nejsilnější inhibitor AChE s 10krát nižší aktivitou než galantamin. Hodnota IC₅₀ získaná pro galantamin se shoduje s již dříve publikovanými daty. Přestože pro filifolin nebyla stanovena žádná hodnota IC₅₀, sloučenina by se mohla

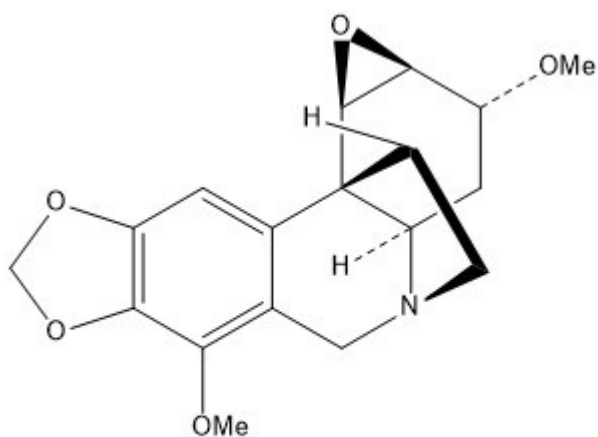
ukázat jako velmi zajímavá. Proč inhibiční aktivita tohoto alkaloidu nebyla uvedena není v předmětném článku uvedeno, dá se předpokládat, že byla látka byla izolována pouze ve velmi malém množství. Ve vazbě na inhibici AChE, potenciální léčba AD, pochází z cílení na nikotinové acetylcholinové receptory. Dále se uvádí, že několik alkaloidů včetně galanthaminu interaguje s nikotin acetylcholinovými receptory. Je totiž možné, že i filifolin interaguje s nikotinovými acetylcholinovými receptory, váže se na ně a může tak mít synergické účinky a působit jako inhibitor AChE.¹⁸



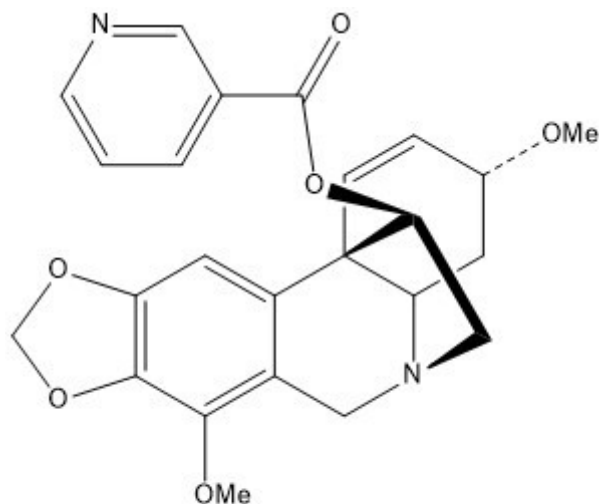
Ambellin



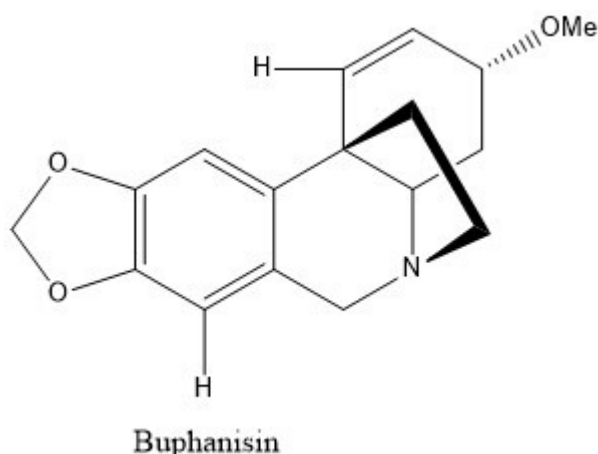
11-O-acetylabellin



Undulatin



Filifolin



Obrázek 4: Chemické struktury izolované z cibulí *N. bowdenii*¹⁸

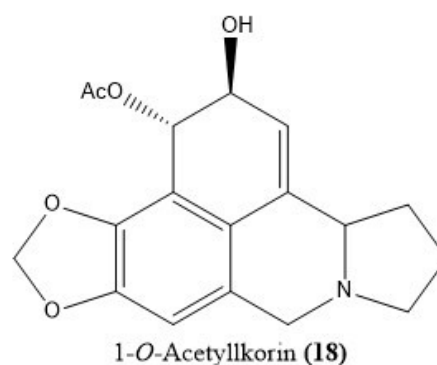
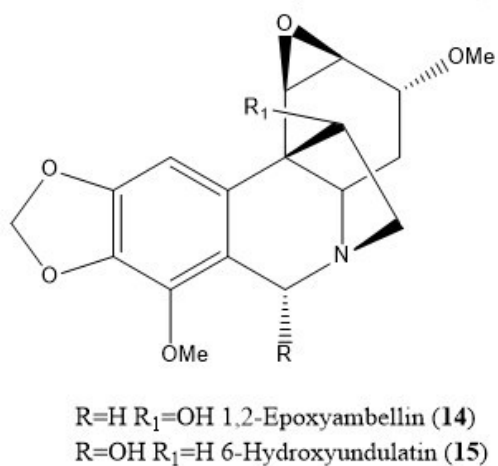
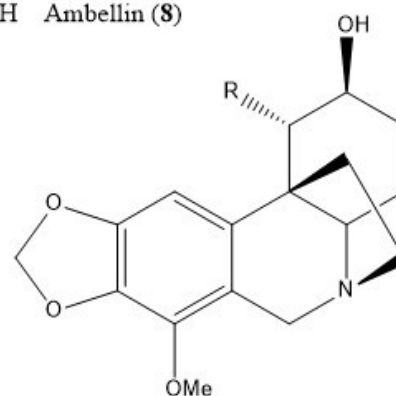
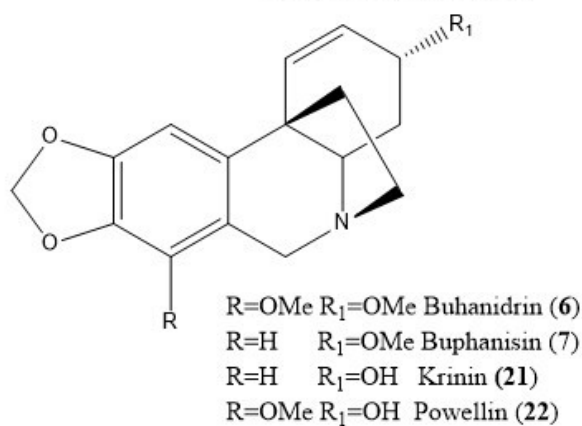
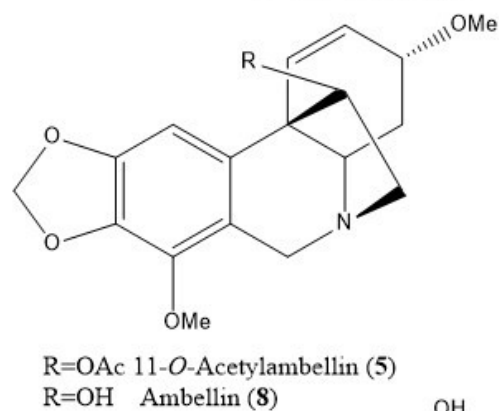
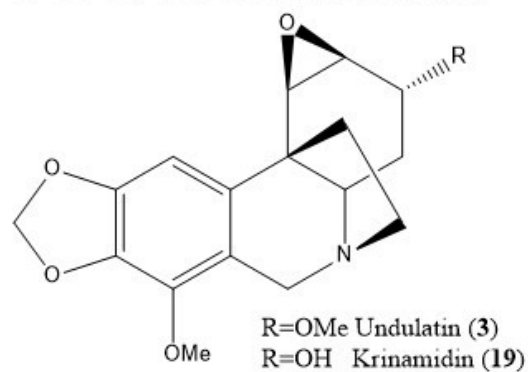
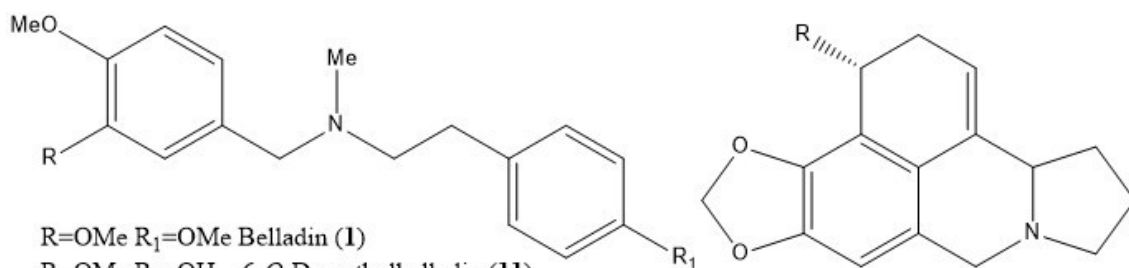
Tabulka 4: Inhibice AChE alkaloidů izolovaných z *N. bowdenii* vyjádřených jako IC_{50} .¹⁸

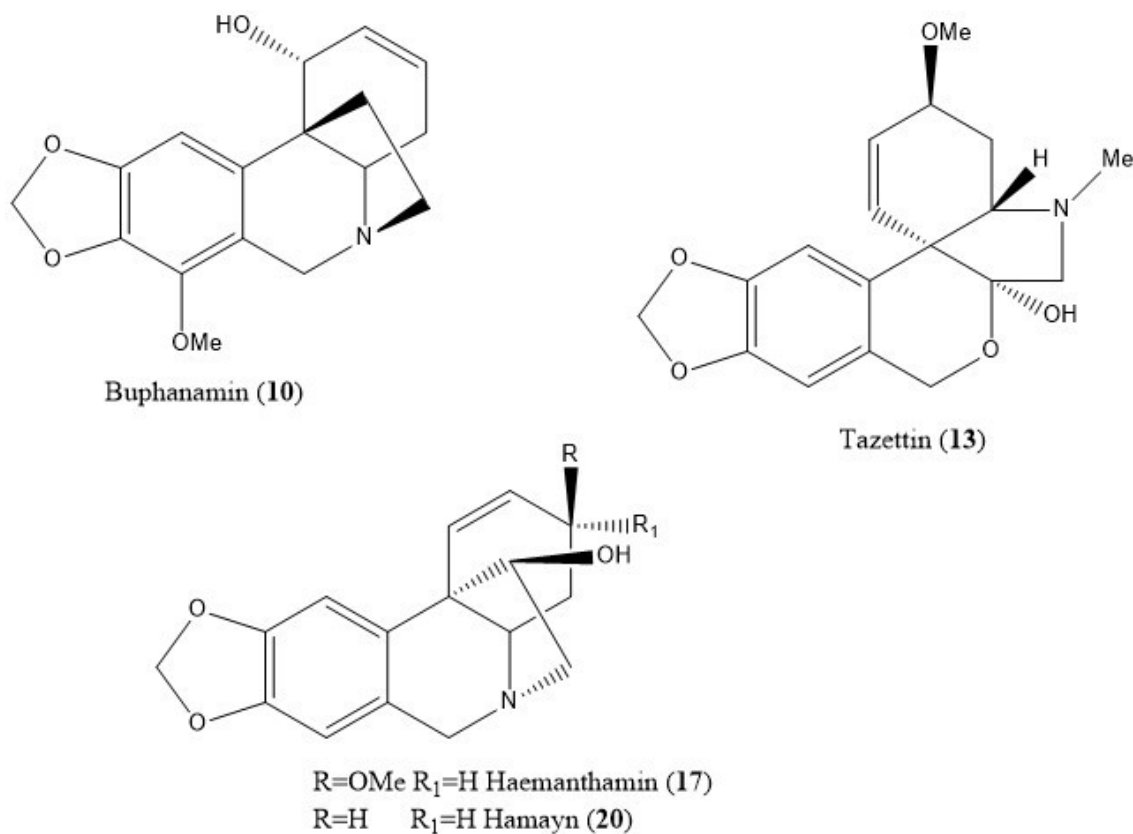
| Alkaloid | $IC_{50}(\mu M)$ |
|-----------------------------|------------------|
| Ambellin | 1270 |
| 11- <i>O</i> -Acetylabellin | 1160 |
| Buphanisin | 290 |
| Undulatin | 37 |
| Galantamin | 4 |

Ve studii zveřejněné výzkumnou skupinou ADINACO (výzkumná skupina, Katedra farmaceutické botaniky, Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Hradec Králové) v roce 2016 je uvedena izolace amarylkovitých alkaloidů z čerstvých cibulí *N. bowdenii* a inhibiční účinek těchto látek vůči erytrocytární AChE plazmatické BuChE a prolyloligopeptidázy (POP).¹²

Prolyloligopeptidáza (POP) je cytosolická serinová peptidáza, která hydrolyzuje malé peptidy obsahující prolin. Ke štěpení dochází na karboxy-koncích prolinových zbytků. Jako substráty se používají vazopresin, substance P a hormony uvolňující tyotropin. Ten se účastní procesu paměti a učení. Tyto neuropeptidy jsou známé jako důležité modulatory kognitivních funkcí.²³ Inhibice POP se jeví jako vhodná podpůrná terapie při léčbě AD.

Za využití běžných chromatografických metod jako je sloupcová chromatografie nebo preparativní tenkovrstvá chromatografie bylo izolováno dvacet známých alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (Obr.5) a dvě zcela nové struktury.





Obrázek 5: Struktury izolované z čerstvých cibulí *Nerine bowdenii*¹²

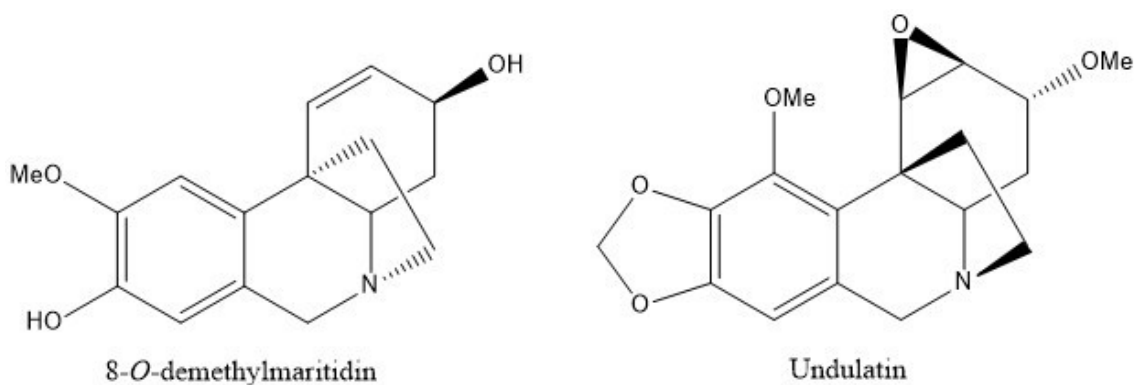
Struktury známých alkaloidů byly určeny porovnáním jejich MS a NMR spekter s literárními údaji a dalšími fyzikálními vlastnostmi. Jmenovitě se jednalo o následující alkaloidy belladin (1), acetylkararin (2), undulatin (3), kararin (4), 11-*O*-acetylbelladin (5), buphanidrin (6), buphanisin (7), ambellin (8), deacetylbowdesin (9), buphanamin (10), 6-*O*-demethylbelladin (11), 4'-*O*-demethylbelladin (12), tazettin (13), 1,2β-epoxyambellin (14), 6α-hydroxyundulatin (15), 1-*O*-acetylbulbisin (16), haemanthamin (17), 1-*O*-acetyllykorin (18), krinamidin (19), hamayn (20), krinin (21) a powellin (22). Izolované alkaloidy patří do následujících strukturních typů: belladinový (1, 11, 12), krininový (3, 5-10, 14-16, 19, 21, 22), haemanthaminový (17, 20), lykorinový (2, 4, 18) a tazettinový (13). Jako nové sloučeniny byly identifikovány alkaloidy: 6-*O*-demethylbelladin (11) a 4'-*O*-demethylbelladin (12), které patří do belladinové strukturního typu.

Všechny izolované sloučeniny získané v dostatečném množství byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči HuAChE, HuBuChE a inhibiční aktivitu vůči POP. Výsledky vyjádřené jako hodnoty IC₅₀ jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.6). Nejaktivnějšími alkaloidy v HuAChE testu byly dva alkaloidy krininového typu a to

undulatin ($IC_{50} = 23,5 \pm 1,2 \mu M$) a powellin ($IC_{50} = 29,1 \pm 1,6 \mu M$). Undulatin byl již dříve označen jako zajímavý inhibitor AChE, který působí prostřednictvím mechanismu smíšené inhibice a na základě paralelního testu umělé permeace (PAMPA) pro predikci metody hematoencefalické bariéry (HEB) je schopen překročit HEB pomocí pasivní permeace. Undulatin navíc vykazuje zajímavou inhibiční aktivitu vůči POP ($IC_{50} = 7,4 \pm 0,03 \mu M$).¹²

V rámci další studie vědecké skupiny ADINACO z roku 2016 byl studován mechanismus inhibice AChE u dvou alkaloidů Amaryllidaceae, a to u undulatinu a 8-*O*-demethylmaritidinu a jejich možný přestup přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Na základě získaných experimentálních dat byly zjištěny hodnoty IC_{50} pro undulatin ($IC_{50} = 7,4 \pm 0,03 \mu M$) a pro 8-*O*-demethylmaritidin ($IC_{50} = 57,4 \pm 0,1 \mu M$). V rámci této studie byla použita komerční AChE z elektrického úhoře tak, aby mohly být výsledky porovnány s dříve publikovanými údaji. Jednou z hlavních překážek pro léčbu onemocnění CNS je prostup léčiv přes HEB v terapeutických koncentracích. HEB představuje komplexní rozhraní mezi krví a centrálním nervovým systémem, které striktně řídí výměny mezi krevním a mozkovým oddílem. HEB je tvořena buňkami, které k sobě těsně přiléhají, jsou to tzv. tight junctions. Látka, která prochází přes HEB musí být tedy vysoce lipofilní nebo velmi malá.²⁴

Na základě získaných dat bylo možné konstatovat, že pouze undulatin je schopen prostoupit přes HEB mechanismem pasivní permeace.²⁴



V rámci studie byl také izolován 1-*O*-acetyllykorin, který byl v dřívější literatuře uváděn jako velmi silný inhibitor s až desetkrát silnějším potenciálem inhibice AChE ($IC_{50} = 0,96 \pm 0,04 \mu M$). V rámci studií provedených skupinou ADINACO byla tato látka zcela neaktivní ve studii jejího inhibičního potenciálu. Tyto zcela rozdílné výsledky je možné vysvětlit použitím odlišných zdrojů acetylcholinestrázy pro biologický test.

V rámci studie, kde látka vykazovala silný inhibiční potenciál byla použita komerčně dostupná AChE z elektrického úhoře, v rámci studie z roku 2016 byla použita erytrocytární AChE. Na základě protichůdných výsledků byly provedeny skupinou ADINACO stejné experimenty s komerčně dostupnou acetylcholinesterázou z elektrického úhoře, aby se mohla porovnat hodnota IC₅₀ 1-*O*-acetyllykorinu s uvedenými údaji. S použitím acetylcholinesterázy z elektrického úhoře vykazoval 1-*O*-acetyllykorin inhibiční aktivitu s hodnotou IC₅₀ 28,4 ± 0,35 μM. Tato hodnota je sice bližší hodnotě IC₅₀ z dřívějších studií, zdaleka ale nedosahuje původně publikovaného potenciálu. Zdá se tedy, že zdroj enzymu je v některých případech rozhodující pro stanovení AChE inhibiční aktivity testovaných sloučenin. Pro stanovení inhibičního mechanismu 1-*O*-acetyllykorinu byl použit diagram Linewear-Burk. Ze získaných výsledků lze usoudit, že 1-*O*-acetyllykorin působí prostřednictvím smíšeného inhibičního mechanismu.¹²

V rámci studie z roku 2016 byl studován inhibiční potenciál izolovaných alkaloidů i vůči HuBuChE. Nejzajímavější inhibiční aktivita vůči HuBuChE byla zjištěna u nově identifikovaného alkaloidu 4'-*O*-demethylbelladinu (IC₅₀= 30,7 ± 4,0 μM). Ostatní testované alkaloidy vykazovaly pouze nízkou nebo žádnou inhibiční aktivitu.¹³

Inhibice POP byla testována z důvodu, že by mohla představovat zajímavý podpůrný přístup při léčbě AD. Nejzajímavější inhibiční aktivita byla demonstrována u alkaloidů 4-*O*'-demethylbelladinu, buphanidrinu a 1-*O*-acetyllokorinu s hodnotami IC₅₀= 0,37 ± 0,03 Mm; 0,37 ± 0,05mM a 0,45 ± 0,05mM. (Tab. 6.) Již dříve byly testovány některé amarylkovité alkaloidy na inhibiční aktivitu vůči POP, jako nejlepší se zatím jeví alkaloidy lykorinového typu, acetylkarantin (IC₅₀ = 0,65 ± 0,04mM), karantin (IC₅₀=1,99 ± 0,33mM) a 1-*O*-acetyllykorin (IC₅₀= 0,45 ± 0,05mM).¹²

Tabulka 6: *HuAChE, HuBuChE a POP inhibiční aktivita testovaná na amarylkovitých alkaloidech izolovaných z N.bowdenii vyjádřená jako IC₅₀*¹²

| Sloučenina | HuAChE IC₅₀^a (μM) | HuBuChe IC₅₀^a(μM) | POP IC₅₀^a(mM) |
|--------------------------------|--|--|--|
| Belladin (1) | 699,2 ± 19,4 | 315,3 ± 10,5 | >100 |
| Acetylkarantin (2) | 433,2 ± 62,4 | 141,2 ± 12,6 | 0,65 ± 0,04 |
| Undulatin (3) | 23,5 ± 1,2 | >1000 | 1,97 ± 0,12 |
| Karantin (4) | >1000 | 187,6 ± 51,3 | 1,99 ± 0,33 |
| 11- <i>O</i> -Acetylbellin (5) | >1000 | > 1000 | >0,79 ^d |
| Buphanidrin (6) | 72,6 ± 8,2 | >1000 | 0,37 ± 0,04 |
| Buphanisin (7) | 99,2 ± 4,2 | >1000 | >100 |
| Ambellin (8) | 169,2 ± 7,4 | 985,4 ± 25,6 | >100 |
| Deacetylbowdesin (9) | 427,9 ± 31,4 | >1000 | 0,79 ± 0,06 |
| Buphanamin (10) | 236,5 ± 32,3 | 626,2 ± 67,9 | 3,11 ± 0,36 |

| | | | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| 6- <i>O</i> -Demethylbelladin (11) | 223,2 ± 23,6 | 115,7 ± 10,1 | 0,66 ± 0,09 |
| 4'- <i>O</i> -Demethylbelladin (12) | 606,8 ± 74,2 | 30,7 ± 4,0 | 0,37 ± 0,03 |
| Tazettin (13) | >1000 | >1000 | >100 |
| 1,2β-Epoxyambellin (14) | nm ^b | nm ^b | nm ^b |
| 6α-Hydroxyundulatin (15) | >1000 | 624,8 ± 95,0 | nm ^b |
| 1- <i>O</i> -Acetylbulbisin (16) | 84,8 ± 11,0 | 481,7 ± 84,1 | 2,45 ± 0,21 |
| Haemanthamin (17) | >1000 | >1000 | >100 |
| 1- <i>O</i> -Acetylylkorin (18) | >1000 | 176,2 ± 14,2 | 0,45 ± 0,05 |
| Krinamidin (19) | 230,1 ± 9,8 | >1000 | 0,79 ± 0,06 |
| Hamayn (20) | 992,7 ± 220,7 | 472,0 ± 37,0 | >100 |
| Krinin (21) | >1000 | 770,0 ± 46,9 | 1,47 ± 0,12 |
| Powellin (22) | 29,1 ± 1,6 | 394,0 ± 4,8 | 0,77 ± 0,02 |
| Galanthamin (standard) | 1,7 ± 0,1 | 42,3 ± 1,3 | >100 |
| Berberin (standard) | - | - | 0,14 ± 0,02 |

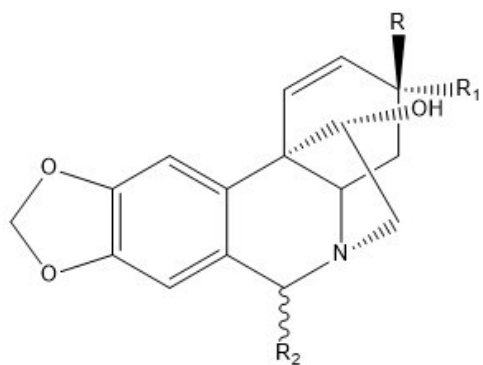
Některé alkaloidy izolované z *N.bowdenii* byly testovány ve studii z roku 2016 také na jejich cytotoxickou aktivitu proti mutovaným p53, Caco-2 a HT-29 kolorektálním adenokarcinomovým buňkám, uvedeno v tabulce (Tab.7). Současně byly použity zdravé buňky tenkého střeva k určení celkové toxicity proti zdravým (nekarcinogenním) buňkám. Z testovaných sloučenin byla prokázána zajímavá cytotoxicita u alkaloidu buphanisinu, který vykazoval cytotoxicitu proti oběma buňkám (p-53, Caco-2 a HT-29), přičemž měl významně nižší toxicitu proti normálním buňkám FHs-24 ve střevě (viz Tab.7).¹⁷

Základní vztah mezi strukturou a aktivitou (SAR – structure activity relationship) alkaloidů krininového typu byl nastíněn ve studii z roku 2009²⁵ publikovanou McNulty a kol. V rámci této studie byl studován cytotoxický potenciál alkaloidů krininového typu. U alkaloidů byla testována schopnost indukovat apoptózu v buňkách hepatomu (5123c) jater potkana. V souladu s výsledky McNulty a kol. je silná cytotoxická aktivita alkaloidů typu krininu spojena s přítomností C-2 můstku, jako je u haemanthaminu a haemanthidinu. Alkaloidy s C2-můstkem ve své struktuře, obsahují například testovaný buphanisin izolovaný z cibulí *Boophone disticha*, které demonstrovaly významnou antiproliferační aktivitu v buňkách lidské akutní lymfoblastické leukémie (CEM) a silné cytotoxické účinky na buněčnou linii lidského cervikálního adenokarcinomu (HeLa).¹⁷

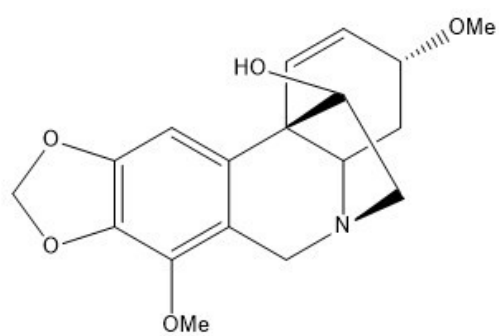
Tabulka 7: Cytotoxicita testovaných sloučenin proti dvěma rakovinným buněčným liniím a jedné nekarcinogenní gastrointestinální buněčné linii¹⁷

| Sloučenina | Rakovinotvorné | buňky | Zdravé |
|-------------------------|--|---|--|
| | Caco-2 IC ₅₀ ^a (μM) | HT-29 IC ₅₀ ^a (μM) | FHs 74 Int IC ₅₀ ^a (μM) |
| Acetylkarantin (2) | 29,5 ± 0,6 | 19,2 ± 1,2 | 66,1 ± 6,8 |
| Karantin (4) | 64,4 ± 4,5 | 46,6 ± 1,9 | >100 |
| 11-O-Acetylambellin (5) | >100 | >100 | >100 |
| Buphanisin (7) | 8,6 ± 0,2 | 5,3 ± 1,7 | 22,8 ± 2,6 |
| Krinin (21) | 64,5 ± 17,8 | 50,8 ± 1,4 | >100 |
| Vinorelbin | 0,03 ± 0,00 | NT | 4,0 ± 0,3 |

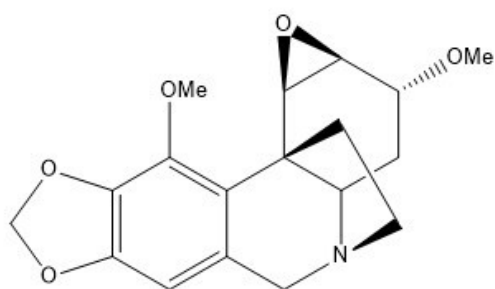
Další studie, která se zabývala cytotoxickou aktivitou amarylkovitých alkaloidů proti rakovinným buňkám gastrointestinálního traktu byla publikována v roce 2015. V této studii byl proveden screening a stanovena *in vitro* IC₅₀ u 13 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae proti dvěma p-53 mutovaným buněčným liniím lidského gastrointestinálního karcinomu. Cytotoxická aktivita byla paralelně testována proti epiteliálním kolorektálním adenokarcinomovým buňkám Caco-2 a epiteliálním kolorektálním adenokarcinomovým buňkám HT-29 se stoupajícími koncentracemi až do 100 mikronů po dobu 72 hodin a analyzována MTT stanovením. Buněčné normální střevní buňky FHs 74 Int byly použity jako kontrola celkové toxicity. Všechny testované alkaloidy byly v naší laboratoři dříve izolovány z dvou rostlinných druhů, a to ze *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans* a patří k pěti strukturním typům alkaloidů Amaryllidaceae (krinanový typ α a β, galanthaminový typ, lykorinový typ a tazettinový typ). Následně byla většina těchto alkaloidů izolována i z rostlin rodu *Nerine*. Chemické struktury testovaných alkaloidů jsou shrnuje následující obrázek (Obr.7). V experimentu byl jako pozitivní kontrola použit vinorelbin, semisyntetický vinka alkaloid. Hodnoty IC₅₀, stanovené pomocí testu cytotoxicity na bázi MTT, jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.8.).²⁶



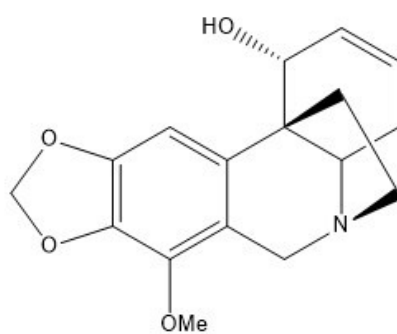
R=OMe, R₁=H, R₂=H Haemanthamin (1)
 R=OMe, R₁=H, R₂=OH Haemanthidin (2)
 R=H, R₁=OH, R₂=H Hamayn (3)



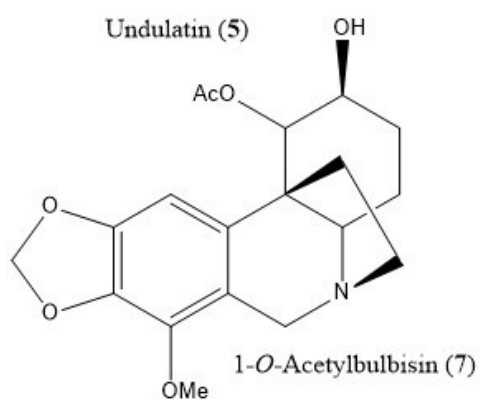
Ambellin (4)



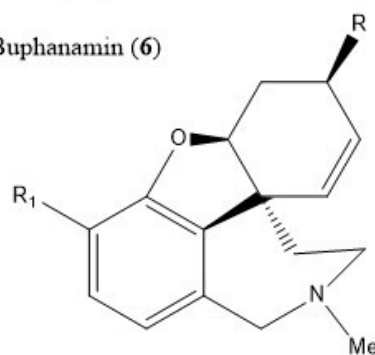
Undulatin (5)



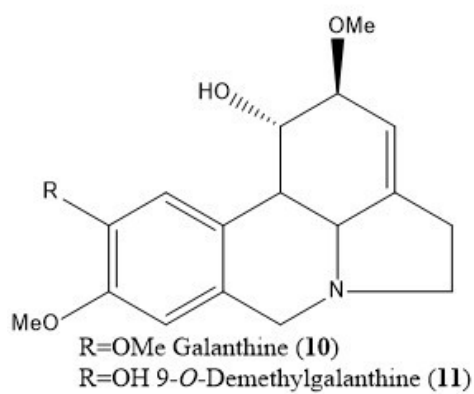
Buphanamin (6)



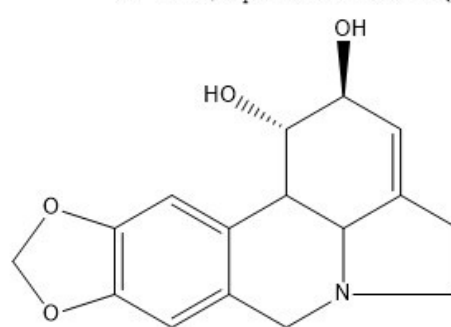
1-O-Acetylbulsisin (7)



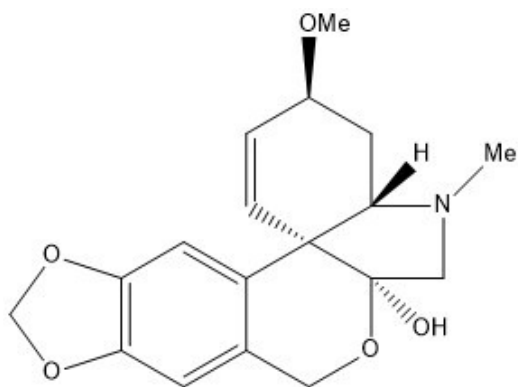
R=OH, R₁=OMe Galanthamin (8)
 R=OMe, R₁=OH Chlidanthin (9)



R=OMe Galanthine (10)
 R=OH 9-O-Demethylgalanthine (11)



Lykorin (12)



Tazettin (13)

Obrázek 6: Chemické struktury analyzovaných Amaryllidaceae alkaloidů

Tabulka 8: Cytotoxicita testovaných sloučenin proti dvěma rakovinným buněčným liniím a jedné nekarcinogenní gastrointestinální buněčné linii²⁶

| Alkaloid | Rakovinotvorné | buňky | Zdravé |
|-------------------------------------|--|---|--|
| | Caco-2 IC ₅₀ ^a (μM) | HT-29 IC ₅₀ ^a (μM) | buňky FHs-74Int IC ₅₀ ^a (μM) |
| Haemanthamin (1) | 0,99 ± 0,14 | 0,59 ± 0,01 | 19,47 ± 8,86 |
| Haemanthidin (2) | 3,29 ± 0,91 | 1,72 ± 0,11 | 11,63 ± 0,86 |
| Hamayn (3) | 17,23 ± 0,93 | 12,36 ± 0,30 | 53,31 ± 7,25 |
| Ambellin (4) | 74,09 ± 1,10 | 50,18 ± 1,17 | 89,82 ± 6,46 |
| Undulatin (5) | 51,71 ± 1,08 | 53,39 ± 2,21 | 70,43 ± 6,82 |
| Buphanamin (6) | 53,52 ± 0,68 | 47,59 ± 2,18 | >100 |
| 1- <i>O</i> -Acetylbulsisin (7) | 33,39 ± 2,85 | 47,94 ± 1,57 | 61,32 ± 8,80 |
| Galanthamin (8) | 61,43 ± 1,56 | 49,27 ± 2,38 | 67,63 ± 7,70 |
| Chlidanthin (9) | 72,93 ± 2,35 | 52,66 ± 1,19 | 78,11 ± 0,00 |
| Galanthin (10) | 58,86 ± 1,00 | 50,48 ± 1,10 | >100 |
| 9- <i>O</i> -Demethylgalanthin (11) | 38,84 ± 2,25 | 25,64 ± 0,28 | 76,58 ± 12,66 |
| Lykorin (12) | 0,99 ± 0,08 | 1,20 ± 0,01 | 22,68 ± 0,09 |
| Tazettin (13) | 22,83 ± 3,29 | 23,37 ± 1,97 | 71,11 ± 5,19 |
| Vinorelbin (standard) | 0,03 ± 0,00 | NT | 3,98 ± 0,26 |

Mezi testovanými sloučeninami nejsilnější cytotoxický potenciál proti oběma testovaným liniím vykazoval haemanthamin (1), (IC₅₀=0,99 ± 0,14 μM), haemanthidin (2), (IC₅₀=3,3 ± 0,9 μM) a lykorin (12), (IC₅₀ = 0,99 ± 0,08 μM) vůči Caco-2 buňkám, vůči buněčné linii HT-29 byly získány následující hodnoty IC₅₀ pro 1 (IC₅₀ = 0,59 ± 0,01 μM), 2 (IC₅₀ = 1,7 ± 0,1 μM) a 12 (IC₅₀ = 1,2 ± 0,0 μM). V rámci studie byla testována i toxicita vůči zdravé linii buněk tenkého střeva FHs 74 Int. Bylo zjištěno, že prakticky všechny studované alkaloidy vykazují nízkou až velmi nízkou toxicitu vůči zdravým

střevním fibroblastů. Toto zjištění je důležité především u alkaloidů s cytotoxickým potenciálem proti nádorovým liniím, jako je haemanthamin ($IC_{50} = 19,47 \pm 8,86 \mu M$), haemanthidin ($IC_{50} = 11,63 \pm 0,86 \mu M$) a lykorin ($IC_{50} = 22,68 \pm 0,09 \mu M$). Výsledky této studie se shodují s výsledky předchozí práce z roku 2015, ve které byl hodnocen cytotoxický potenciál vybraných Amaryllidaceae alkaloidů vůči buněčné linii HT-29. Ve studii Luo et al. vykazoval lykorin cytotoxicitu s hodnotou $IC_{50} = 3,2 \mu M$. Podobně jako u experimentů v studii z roku 2016²⁶ vykazoval haemanthamin silnější cytotoxický potenciál $IC_{50} = 2,1 \mu M$. Ve stejné studii vykazovaly obě sloučeniny ve srovnání s lidskou bronchiální epiteliální buněčnou linií Beas-2B cytotoxickou selektivitu až 10.²⁶ To znamená, že, vykazují relativně nízkou toxicitu k zástupcům zdravých buněk nebo buněk klidových.⁵ Vzhledem k tomu, že hlavním cílem v předklinickém vývoji protinádorových léčiv je hledat specifické protinádorové látky, je selektivní toxicita zjištěná u lykorinu, haemanthaminu a haemanthidinu proti nádorovým buňkám velice pozitivním výsledkem, který může vést k vývoji látek pro terapii nádorových onemocnění. Dále tato studie poprvé vyhodnotila rakovinotvornou buněčnou specifickou aktivitu haemanthaminu, která má silný cytotoxický účinek proti mnoha buněčným liniím karcinomu, jak je popsal Nair a kol. Široce popsána protinádorová aktivita lykorinu, která byla *in vivo* demonstrována v buňkách myšičího melanomu B16-BL6 u myši po intravenózní injekci a v xenotransplantátu Lewisova karcinomu plic stejně jako *in vitro* proti dobře stanoveným buňkám HeLa a mnoha jiným typům rakovinných buněk jako CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ3.²⁶

Alkaloidy obsahující β -C2 můstek ve své struktuře jako např. krinin, nevykazovaly v doposud provedených studiích výraznou cytotoxicitu. Alkaloidy mající ve své struktuře α -C2 můstky vykazují cytotoxickou aktivitu. Orientace α pro 5,10b-ethanový můstek se zdá být důležitá pro cytotoxickou aktivitu.²⁶ Výsledky Kim a kol. naznačují, že přítomnost můstku α C2 je také korelována s inhibiční aktivitou proti faktoru 1 (HIF-1), proteinu indukovatelnému hypoxií, který transkripčně aktivuje geny indukované hypoxií. Přemostěné sloučeniny typu α -C2 krinamin a haemanthamin vykazovaly signifikantní inhibiční aktivitu závislou na dávce proti transkripční aktivaci HIF-1, zatímco perchlorát buphanidrinu nevykazoval žádnou inhibiční aktivitu.²⁷

V jiné studii od McNulty a kol. je uvedeno že, α -C-2 přemostěný alkaloid hamayn vykazoval pouze mírnou cytotoxickou aktivitu proti rakovinovým buňkám gastrointestinálního traktu. Podobně také hlásili slabší cytotoxickou aktivitu hamaynu proti buňkám Jurkat.²⁵ Současné výsledky s H-3 hydroxylovým derivátem hamaynu a

C-3 methoxy derivátem haemantaminu a haemanthainu podporují hypotézu McNulty, že je vyžadován akceptor H-vazby u C-3 a že polohování je do určité míry flexibilní. Pravděpodobně konformační účinky při umístění hydroxylové skupiny vedou k slabší cytotoxické aktivitě hamaynu. Pro ostatní strukturální požadavky farmakoforických prvků musí být připraven a testován širší rozsah alkaloidů α -krininového resp. haemanthaminového typu a jejich derivátů.²⁸

4.2.4 *Nerine filifolia*

N. filifolia pochází z oblastí letních srážek východního Capeu, Svazijska a Mpumalanga, kde roste v rozsáhlých koloniích na exponovaných skalních deskách, ve výklencích skal nebo v těžkých jílovitých půdách.

Jedná se o vytrvalou cibulovitou bylinu se stále zelenými, tenkými listy a četnými květinovými stvoly, které nesou 8-10 pavoučích květů světle růžové nebo červené barvy. Kvete na podzim.^{22,29}

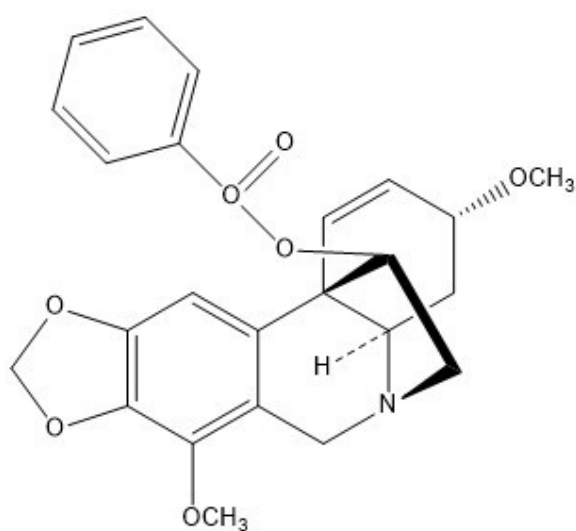


Obrázek 7: *Nerine filifolia*³⁰

Ve fytochemické studii z roku 2014 bylo obvyklými chromatografickými a extrakčními postupy izolováno z *Nerine filifolia* osm alkaloidů. Známé alkaloidy jako belladin, 11-*O*-acetylambellin a undulatin byly izolovány jako hlavní složky, alkaloidy zastoupené v menším množství byly ambellin a 6 α -hydroxybuphanidrin. Alkaloidy *N*-demethylbelladin, 6 α -methoxybuphanidrin a filifolin., 11-*O*-nikotinyambellin byly vůbec poprvé izolovány z rostlinného materiálu. Předchozí fytochemická analýza *N. filifolia* (z roku 1990) vedla k detekci malého množství galanthaminu.⁶

V rámci této studie byl také připraven derivát ambellinu, konkrétně 11-*O*-benzoylambellin (Obr.8.).⁶

Z izolovaných látek byl z pohledu biologické aktivity studován pouze filifolin. Tento alkaloid nevykazoval cytotoxickou aktivitu vůči buňkám L6. L6 je buněčná linie myoblastů myši. Dále byla studována *in vitro* protozoální aktivita proti čtyřem kmenům *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* a *Plasmodium falciparum*. Bohužel filifolin nevykázal žádnou antiprotozoální aktivitu.⁶



Benzoylambellin

Obrázek 8: Struktura benzoylambellinu

V rámci studie z roku 2012 byl připraven alkaloidní extrakt z čerstvých cibulí *N. filifolia*, který byl podroben GC/MS analýze za účelem identifikace jednotlivých složek. Připravený extrakt byl dále studován z pohledu jeho inhibiční aktivity vůči cholinesterázám. V alkaloidním extraktu *Nerine filifolia* došlo k identifikaci následujících alkaloidů galanthamin, krinin, karanin, acetylkarantin, masonin, lykorin, *N*-demethylmasonin, acetylparkamin a parkamin, dále ještě dva alkaloidy, které se nepodařilo identifikovat. Výsledky této studie jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.9).¹⁸

4.2.5 *Nerine filamentosa*

Nerine filamentosa se vyskytuje v Jižní Africe v malé oblasti Východního Kapska. Roste na skalnatých místech, nevadí jí ani slunce ani stín. Jedná se o vytrvalou cibulovitou rostlinu rostoucí v létě, stálezelený druh. Listy má tenké až nit'ovité, květy bývají na 15 – 25 cm stonku a mají jasně růžové zbarvení.^{22,29}



Obrázek 9: *Nerine filamentosa*³¹

V rámci studie z roku 2012 byl připraven alkaloidní extrakt z čerstvých cibulí *N. filifolia*, který byl podroben GC/MS analýze za účelem identifikace jednotlivých složek. Připravený extrakt byl dále studován z pohledu jeho inhibiční aktivity vůči cholinesterázám. Z *N. filamentosa* byly izolovány alkaloidy buphanamin, lykorin, undulatin, ambellin, *N*-demethylmasonin, acetylparkamin a parkamin a také dva alkaloidy, které se nepodařilo identifikovat.³⁹ Jejich přehled je v následující tabulce (Tab.9).¹⁸

Tabulka 9: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS analýzy z *N. filifolia* a *N. filamentosa*¹⁸

| Alkaloidy | Retenční čas | % zastoupení | |
|-------------------------------|--------------|---------------------|-----------------------|
| | | <i>N. filifolia</i> | <i>N. filamentosa</i> |
| 1. Galanthamin | 21,17 | 1 | |
| 2. Krinin | 23,38 | 2 | |
| 3. Karanin | 24,50 | 9 | |
| 4. Acetylkaranin | 24,88 | 1 | |
| 5. A9 ^c | 27,17 | | 2 |
| 6. Buphanamin | 27,31 | | 20 |
| 7. Masonin | 28,79 | 71 | |
| 8. Galanthin | 29,43 | | |
| 9. Lykorin | 29,79 | 4 | 2 |
| 10. Undulatin | 30,48 | | 45 |
| 11. Ambellin | 30,96 | | 13 |
| 12. <i>N</i> -Demethylmasonin | 30,98 | 11 | |
| 13. Acetylparkamin | 31,79 | | 11 |
| 14. Parkamin | 32,32 | | 3 |
| 15. A22 ^c | 32,47 | | 3 |

V alkaloidním profilu u *N. filifolia* bylo identifikováno sedm sloučenin, které vykazovaly charakteristiku fragmentace MS typickou pro alkaloidy čeledi Amaryllidaceae. Šest alkaloidů se podařilo na základě jejich EI-MS spekter identifikovat. V alkaloidním vzorku cibulí dominovaly alkaloidy homolykorinového typu masonin, *N*-demethylmasonin a alkaloid lykorinového typu karanin.¹⁸

V alkaloidním vzorku *N. filamentosa* dominovaly tři alkaloidy krininového typu: undulatin (42%), buphanamin (20%) a ambellin (13%), a jeden alkaloid lykorinového typu, který byl předběžně identifikován na základě fragmentace jako acetylparkamin (19%). Parkamin a acetylparkamin byly identifikovány porovnáním jejich MS s hodnotami známých sloučenin stejného strukturního typu, které jsou k dispozici v knihovně NIST. Parkamin vykazoval spektrum typické pro alkaloid lykorinového typu substituovaný buď na C-1 nebo C-2. Nicméně další izolace a spektroskopické studie těchto sloučenin jsou nezbytné pro jejich jednoznačnou identifikaci a stanovení struktury.¹⁸

HuAChE a HuBuChE inhibiční aktivity testovaných extraktů z *N. filifolia* a *N. filamentosa* jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.10).¹⁸

Tabulka 10: HuAChE a HuBuChE inhibiční aktivita alkaloidních extraktů *N. filifolia* a *N. filamentosa*¹⁸

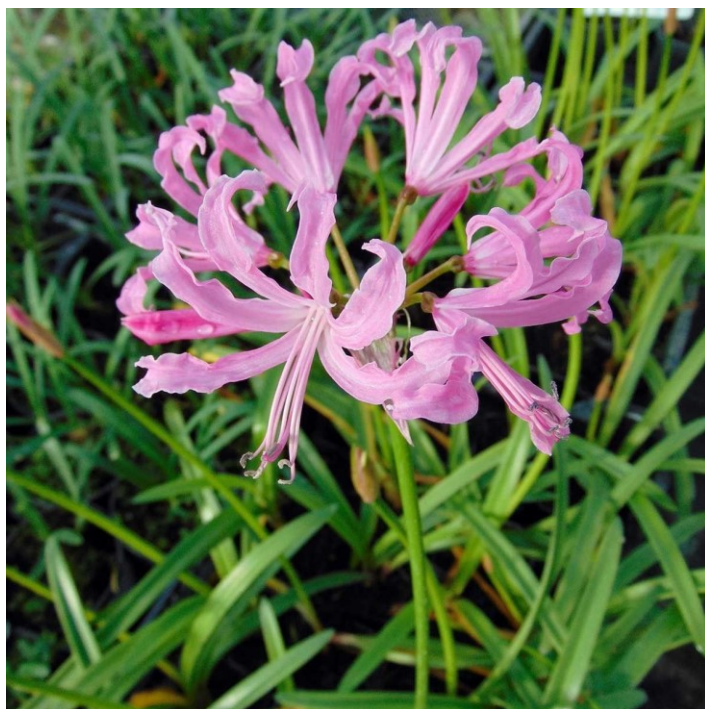
| Druh rostliny | HuAChE IC ₅₀ (μg/mL) | HuBuChE IC ₅₀ (μg/mL) |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Nerie filifolia</i> | 21,6 ± 1,1 | 13,0 ± 0,7 |
| <i>Nerine filifolia</i> | 18,5 ± 0,8 | 58,6 ± 1,3 |

Alkaloidní extrakty byly testovány na inhibiční aktivitu HuAChE a HuBuChE. Slibná aktivita inhibice HuAChE byla zjištěna u alkaloidních extraktů z *N. filifolia* (IC_{50,HuAChE} = 18,5 ± 0,8 μM) a *N. filamentosa* (IC_{50,HuAChE} = 21,6 ± 1,1 μM). V jejich extraktech dominovaly alkaloidy typu krininu (*N. filamentosa*) a homolykorinu (*N. filifolia*). Zajímavé je, že dosud testované alkaloidy krininového typu měly pouze slabý účinek proti AChE a zdá se, že stereochemie 5,10b-ethanového můstku nemá výrazný vliv na inhibiční aktivitu Amaryllidaceae alkaloidů vůči AChE. Zatím bylo testováno pouze pět alkaloidů homolykorinového typu ale nebyla zjištěna žádná inhibiční aktivita AChE. Aby bylo možné rozpoznat účinnou látku, je nutné izolovat každý alkaloid samostatně a testovat je v čisté formě. Další vysvětlení pro různé inhibiční aktivity může spočívat v použití různých typů testovacích enzymů. V předchozích studiích byla použita AChE z elektrického úhoře.^{18,32,33} Doposud existují pouze omezené informace o inhibiční účinnosti BuChE extraktů a čistých alkaloidů z druhů Amaryllidaceae, přičemž v diskutované studii byla použita erytrocytární AChE. Ve srovnání s předchozími zprávami jsou v současné studii demonstrovány nejlepší aktivity HuBuChE extraktů *N. filamentosa* (IC_{50,HuBuChE} = 13,0 ± 0,7 μM). Srovnatelnou aktivitu měl i extrakt z *N. bowdenii*, který má podobný alkaloidní profil. V obou extraktech dominovaly alkaloidy krininového strukturního typu.¹⁸

4.2.6 *Nerine undulata*

Nerine undulata je letní rostoucí druh pocházející z provincie Východní Kapsko v Jižní Africe. Vyskytuje se na otevřených loukách, v mokřadech, podél potoků, strmých svazích, na lesních březích, často vyhledávající stín.^{22,29}

Rostliny jsou stálezelené, produkující velmi jemné pavoukovité květy, které bývají zbarveny do tmavě růžova. *Nerine undulata* je letní trvalka, v květu může dosahovat až do výšky 1 m. Má několik páskovitých listů, které se objevují po květech.^{22,29}



Obrázek 10: *Nerine undulata*³⁴

V roce 2011 bylo provedena GC/MS analýza extraktu alkaloidů z cibulí *Nerine undulata*. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.11).³⁵

Tabulka 11: Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS analýzy z cibulí *N.undulata*³⁵

| Alkaloid | Retenční čas (min) | <i>N.undulata</i> (%zastoupení) |
|---------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1. Buphanidrin | 24,05 | 5 |
| 2. Buphanamin | 24,20 | 11 |
| 3. Flexinin | 24,95 | 1 |
| 4. Undulatin | 26,32 | 56 |
| 5. Ambellin | 26,54 | 3 |
| 6. A9 ^c | 26,65 | 10 |
| 7. Krinamidin | 27,67 | 2 |
| 8. A12 ^c | 28,85 | 9 |
| 9. Bowdesin | 28,99 | 3 |

V alkaloidním extraktu *N. undulata* dominovaly dva alkaloidy krininového typu, undulatin (56%) a buphanamin (11%), a poté dva alkaloidy, které se nepodařilo identifikovat (9, 12). Alkaloidní extrakt *N. undulata* vykazoval slibnou inhibiční aktivitu

proti HuAChE ($IC_{50} = 14,3 \pm 1,2 \mu M$), jak je uvedeno v tabulce (Tab.12). Alkaloidy krininového strukturního typu, jak již bylo zmíněno výše, vykazují pouze slabou aktivitu vůči AChE a zdá se, že stereochemie nemá vliv na inhibici aktivity AChE. Na základě těchto závěrů a výsledků je možné, že slibná inhibice aktivity HuAChE *N. undulata* je spojena se zatím neidentifikovanými sloučeninami. Pro potvrzení těchto předpokladů je nutné tyto sloučeniny izolovat.³⁵

Tabulka 12: HuAChE a HuBuChE inhibiční aktivita alkaloidního extraktu *N. undulata*³⁵

| Druh rostliny | HuAChEa IC ₅₀ ($\mu g/mL$) | HuBuChE IC ₅₀ ($\mu g/mL$) |
|------------------------|--|--|
| <i>Nerine undulata</i> | 14,3 \pm 1,2 | 33,9 \pm 1,9 |

4.2.7 *Nerine sarniensis*

Jedná se o vysoce ornamentální endemický zimní druh rostoucí v provincii West Cape, Jižní Africe, Namibii, Botswaně, Lesothu, Svazijsku a ve všech devíti provinciích Jižní Afriky. Tento druh je běžně nazýván *Guernsey Lili* (název je odvozen ze Sarnie, latinského názvu Guernsyových ostrovů). Nejčastějším místem výskytu jsou skalnaté horské svahy v západním mysu Citrusdal po Caledon, zde rostou na svazích.^{23,33,43}

Rostlina aktivně roste na začátku podzimu, nejprve se objeví květy poté až listy. Květy jsou velkolepé, třpytivé zcela nezaměnitelné, s poměrně širokými okvětními lístky, které vyzařují ven ve všech směrech zvlněné kolem okrajů v několika řadách. Květenství nese 7 až 15 květů. Barva se pohybuje od karmínové až po šarlatové, bledě růžové nebo růžové, nejatraktivnější je bílé zbarvení. Květy obsahují červený pigment přítomný ve vrstvě epidermálních buněk.^{22,29}

Nerine sarniensis je druhým nejrozšířenějším druhem po *N. bowdenii*, a je známá pro své nepravidelné kvetení. *N. sarniensis* je považována za nejhezčí rostlinu ze všech druhů rodu *Nerine*.^{22,29}



Obrázek 11: *Nerine sarniensis*³⁶

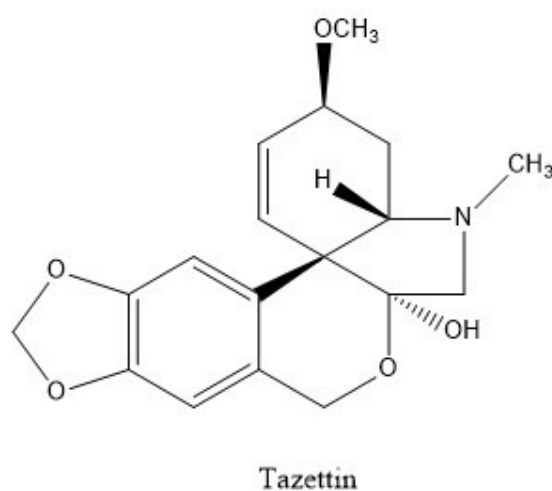
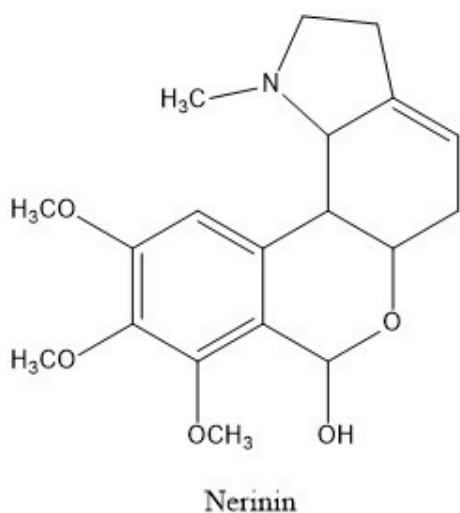
Navzdory tomu, že je *N. sarniensis* velmi studována po zahradnické stránce zejména kvůli estetické přitažlivosti, krásným květinám a v minulosti byla z velké části používána v lidové medicíně, zůstává izolace obsahových látek z této rostliny prozatím na okraji zájmu výzkumných skupin.^{37,38}

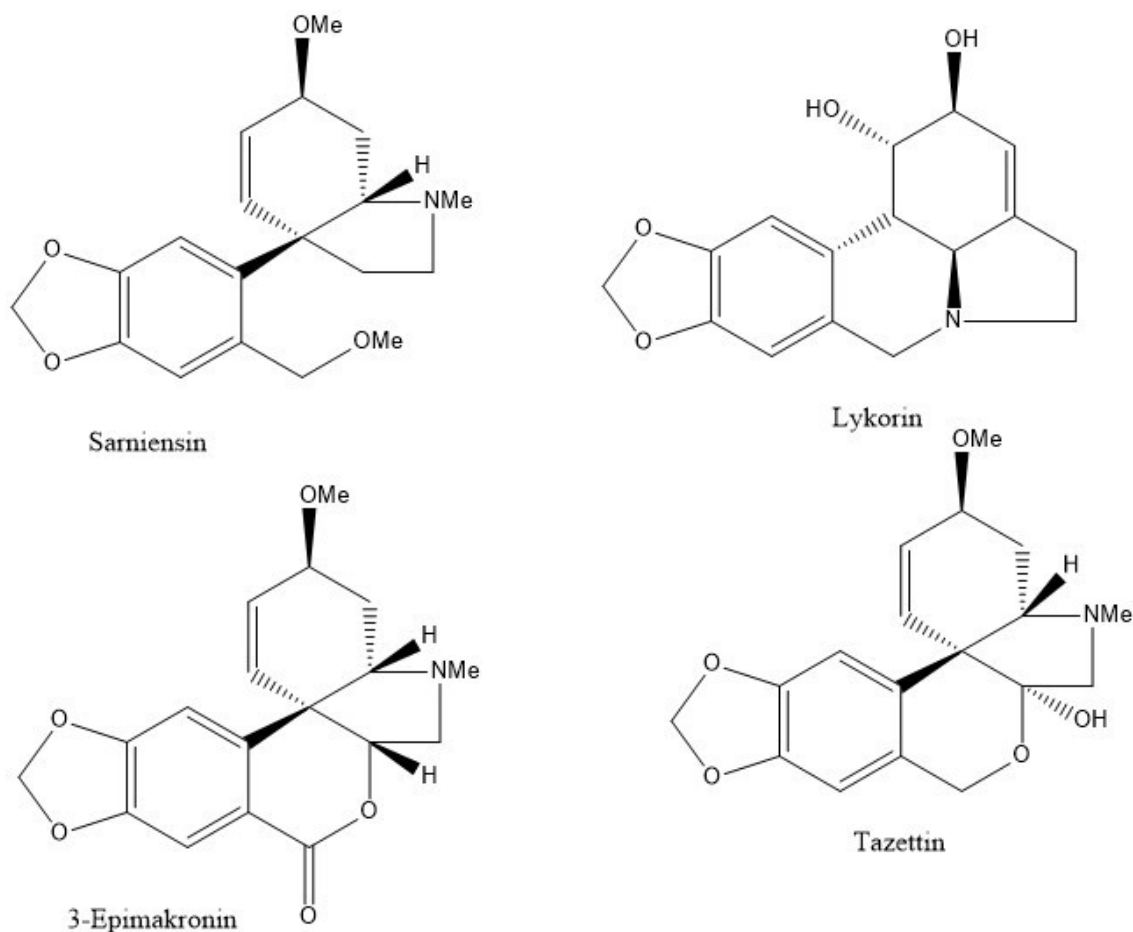
V předběžné studii prokázal ethanolový extrakt z cibulí *N. sarniensis* silnou adulticidní (proti dospělým jedincům) a larvicidní (proti larválním stádiím) aktivitu proti *Aedes aegypti*, který je hlavním vektorem arbovirů zodpovědných za dengue horečku, žlutou zimnici a Zika virus, což jsou výrazné hrozby pro veřejné zdraví. Doposud neexistuje schválená očkovací látka proti viru Zika a teprve nedávno byla registrována vakcína pro horečku dengue.^{39,40} Z těchto důvodů se hledání nových moskytocidních činidel z léčivých rostlin stalo důležité a výsledky těchto studií byly nedávno přezkoumány.^{41,42} Tato studie uvádí izolaci nového alkaloidu nazvaného sarniensin z *N. sarniensis* společně se třemi známými alkaloidy identifikovanými jako lykorin, 3-epimakronin a tazettin, struktury jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr.12). Studie se konkrétně zabývá strukturním stanovením sarniensinu, jakož i jeho larvicidními a adulticidními účinky.³⁷

Sušený materiál z cibulí *N. sarniensis* byl extrahován ethylacetátem. Tento extrakt byl hodnocen pro repelentní, larvicidní a adulticidní účinky proti *Aedes aegypti*. Extrakt vykazoval silnou larvicidní aktivitu proti prvnímu larválnímu stadiu *Ae. aegypti* a měl hodnotu $LC_{50} = 0,008 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ($r^2 0,985$) a extrakt vykazoval hodnotu $LD_{50} = 4,6 \mu\text{g}/\text{moskyt}$

(r^2 0,985) proti dospělé samičce *Ae .aegypti*. Ethylacetátový extrakt byl použit k izolaci hlavního metabolitu lykorinu a dvou známých alkaloidů identifikovaných jako 3-epimakronin a tazettin, stejně jako nového alkaloidu sarnienisinu. Známé alkaloidy byly identifikovány porovnáním jejich spektroskopických a optických dat s údaji uvedenými v literatuře.³⁷

Ve studii z roku 2017 bylo provedeno testování počáteční larvální aktivity na alkaloidech jako je sarniensin, lykorin, 3-epimakronin a tazettin proti prvnímu larválnímu stádiu *Ae. Aegypti*, uvedeno v tabulce (Tab.13). Nejlepší mortalitu ve zkoušených alkaloidech vykazoval sarniensin, nicméně to bylo pouze 20% na $0,1\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$. A proto v závislosti na odezvě dávky nebyly provedeny podrobnější biologické studie.³⁷





Obrázek 12: Alkaloidy izolované z *Nerine sarniensis*³⁷

Tabulka 13: Prvotní testování sloučeniny proti prvnímu vývojovému stádiu larev *Aedes aegypti*³⁷

| Alkaloidy | Mortalita v % | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ | 0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ | 0,25 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ | 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ |
| 1. Sarniensin | 100 \pm 0 | 80 \pm 0 | 60 \pm 0 | 20 \pm 0 |
| 2. Lykorin | 40 \pm 0 | 20 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 |
| 3. 3-Epimakronin | 60 \pm 0 | 40 \pm 0 | 20 \pm 0 | 0 \pm 0 |
| 4. Tazettin | 20 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 |

Screening biologických testů alkaloidů uvedených v následující tabulce (Tab.14) proti dospělým samičkám *Ae. aegypti* ukázal, že alkaloid sarniensin vykazuje nejvyšší aktivitu 93,3% mortalitu na 5 μg /moskyt. Na základě těchto dat byl sarniensin hodnocen

v biologických testech v závislosti dávka-odezva a byla stanovena hodnota $LD_{50} = 1,38$ $\mu\text{g}/\text{moskyt}$ proti dospělým samičkám *Ae. aegypti*, uvedeno v tabulce (Tab.15).³⁷

Výsledky také ukázaly, že karbonová kostra v pretazettinu přítomná v alkaloidech sarniensinu a 3-epimakroninu je důležitá pro aktivitu vzhledem k pyrrolo(de)fenanthridinu přítomném v lykorinu. Mezi ostatními v porovnání s neaktivnějším sarniensinem se zdá, že u 3-epimakroninu a tazettinu otevření kruhu B nebo přítomnost laktonového kruhu B jsou důležitými strukturními rysy pro biologickou aktivitu.³⁷

Tabulka 14: Počáteční 24-hodinové testování sloučenin proti dospělým samičkám *Ae.aegypti*³⁷

| Alkaloidy | Mortalita (%) 5 $\mu\text{g}/\text{moskyt}$ |
|--------------------|---|
| 1. Sarniensin | 93,3 \pm 5,77 |
| 2. Lykorin | 13,3 \pm 5,77 |
| 3. 3-Epimakronin | 66,7 \pm 5,77 |
| 4. Tazettin | 23,3 \pm 5,77 |
| Neléčené | 0 |
| Rozpouštědlo | 0 |
| 0,15 ng permethrin | 46,6 \pm 11,55 |
| 2,27 ng permethrin | 100 \pm 0 |

Tabulka 15: Stanovení LD_{50} proti dospělým samičkám *Ae. Aegypti* pro aktivní sloučeninu:³⁷

| Alkaloidy | $LD_{50} \pm SE$ ($\mu\text{g}/\text{moskyt}$) | 95% CI | R^2 |
|---------------|---|---------------|-------|
| 1. Sarniensin | 1,38 \pm 0,056 | (1,27 – 1,49) | 0,969 |

V rámci další studie z roku 2016 byly izolovány z *N. sarniensis* dva nové Amaryllidaceae alkaloidy krinsarnin a sarniensol. Další izolované alkaloidy byly bowdesin, sarniensin, hippadin a 1-*O*-acetyllykorin.⁴³

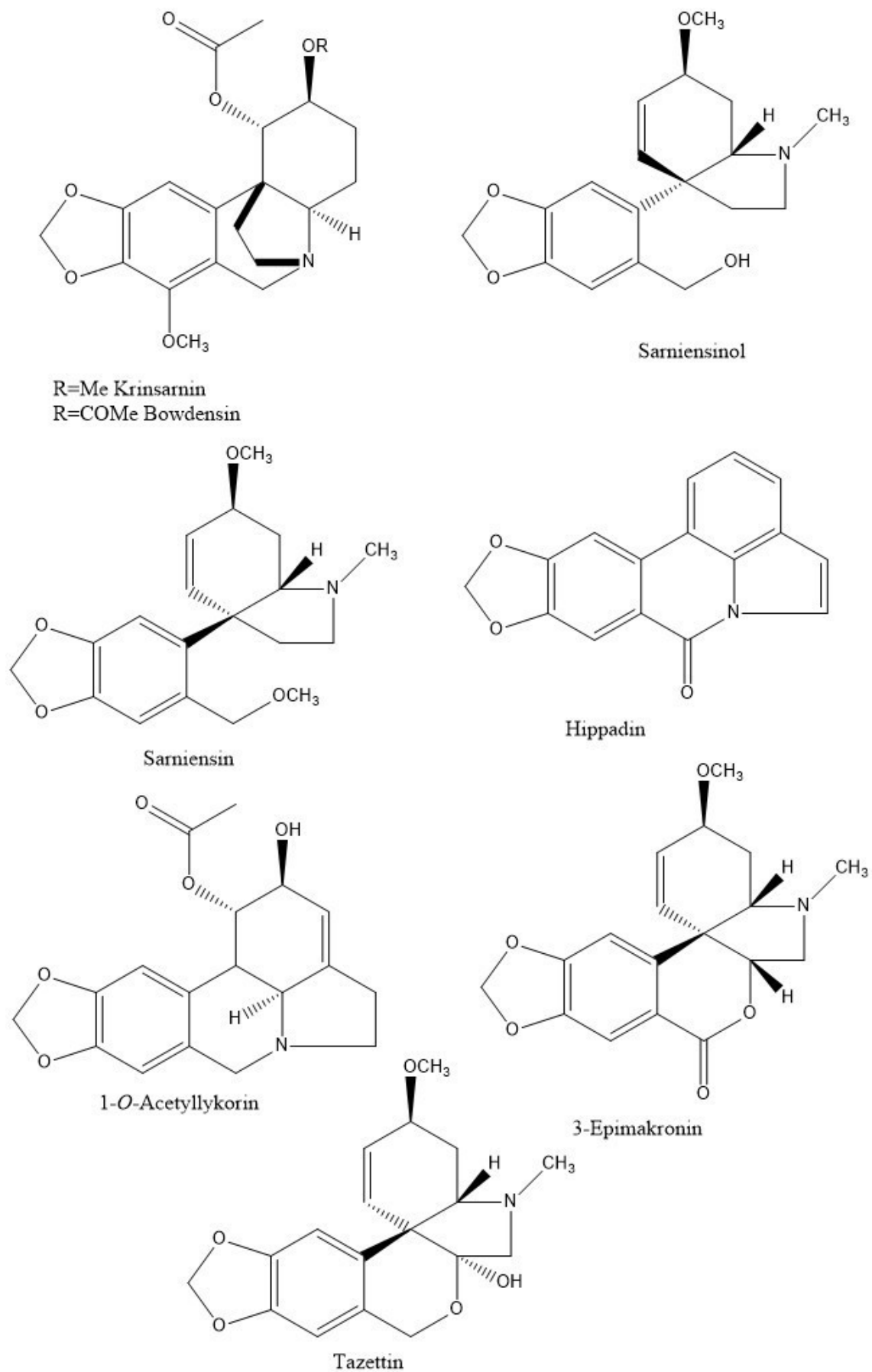
Krinsarnin je alkaloid α -krininového typu, druhý nově izolovaný alkaloid sarniensol patří do prettazetinového strukturní typu. Oba alkaloidy byly charakterizovány za použití spektroskopických a chiroptických metod. Dále byla poprvé popsána spektroskopická charakterizace bowdesinu. Sloučeniny byly hodnoceny na referenčním kmenu Orlando *Aedes aegypti*. Žádná ze sloučenin neprokázala toxicitu proti larvám *Ae.*

aegypti v prvním vývojovém stadiu larev. U dospělých topických biologických testů pouze krinsarnin projevila adulticidní aktivitu.⁴³

Aedes Aegypti, komár žluté horečky, je primárním vektorem virů dengue a žluté zimnice. Současná epidemie virem Zika se jeví jako nejdůležitější, jelikož by se mohla snadno stát potenciální hrozbou pro mezinárodní bezpečnost veřejného zdraví, pokud se nebude brzy jednat. Virus způsobuje mikrocefalii a další vážné anomálie mozku během těhotenství.⁴⁵ Kontrola komárů je jednou z hlavních metod používaných ke snížení šíření viru. Osobní ochrana, insekticidní léčebné režimy proti larvám a dospělým jedincům a snížení nebo úplné zničení míst pro komáry patří k hlavním metodám snižování těchto onemocnění přenášených vektory.⁴⁵ Strategie biologické kontroly, jako je použití mateřsky zděděné bakterie *Wolbachia pipientis* ke snížení přenosu virů v *Ae. aegypti* komárů a larvivozních ryb představuje alternativu k řízení larev a dalších vývojových stádií *Ae.aegypti*.^{46,47}

Navíc rozsáhlé používání chemických insekticidů pro kontrolu komárů vedlo k rozvoji rezistence vůči pesticidům a nežádoucím vlivům na životní prostředí.⁴⁸ Proto sekundární metabolity rostlinného původu přitahují zájem o programy ochrany proti škůdcům jako jsou insekticidy a repelenty. Mezi nimi rostliny čeledi Amaryllidaceae prokázaly, že jsou dobrým rezervoárem alkaloidů s velkým spektrem biologické aktivity.^{9,49}

Pokud se jedná o vztah struktura a adulticidní aktivita, pretazattinový a krininový strukturní typ (sarniensinol a sarniensin) a (krinsarnin a bowdensin), se ukázaly být důležité pro jejich aktivitu, zatímco pyrrol(de)fenanthridinové seskupení přítomné v hippadinu a 1-*O*-acetyllykorinu bylo důležité pro jejich reaktivitu. Mezi sloučeninami pretazattinového typu se zdá, že otevření kruhu B nebo přítomnost B-laktonu v kruhu, jakož i *trans*-stereochemie A / B kruhu je důležitá pro aktivitu, zatímco u alkaloidů krinového typu se zdá, že substituent na C-2 hraje roli v jejich aktivitě.⁴³



Obrázek 13: Další alkaloidy izolované ze sušených cibulí *Nerine sarniensis*⁴³

Ve studii z roku 2016 byly izolované sloučeniny krinsarnin, sarniensol, bowdensin, hippadin a 1-*O*-acetylykorin hodnoceny na jejich aktivitu proti larválnímu stadiu *Ae. Aegypti*, uvedeno v následující tabulce (Tab.16). Jejich aktivity byly porovnány s aktivitami sarniensinu, 3-epimakroninu a tazettinu. Počáteční testování larvální aktivity ukázalo, že žádná z těchto sloučenin: krinsarnin, bowdensin, hippadin a 1-*O*-acetylykorin nevykazovala dostatečnou mortalitu, aby mohla být dále zkoumána.⁴³

Krinsarnin byl jediný, který vykazoval adulticidní aktivitu a jeví se jako potencionální insekticid přírodního původu proti *Ae. aegypti*, hlavní vektor pro dengue, žlutou horečku a virus Zika.⁴³

Tabulka 16: Počáteční 24h testování úmrtnosti sloučenin proti prvnímu larválnímu stadiu *Ae. aegypti*⁴³

| Alkaloidy | Mortalita | 0,5 μg/μL | 0,25 μg/μL | 0,1 μg/μL |
|----------------------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|
| | (%) 1 μg/μL | | | |
| 1. Krinsarnin | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. Sarniensinol | 7 ± 11 | 0 | 0 | 0 |
| 3. Bowdensin | 13 ± 11 | 0 | 0 | 0 |
| 4. Hippadin | 7 ± 11 | 0 | 0 | 0 |
| 5. 1- <i>O</i> - Acetylykorin | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. Sarniensin | 100 ± 0 | 80 ± 0 | 60 ± 0 | 20 ± 0 |
| 7. 3-Epimakronin | 60 ± 0 | 40 ± 0 | 20 ± 0 | 0 ± 0 |
| 8. Tazettin | 20 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |

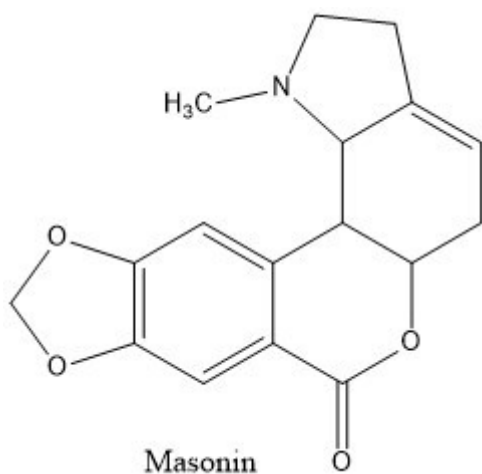
4.2.8 Další rostliny rodu *Nerine*

Další druhy rodu *Nerine* byly studovány z fytochemického pohledu především v 50. a 60. letech minulého století. Z většiny dále diskutovaných druhů byla izolována jedna nebo 2-3 látky alkaloidní povahy.

Z cibulí *Nerine masonorum* byl prozatím izolován pouze alkaloid homolykorinového strukturního typu masonin.⁵⁰



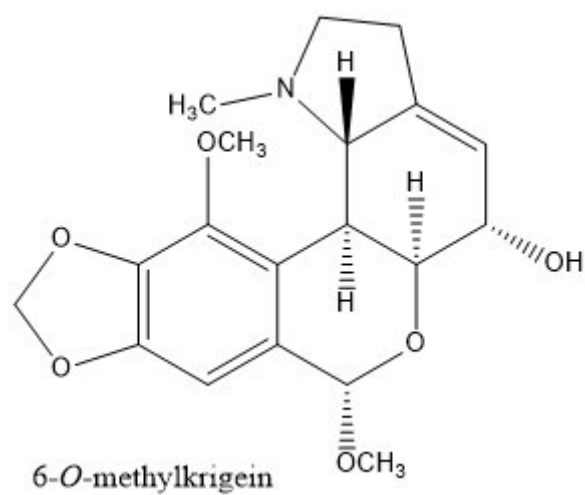
Obrázek 14: *Nerine masonorum*⁵¹



Jako další byla zkoumána z čeledi Amaryllidaceae *Nerine huttoniae*. Z jejich cibuli byl izolován nový alkaloid 6-*O*-methylkrigein.⁵²



Obrázek 15: *Nerine huttoniae*⁵³



Z rostliny *Nerine crispa*, respektive z jejich cibulí byl izolován alkaloid krispanin.⁵⁴



Obrázek 16: *Nerine crispa*⁵⁵

Z cibulí *Nerine flexuosa* byl doposud pouze jeden alkaloid – bodamin.⁵⁶

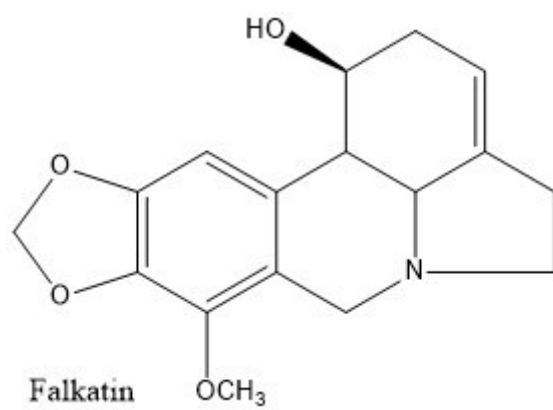


Obrázek 17: *Nerine flexuosa*⁵⁷

Z *Nerine falcata* byl izolován alkaloid lykorinového strukturního typu falkatin.⁵⁸



Obrázek 18: *Nerine falcata*⁵⁹



5. ZÁVĚR

Rostliny rodu *Nerine* představují zajímavý rod čeledi Amaryllidaceae s potenciálním využitím ve farmacii. Celá řada druhů tohoto rodu byla podrobena více či méně podrobným fytochemickým studiím. Nejvíce studovaným druhem je *Nerine bowdenii*. Z rostlin rodu *Nerine* bylo prozatím izolováno kolem 40 Amaryllidaceae alkaloidů. Tyto alkaloidy se dělí do několika strukturních typů, konkrétně do devíti hlavních – lykorinový, belladinový, krininový, homolykorinový, heamanthaminový, narciklasinový, tazettinový, montaninový a galanthaminový typ a řady dalších. Celá řada alkaloidů izolovaných z rodu *Nerine* byla studována z pohledu jejich biologické aktivity. Mezi nejvýznamnější biologické účinky alkaloidů rodu *Nerine* patří protinádorové účinky na celou řadu nádorových linií, dále inhibiční aktivita vůči cholinesterázám, prolyloligopeptidáze a glykogen-syntháze kináze-3 β . Ambellin izolovaný z tohoto rodu vykázal slibnou antimalarickou aktivitu.

Při studiu výše zmíněných biologických účinků alkaloidů rostlin rodu *Nerine* byly nastíněny základní vztahy mezi strukturou a účinkem. U alkaloidů již byly prokázány jejich významné biologické účinky s potenciálním využitím ve farmacii a medicíně.

Závěrem lze konstatovat, že rod *Nerine*, je stále atraktivním cílem pro izolaci Amaryllidaceae alkaloidů různých strukturních druhů. Celá řada druhů musí být podrobena podrobnějším fytochemickým studiím.

6. LITERATURA

1. Schneider W. Geschichte der Pharmaceutischen Chemie. Verlag-Chemie. Weinheim **1972**, 376s.
2. Opletal L, Opletalová V. Lék a jeho vývoj v dějinách. Karolinum, Praha **1999**, 128s.
3. Jahodář L. Farmakobotanika semenné rostliny. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 181s.
4. Dalecká M, Havelek R, Královec K, Bůčková L, Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* **2013**, *107*, 701-708
5. Krejčová G, Ševelová L. Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* **2003**, *1*, 37-44
6. Nair JJ, Cambell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 373-382.
7. Jin Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* **2013**, *30*, 849-868
8. Takos AM, Rook F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 11713-11741
9. Kornieko A, Evidente A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1982-2014
10. Bastida J, Berkov S, Torras L, Belén Pigni N, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. **2011**, 65-100
11. Nagakawa Y, Uyeo S, Yajima H. The double bond in lycorine, *Chemistry and Industry*. **1956**, 1238-1239
12. Vaněčková N, Hošťálková A, Šafratová M, Kuneš J, Hulcová D, Hrabínová M, Doskočil I, Štěpánková Š, Opletal L, Novák L, Jun D, Chlebek J, Cahlíková L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* w. Watson and their biological activities, *RSC Advances*. **2016**, *6*, 80114-80120
13. Cahlíková L, Zavadil S, Macáková K, Valterová I, Kulhánková A, Hošťálková A, Kuneš J, Opletal L. Isolation and cholinesterase Activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*, *Natural Product Communications*. **2011**, *6*, 1827-1830s.

14. <http://www.nerineandamaryllidsociety.co.uk> staženo 10.8.2018
15. Polya G. Biochemical targets of plant bioactive compounds. *CRC Press*, USA **2003**, 838s.
16. Elgorashi EE, Drewes SE, van Staden J. Organ-to-organ an seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. *Fitoterapia*. **2002**, 73, 490-495
17. Van Rijm RM, Rhee IK, Verpoorte R. Isolation of AChE inhibitory alkaloid from *N. bowdenii*. *Natural Product Research*. **2010**, 24, 222-225
18. Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Kučera R, Hrstka V, Klimeš J, Jahodář L, Opletal L. Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase aktivity. *Natural Product Communications* **2012**, 7, 571-574
19. <http://v3.boldsystems.org/> staženo 10.8.2018
20. Ben J, Zonneveld M, Duncan G. Genome size for the species of *Nerine Herb* (Amaryllidaceae) and its evident correlation with growth cycle, leaf with and other morphological characters. *Plant Systematics and Evolution*, **2005**
21. <https://botany.cz/cs/> staženo 10.8.2018
22. <http://pza.sanbi.org/> staženo 10.8.2018
23. Puttonen KA, Lehtonen S, Raasmaja A, Mannisto PT. A prolyl oligopeptidase inhibitor Z-Pro_prolinal inhibic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenace translocation an production of reactive oxygen species in CV1-P cells exposé to 6-hydroxydopamine. *Toxicology in Vitro*. **2006**, 20, 1446-1454
24. Cahlíková L, Pérez DI, Štěpánková Š, Chlebek J, Šafratová M, Hošťálková A, Opletal L. In vitro inhibitory effects of 8-O-Demethylmaratidine and undulatine on acetylcholinesterázy and their predicted penetration across the blood-brain-barrier. *Journal of Natural Products*. **2015**, 78, 1189-1192
25. McNulty J, Nair JJ, Bastida J, Pandey S, Griffin C. Structure activity studies on the crinane alkaloid apoptosis-inducing pharmacophore. *Natural Product Communications*. **2009**, 4, 483-488
26. Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelk R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*. **2015**, 13, 394-398

27. Kim YH, Park EJ, Park MH, Badarch U, Woldemichael GM, Beutler JA. Crinamine from *Crinum asiaticum* var. *japonicum* inhibits hypoxia inducible factor-1 activity but not activity of hypoxia inducible factor-2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, *29*, 2140-2142
28. Cedron JC, Nair JJ, Van Staden J. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophore disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **2012**, *140*, 405-408
29. <https://www.pacificbulbsociety.org/> staženo 10.8.2018
30. <https://www.flickr.com/> staženo 10.8. 2018
31. <http://www.rareplantfair.co.uk/> staženo 10.8. 2018
32. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*. **2002**, *71*, 2521-2529
33. Elgorashi EE, Stafford GI, van Staden J, Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*. **2004**, *70*, 258-260
34. <https://www.promessedefleurs.com/> staženo 10.8. 2018
35. Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Urbanová K, Opletal L. CG/MS Analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*. **2011**, *9*, 1255-1258
36. <https://order.eurobulb.nl/> staženo 10.8. 2018
37. Masi M, van der Westhuyzen Alet E, Tabanca N, Evidente M, Cimmino A, Green IR, Bernier UR, Becnel JJ, Bloomquist JR. Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvical and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. **2017**, *116*, 34-38
38. Boit HG. Alkaloid of the Amaryllidaceae. VI. The alkaloids of *Nerine sarniensis*, *Crinum moorei*, *Hippeastrum viitatum* and *Clivia miniata*. *Chemische Berichte*. **1954**, *87*, 1704-1707
39. Hayden CE. Zika highlights role of fetal-tissue research. *Nature*. **2016**, *16*.
40. WHO. Dengue Vaccine Research. World health organisation. Ginevra. **2016**
41. Kadir Abd SL, Yakoob R, Zulkifli M. Pontential antidengue medicinal plants: a rewiev. *Journal of Natural Medicine* **2013**, *67*, 677-689
42. Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V, Lall N. Natural products as leads to potential mosquitocides. *Phytochemistry Reviews*. **2014**, *13*, 587-627

43. Masi M, Cala A, Tabanca N, Cimmino, Green IR, Bloomquist JR, van Otterlo WAL, Macias AF, Evidente A. Alkaloids with activity against the Zika Virus Vector *Aedes aegypti* (L.)- Crinsarnine and Sarniensinol, two new crinine and mesembrine type alkaloids isolated from the South Africa plant *Nerine sarniensis*. *Molecules*. **2016**, *21*, 1432
44. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects – Reviewing the evidence for causality. *The New England Journal of Medicine* **2016**, *374*, 1981-1987
45. Osborne J, Banks D, Hendy A, Gezan SA, Kaur H, Wildes- Smith A, Lindsay SW, Logan JG. Personal protection of permethrin-treated clothing against *Aedes aegypti*, the vector of dengue and zika virus, in the laboratory. *Plos ONE*. **2016**, *11*, e0152805
46. De Azambuja García G, dos Santhos LMB, Villela DAMV, Maciel-de-Freitas R. Using Wolbachia releases to estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culidae) population size and survival. *Plos One*. **2016**, *11*, e0160196
47. Han WW, Lazaro A, McCall PJ, Runge-Ranzinger GL, Toledo J, Velayudhan R, Horstick O. Efficacy and community effectiveness of larvivorous fish for dengue vectr control. *Tropical Medicine and International Health*. **2015**, *20*, 1239-1256
48. Benelli G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medicinal and veterinary importance: A systematic rewiev. *Parasitology Research*. **2015**, *114*, 3201-3212
49. Evidente A, Kornienko A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivates. *Phytochemistry Reviews*. **2009**, *8*, 449-459
50. Boit HG, Werner. Masonine, a new amaryllidaceous alkaloid. *Naturwissenschaften*. **1958**, *45*, 85
51. <http://www.shire.co.za/> staženo 10.8.2018
52. Molander M, Brogger SC, Jaeger AK, Olsen CE, Ronsted N. 6-O-methylkrigeine, a new Amaryllidaceae alkaloid from *Nerine huttoniae* Schoenland. *Natur Product Research*. **2012**, *26*, 50-60
53. <http://casabio.org/> staženo 10.8.2018
54. Doepke W. Crispanine, a new alkaloid from *Nerine crispa*. *Naturwissenschaften*. **1962**, *49*, 469s.
55. <http://www.johnjearrard.co.uk/> staženo 10.8.2018

56. Boit HG, Dopke W. New alkaloid from *Nerine flexuosa* and *Nerine bowdenii*. *Naturwissenschaften*. **1960**, 47, 109s.
57. <http://www.growsonyou.com/> staženo 10.8.2018
58. Wildmann WC, Kaufman CJ. Alkaloids of the Amaryllidaceae V. alkaloids of *Nerine falcata* and *Nerine laticoma*. *Journal of the American Chemical Society*. **1955**, 77, 4807s.
59. <http://www.growingwithplants.com> staženo 10.8. 2018

7. SEZNAM ZKRATEK

AD Alzheimerova choroba

Ach acetylcholin

AChE acetylcholinesteráza

BuChE butyrylcholinestráza

HuAChE lidská acetylcholinesteráza

HuBuChE lidská butyrylcholinesteráza

IC inhibiční koncentrace

POP prolyloligopeptidáza

ABSTRAKT

Autor: Adéla Hodulová

Název: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae rod *Nerine*

Diplomová práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky

2018, 51 s.

Cílem této diplomové práce bylo shrnout současné poznatky o alkaloidech izolovaných z rostlin rodu *Nerine* čeledi Amaryllidaceae. Byla uvedena botanická charakteristika fytochemicky prostudovaných druhů rodu *Nerine*. Nejvíce byla prostudována *Nerine bowdenii*. Byly shrnuty poznatky o alkaloidech izolovaných z rostlin rodu *Nerine* čeledi Amaryllidaceae.

V rámci rodu *Nerine* bylo doposud fytochemicky prozkoumáno 10 druhů. Celkem bylo z těchto rostlin izolováno kolem 40 alkaloidů. Alkaloidy izolované ze zástupců rostlin rodu *Nerine* jsou rozděleny do několika strukturních typů. U alkaloidů byla pozorována protinádorová aktivita a inhibiční aktivita vůči enzymu acetylcholinesteráze. Biologická aktivita alkaloidů souvisí s jejich strukturou. Nejvýraznější protinádorová aktivita byla pozorována u lykorinového a krininového strukturního typu a inhibiční aktivita vůči enzymu AChE byla nejvýraznější u alkaloidů krininového strukturního typu.

Klíčová slova:

Nerine, *Nerine bowdenii*, Amaryllidaceae, alkaloidy

ABSTRACT

Author: Adéla Hodulová

Title: Alkaloids of Amaryllidaceae family, genus *Nerine*

Diploma thesis

Charles University, Faculty of pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical botany

2018, 51 p.

The aim of this diploma thesis was to summarize up the findings about alkaloids which were isolated from genus *Nerine* plants of Amaryllidaceae family. There was introduced a botanical characteristic of the phytochemical studied species of the genus *Nerine*. The most studied species was *Nerine bowdenii*. All the knowledges about mentioned alkaloids were sum up.

Ten species have been phytochemical studied out of the genus *Nerine* until now. In total, 40 alkaloids were isolated from these plants. Alkaloids which were isolated from the *Nerine* are divided into several structural types. Anticancer, acetylcholinesterase-inhibitory of the alkaloids were described.

The biological activity is connected with their structure. The most significant anticancer activity was observed in alkaloids from crinine- and lycorine type. Acetylcholinesterase-inhibitory activity was pronounced the most in crinine-type alkaloids.

Keywords:

Nerine, *Nerine bowdenii*, Amaryllidaceae, alkaloids

