

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE:
ISOLACE, STRUKTURNÍ IDENTIFIKACE, BIOLOGICKÁ AKTIVITA IV**

**ALKALOIDS OF AMARYLLIDACEAE FAMILY:
ISOLATION, STRUCTURAL IDENTIFICATION, BIOLOGICAL ACTIVITY IV**

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

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

Hradec Králové, srpen 2019

Kateřina Černá

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové, srpen 2019

Kateřina Černá

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mé vedoucí práce doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedení a velkou trpělivost, kterou se mnou po celou dobu měla. Mé velké dík si zaslouží Mgr. Kateřina Breiterová Ph.D. za vedení při praktické izolaci alkaloidu z rostlinného materiálu. Ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky mnohokrát děkuji za průběžnou pomoc a rady při práci v laboratoři a za příjemné pracovní prostředí.

Mé rodině a přátelům bych ráda poděkování za péči a zázemí, které mi byly poskytnuty. Za trpělivost v průběhu mé zdlouhavé práce a poskytnutí morální podpory ve chvílích beznaděje.

OBSAH

Obsah	4
Seznam použitých zkratk.....	6
1. Úvod	8
2. Cíl práce.....	10
3. Teoretická část	11
3.1 Čeleď Amaryllidaceae.....	11
3.2 Amaryllidaceae alkaloidy a jejich biosyntéza	12
3.3 Rod <i>Narcissus</i>	16
3.3.1 Klasifikace rodu <i>Narcissus</i>	16
3.3.2 Obsahové látky rodu <i>Narcissus</i>	20
3.3.3 Využití rostlin rodu <i>Narcissus</i> v tradiční a lidové medicíně	22
3.4 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů	24
3.4.1 Biologická aktivita spojená s léčbou Alzheimerovy nemoci.....	24
3.4.2 Protinádorová aktivita Amaryllidaceae alkaloidů	32
3.4.3 Antimalarická aktivita.....	37
3.5 <i>Narcissus</i> cv. PROFESSOR EINSTEIN	38
4. Experimentální část.....	40
4.1 Použité chemické látky	40
4.1.1 Rozpouštědla	40
4.1.2 Chemikálie	40
4.1.3 Mobilní fáze (MF) pro sloupcovou chromatografii	40
4.1.4 Mobilní fáze pro preparativní tenkovrstvou chromatografii (TLC)	41
4.1.5 Detekční činidlo pro detekci alkaloidů na deskách pro TLC.....	41
4.1.6 Adsorbenty pro chromatografii.....	42
4.2 postupy a techniky používané při izolaci alkaloidů	42
4.2.1 Destilace	42
4.2.2 Extrakce	42
4.2.3 Chromatografie sloupcová	43
4.2.4 Chromatografie tenkovrstvá	43
4.2.5 Odpařování rozpouštědel z extraktu.....	44
4.2.6 Detekce alkaloidů	44
4.3 Příprava směsného alkaloidního extraktu.....	44

4.3.1	Biologický materiál	44
4.3.2	Příprava ethanolického extraktu	45
4.3.3	Čištění sumárního alkaloidního extraktu	45
4.4	Sloupcová chromatografie sumárního alkaloidního extraktu	46
4.5	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	49
4.5.1	Dělení podfrakce 26/2	50
4.5.2	Dělení podfrakce 26/3	51
4.6	Strukturní identifikace izolovaného alkaloidu	53
4.6.1	Plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)	53
4.6.2	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem	53
4.6.3	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	53
4.6.4	Optická otáčivost	54
4.7	Spektrum biologické aktivity izolovaných alkaloidů	54
4.7.1	Stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám	54
4.7.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase (POP)	54
4.7.3	Stanovení inhibice glykogen synthasy kinasy-3 β (GSK-3 β)	55
4.7.4	Stanovení cytotoxicity <i>in vitro</i>	55
4.7.5	Stanovení aktivity vůči plazmodiím <i>in vitro</i>	55
5.	Výsledky	56
5.1	Strukturní identifikace	56
5.1.1	MS charakteristika 9- <i>O</i> -demethylhomolykorinu	56
5.1.2	NMR analýza 9- <i>O</i> -demethylhomolykorinu	58
5.1.3	optická otáčivost 9- <i>O</i> -demethylhomolykorinu	58
5.2	Výsledky testů biologických aktivit	58
5.2.1	9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin a jeho vliv na Alzheimerovu chorobu	58
5.2.2	Cytotoxická aktivita 9- <i>O</i> -demethylhomolykorinu	59
5.2.3	Antimalarické působení 9- <i>O</i> -demethylhomolykorinu	60
6.	Diskuze	61
7.	Literatura	63
8.	Abstrakt	69
9.	Abstract	70

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A2780	linie buněk karcinomu vaječníku
A549	linie buněk adenokarcinomu plic
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
AmA	Amaryllidaceae alkaloidy
AMK	aminokyselina(y)
AN, AD	Alzheimerova nemoc
APP	amyloidový prekurzorový protein
Aβ	amyloid β
BACE1	β-sekretasa, Beta-site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme 1
BJ	linie normálních pokožkových buněk
BuChE	butyrylcholinesterasa
Bz	benzín
Caco-2	linie buněk kolorektálního karcinomu
CDCl ₃	deuteriochloroform
CDK5	cyklin dependentní kinasa 5
CEM	linie buněk akutní lymfoblastické leukémie
cHx	cyklohexan
cv.	pěstovaná odrůda
D-6	na konvenční léčbu resistantní kmen <i>P. falciparum</i>
DEA	diethylamin
ee	elektrický úhoř (electric eel)
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
Et ₂ O	ether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
FCR3	na konvenční léčbu citlivý kmen <i>P. falciparum</i>
FHS-74Int	linie zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva
G-361	linie buněk lidského kavkazského maligního melanomu
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
GSK-3β	glykogen synthasa kinasa-3β
HCl	kyselina chlorovodíková
HCT116	linie buněk kolorektálního karcinomu
HeLa	linie buněk adenokarcinomu děložního čípku
HL-60	linie buněk lidské myeloidní leukémie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HT-29	linie buněk kolorektálního karcinomu
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa

HuH-7	linie buněk humánního hepatokarcinomu
CH ₂ Cl ₂	dichlormethan
CHCl ₃	chloroform
Jurkat	linie buněk akutní leukémie T-lymfocytů
K1	na konvenční léčbu resistantní kmen <i>P. falciparum</i>
K562	linie buněk lidské myeloidní leukémie
LMTK	linie buněk myších alveolárních nenádorových fibroblastů
L-Phe	L-fenylalanin
L-Tyr	L-tyrosin
MCF-7	linie buněk adenokarcinomu prsu
MDR	rezistence vůči většímu počtu léčiv, která se liší strukturou a mechanismem účinku
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MOLT-4	linie buněk akutní lymfoblastické leukémie
MRC-5	linie buněk zdravých plicních fibroblastů
Na ₂ CO ₃	uhlíčan sodný
Na ₂ SO ₄	bezvodý síran sodný
NCI	americký národní institut pro výzkum rakoviny
NCI-H460	linie buněk velkobuněčného plicního karcinomu
NF54	na konvenční léčbu citlivý kmen <i>P. falciparum</i>
NFTs	neurofibrilární uzlíčky, neurofibrillary tangles
NH ₃	amoniak
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	fenylalanin amonium lyáza
PANC-1	linie buněk epiteliálního karcinomu slinivky
POP	prolyl oligopeptidasa
RF	retenční faktor
SAOS-2	linie buněk osteosarkomu
SF	stacionární fáze
SK-OV-3	linie buněk karcinomu vaječníku
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
To	toluen
W-2	na konvenční léčbu citlivý kmen <i>P. falciparum</i>

1. Úvod

Účinky rostlin na lidský organismus byly objevovány již od počátku lidského rodu. První poznatky získali lidé již v pravěku pozorováním svého okolí a zvířat. Ošetření jejich zdravotních problémů bylo prováděno podle jimi nabytých zkušeností. S dalším vývojem lidské společnosti byly prohlubovány znalosti o možnostech využití rostlin. Dlouhé období v dějinách se připravovala léčiva podle složitých receptur vzniklých v antickém Řecku a Římě a ve středověku v arabských oblastech. V 16. století započaly snahy redukovat staré receptury na aktivní rostlinou drogu. Toto úsilí vedlo k jednodušším předpisům a pozornost byla nasměrována na hlavní aktivní složky. Rozvoj chemických a lékařských věd v 19. století postupně umožnil izolaci látek ze studovaných rostlin v čistém stavu, zjištění jejich biologických aktivit a určení chemické struktury.^{1,2}

Mezi látky hojně izolované od 19. století patří i alkalické sloučeniny obsahující dusík, které byly označeny jako alkaloidy. Alkaloidy jsou podle definice sloučeniny s heterocyklicky vázaným atomem dusíku a v různé míře vyjádřeným bazickým charakterem, mají výrazné fyziologické účinky, složitou strukturu a vyskytují se v rostlinách, ve výjimečných případech i u živočichů.² Tyto sloučeniny jsou řazeny do skupiny látek vznikajících cestou specializovaného (sekundárního) metabolismu a jejich syntéza vychází z aminokyselin (AMK) ornithinu, tyrosinu, fenylalaninu, tryptofanu, lysinu, histidinu, argininu, kyseliny anthranilové a kyseliny nikotinové. Alkaloidy s jednodušší strukturou jsou v čeledích široce rozšířeny, naopak složitější alkaloidy jsou ve svém výskytu omezeny. Funkce alkaloidů v rostlinách není jednoznačně určena, mohly by sloužit jako ochrana proti býložravcům a parazitům. Dříve byl také vysloven názor, že alkaloidy jsou dusíkaté odpadní látky.^{3,4}

Významnou skupinou alkaloidů jsou Amaryllidaceae alkaloidy (AmA), které se vyskytují ve stejnojmenné čeledi jednoděložných rostlin Amaryllidaceae (amarylkovité). AmA tvoří velkou skupinu látek (izolováno bylo již více než 500 alkaloidů), která se stále rozrůstá. Jejich syntéza vychází z AMK tyrosinu, díky které jsou zařazeny do skupiny isochinolinových alkaloidů. Jejich chemické struktury jsou velmi rozmanité, stejně jako řada biologických a farmakologických účinků. Navzdory téměř 200 let trvajícimu výzkumu se v terapii využívá pouze galanthamin. Galanthamin, který byl poprvé izolován z rostlin *Galanthus* sp. (sněženka), je dlouhodobě působícím, selektivním, reverzibilním a kompetitivním inhibitorem acetylcholinesterázy (AChE) a je využíván v terapii Alzheimerovy nemoci (AN).^{5,6}

Významným zástupcem čeledi Amaryllidaceae je rod *Narcissus* (narcis). Zahrnuje velký počet druhů a zahradních kultivarů. Jeho léčebné účinky jsou známy již od starověku. V tradiční medicíně byl používán k léčbě rozmanitých zdravotních problémů, v zachovaných písemných pramenech je například popisována terapie nádorových onemocnění nebo léčba záchvatů hysterie a epilepsie. Do dnešních dnů bylo z tohoto rodu izolováno více než 100 AmA a již zmiňovaný galanthamin se z rodu *Narcissus* získává pro použití v terapii. Pro komerční izolaci alkaloidů jsou výhodné zahradní kultivary, protože rostlinný materiál je dostupný v dostatečném množství. Na druhou stranu, doposud bylo provedeno pouze několik studií zaměřených na zjištění alkaloidního profilu a určení množství obsažených alkaloidů v okrasných kultivarech narcisů.^{4,6,7} Z tohoto důvodu izolace, určení struktury a biologické aktivity alkaloidů ze zahradních kultivarů představuje zajímavý směr výzkumu AmA.

2. CÍL PRÁCE

Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Kateřiny Breiterové Ph.D., jejíž náplní byl screening obsahových látek sedmi druhů rostlin čeledi Amaryllidaceae.⁸ Na základě získaných výsledků, kterými se předchozí diplomová práce zabývala, byla pro fytochemickou studii vybrána rostlina *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN.

Hlavní cíle předložené diplomové práce byly:

1. Podíl na zpracování 34 kg čerstvých cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN a příprava směsného ethanolického extraktu.
2. Podíl na přípravě alkaloidního extraktu a jeho dělení sloupcovou chromatografií.
3. Izolace alespoň jednoho čistého alkaloidu pomocí TLC z přidělené frakce
4. Určení struktury izolovaného alkaloidu.
5. Stanovení biologické aktivity izolovaného alkaloidu.
6. Zhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ČELEĎ AMARYLLIDACEAE

Jednoděložné rostliny čeledi Amaryllidaceae (česky amarylkovité) zahrnují vytrvalé byliny, které se přirozeně vyskytují v mírném, subtropickém i tropickém pásu jižní Afriky, jižní a střední Ameriky, jižní a střední Evropy a severní Afriky (oblast kolem Středozemního moře), zavlečeny byly i do Asie.^{9,10} Celosvětově tuto čeleď tvoří přibližně 60 rodů a asi 850 druhů.¹⁰ V České republice (ČR) se vyskytují rody *Galanthus* L. (sněženka), *Leucojum* L. (bledule) a *Narcissus* L. (narcis), které rostou ve volné přírodě, nebo jsou pěstovány pro své okrasné květy (Obrázek 1). Mezi významné rody vyskytující se v tropických oblastech patří například rod *Crinum* L. (křín), *Amaryllis* L. (amarylka) nebo *Clivia* Lindl. (klívie, řemenatka), jejich kultivary jsou často pěstovány jako pokojové rostliny (Obrázek 2).^{3,4,11}



Obrázek 1: Rostliny čeledi Amaryllidaceae vyskytující v ČR: zleva *Narcissus* sp., *Galanthus* sp., *Leucojum* sp. (foto Kateřina Černá)



Obrázek 2: Tropické rostliny čeledi Amaryllidaceae: zleva *Amaryllis* sp., *Clivia* sp., *Crinum* sp.¹¹⁻¹³

Rostlina je tvořena cibulemi, cibulovými hlízkami nebo oddenky. Dva až několik úzkých většinou čárkovitých listů tvoří přizemní růžici, ze které vyrůstá neolistěný stonek. Zřídka se vyskytují rody se stonkem typu lodyha, u kterého listy vyrůstají přímo ze stonku. Květy jsou oboupohlavné, mají 6 tyčinek a spodní semeník srostlý ze 3 plodolistů. Uspořádání okvětních lístků je pravidelné

nebo souměrné ve dvou kruzích po třech lístcích. Listy okvěť jsou volné nebo v dolní části srůstající v okvětní trubku. Někdy je součástí květu pakorunka. Na stonku se nachází jeden květ nebo jsou květy uspořádány do šroubelovitých a hroznovitých květenství. Plodem je tobolka nebo bobule.^{3,10,14}

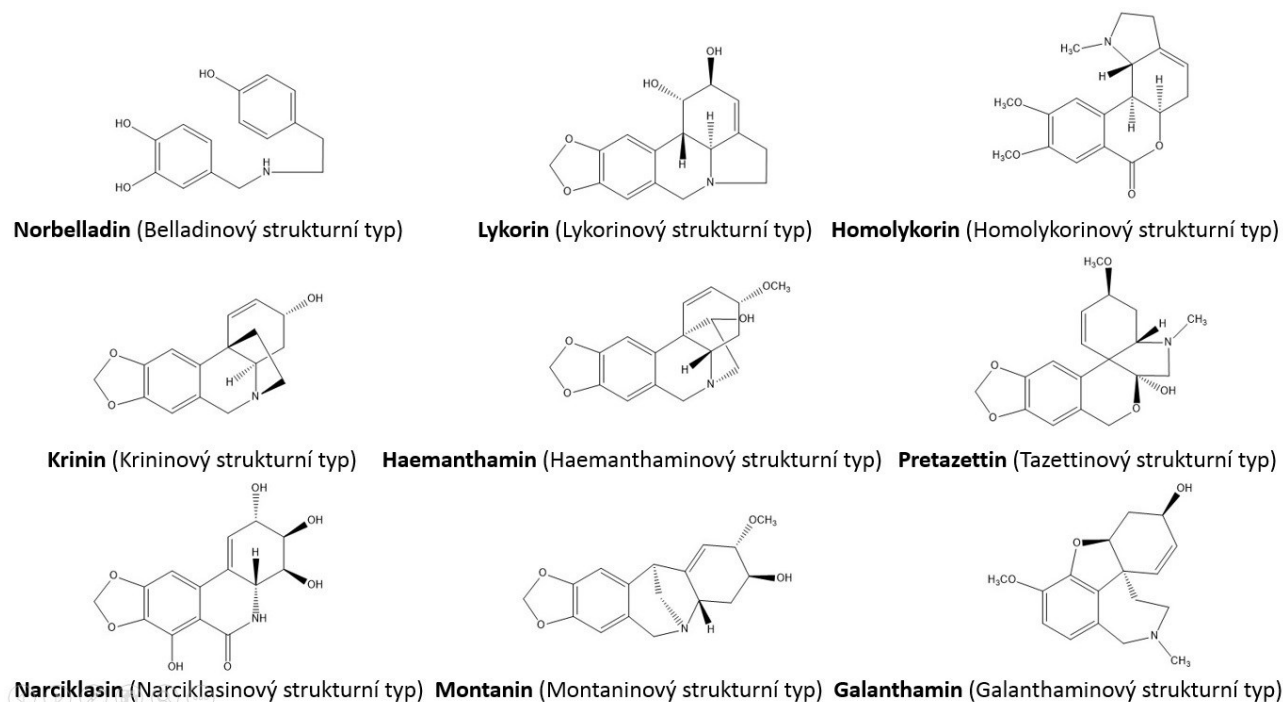
Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou známé jako okrasné květiny a dále pro alkaloidy, které tvoří – Amaryllidaceae alkaloidy.¹⁵ AmA jsou látky primárně toxické a mohou způsobovat otravy. Jedovaté jsou celé rostliny, největší koncentrace alkaloidů je většinou v podzemních částech rostliny – cibulích¹⁶. Příznaky otravy se mírně liší podle konkrétního alkaloidního spektra dané rostliny. V ČR se lze setkat například s otravou rostlinou *Clivia miniata* (řemenatka oranžová), *Galanthus nivalis* (sněžěnka podsněžník), nebo *Narcissus poeticus* (narcis bílý).¹⁷ Intoxikace se projevuje bolestmi hlavy, nadměrným sliněním, nevolností, závratěmi, nepravidelnostmi srdečního rytmu, poruchami zraku a dermatitidou. Některé z těchto projevů mohou být vyvolány lykorinem a haemanthaminem a nevhodné použití řady druhů může být fatální.¹⁸

Empiricky bylo zjištěno, že extrakty z rostlin čeledi Amaryllidaceae mají i rozmanité léčebné účinky. Těchto účinků bylo využíváno v tradiční medicíně různých oblastí světa, z nichž v některých se využívají dodnes. Jako příklady lze uvést cibule *Crinum asiaticum* L. (křín), které byly uplatňovány v Indii jako tonika, projímadla, expektorans a při močových potížích. Jeho čerstvé kořeny způsobují nevolnost a zvracení, semena byla využívána jako drastická projímadla, diuretika a tonika, listy byly použity také jako expektorans a dále proti kožním onemocněním a zánětlivým procesům.¹⁹ Dalším příkladem může být rostlina *Boophane disticha* (L.f.) Herb., která se vyskytuje v oblastech tropické východní a jižní Afriky.²⁰ Její části cibulí nebo nálevy se přikládají na hnisavé rány a vředy, v terapii revmatismu slouží jako úleva od bolesti. Odvary se používají k léčbě bolesti hlavy, křečí a viscerální bolesti.¹⁸ V jihoafrické oblasti se dále používá i rostlina *Agapanthus praecox* (kalokvět). „Zuluové a další jihoafrické národy používají kořeny kalokvětu ve své tradiční medicíně – proti kašli a nachlazení, ale i na choroby srdce a při léčbě žen v době těhotenství. Listy se používají jako obinadla a obvazy, dále na zábaly na unavená chodidla. Zároveň je rostlina využívána i v magii.“²¹ V terapii západní medicíny se v současné době uplatňuje galanthamin v léčbě AN. Dále lykorin a lykobetain jsou díky svým cytotoxickým účinkům potenciálními onkolytiky.³

3.2 AMARYLLIDACEAE ALKALOIDY A JEJICH BIOSYNTÉZA

AmA skládající se z polycyklické struktury obsahující dusík, jsou produkovány výhradně rostlinami čeledi Amaryllidaceae.²² Jejich biosyntetická cesta je studována od roku 1960 a je pojmenována podle hlavního meziprojektu norbeladinová cesta.^{5,16} Biosyntéza vychází

z aminokyseliny L-tyrosinu a díky tomu jsou amarylkovité alkaloidy řazeny mezi isochinolinové alkaloidy.²³ Výsledkem biosyntetické cesty je vznik devíti základních skupin AmA, mezi které patří typ norbelladinový (norbelladin), lykorinový (lykorin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), haemathaminový (haemanthamin), tazettinový (tazettin), narciklasinový (narciklasin), montaninový (montanin) a galanthaminový (galanthamin) (Obrázek 3). Slabě bazický charakter látek (pK_a 6-9) této skupiny je určen atomem dusíku, který propojuje část tvořenou L-tyrosinem se zbytkem molekuly. Zmíněný dusík může být sekundární, terciární i kvarterní.²⁴



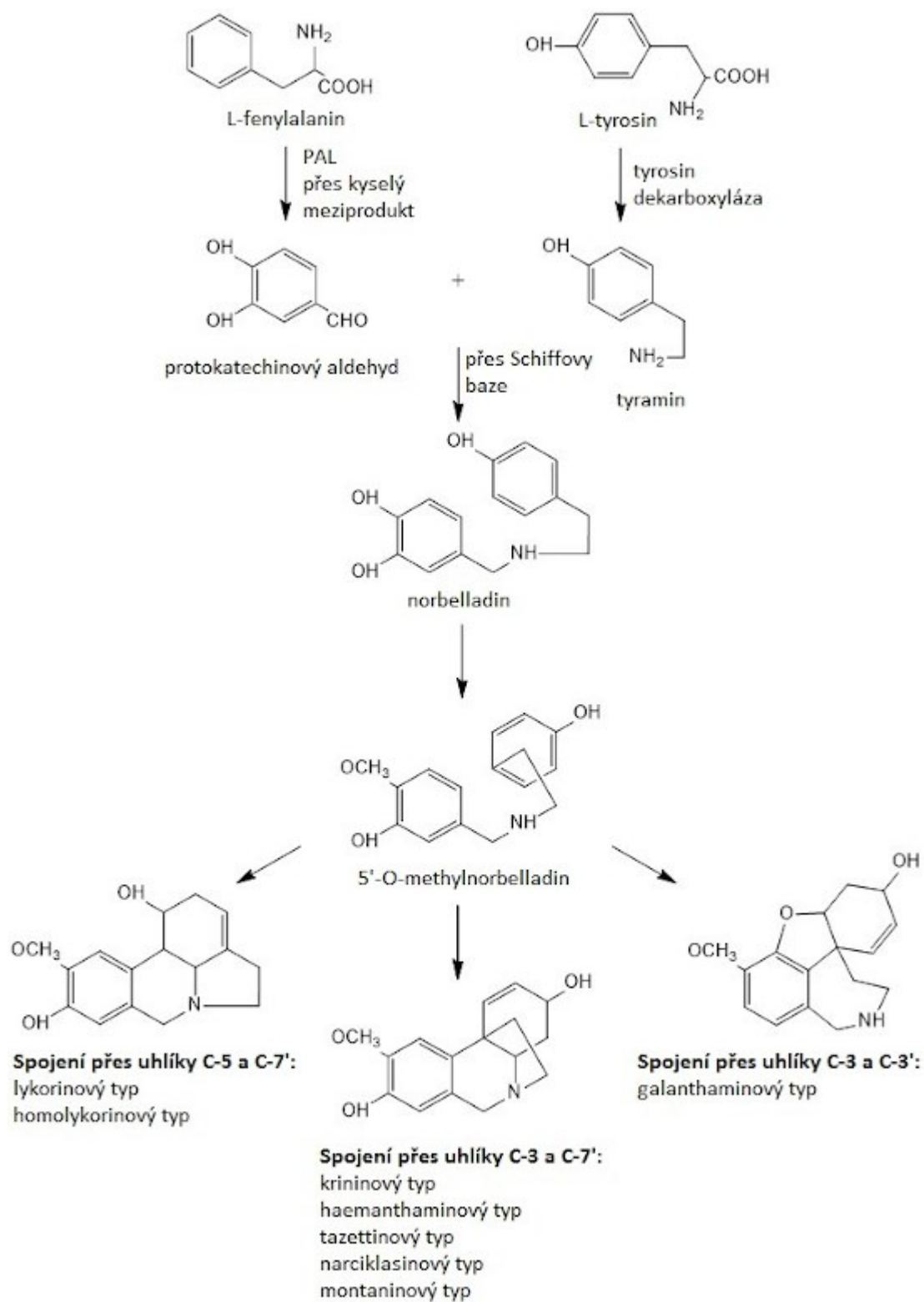
Obrázek 3: Hlavní zástupci základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů²⁵

Prekurzory pro biosyntézu AmA jsou L-fenylalanin (L-Phe), který se podílí na tvorbě benzylové části molekuly belladinu (C-1' až C-7') odpovídající kruhu A, a L-tyrosin (L-Tyr), který je prekurzorem kruhu C (C-3 až C-8), dvou-uhlíkatého postranního řetězce a dusíku (N-C-1-C-2). Dané prekurzory nevstupují do syntézy přímo, ale jsou nejprve modifikovány. L-Tyr se mění dekarboxylací na tyramin pomocí tyrosin dekarboxylázy. U L-Phe dochází ke ztrátě 2 postranních uhlíkových atomů, poté přes meziprodukt kyselinu skořicovou jsou zavedeny na aromatické jádro dvě hydroxylové skupiny, tato reakce je katalyzována pomocí enzymu PAL (fenylalaninamoniumlyasa, phenylalanine ammonia lyase). Z L-Phe vzniká protokatechový aldehyd, který poté vstupuje do syntézy.^{5,16,25}

V prvním kroku biosyntézy dochází k primární cyklizaci, kdy se spojí tyramin a protokatechinový aldehyd a dojde ke vzniku prekurzoru norbelladinu. Meziproduktem v primární

cyklizaci je Schiffova base. Následuje sekundární cyklizace, při které dochází k oxidativnímu spojování norbelladinu a příbuzných alkaloidů, přes meziproduct 4'-*O*-methylnorbelladin dochází k vytvoření skeletů všech devíti základních typů alkaloidů.^{5,25}

Jednotlivé typy vznikají z 4'-*O*-methylnorbelladinu oxidativní cyklizací s fenolickou částí molekuly. Lykorinový typ vzniká spojením uhlíků C-5 a C-7' (ortho-para') a základním skeletem lykorinového typu je pyrrolo[de]fenanthridin. Homolykorinový typ poté vzniká konverzí lykorinového typu alkaloidu norpluvinu a jeho základ tvoří 2-benzopirano-[3,4-g]indol. Krininový, hemanthaninový, tazettinový, narciklasinový a montaninový typ vznikají spojením uhlíků C-3 a C-7' (para-para'). Krininový a hemanthaminový typ jsou odvozeny od 5,10b-ethanofenanthridinu, tazettinový typ od 2-benzopyrano[3,4-c]indolu. Základní kostra narciklasinového typu je z fenanthridinu a 11-methanomorfantridin tvoří základ montaninového typu. Poslední je typ galanthaminový, který vzniká propojením uhlíků C-3 a C-3' (para-ortho') a jeho základem je dibenzofuranové jádro.^{5,25}



Obrázek 4: Schéma biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů^{24,25}

3.3 ROD *NARCISSUS*

Rod *Narcissus* L. (narcis, 1753) tvoří vytrvalé byliny, jeho pojmenování vychází z latinského slova „narkos“ (omamovat, otupovat) podle opojné vůně *Narcissus poeticus*. Přírodním místem výskytu narcisů je jižní Evropa. V současné době se vyskytují i na Britských ostrovech, ve střední Evropě, ve středomořských státech ležících na území severní Afriky a *Narcissus tazetta* dokonce zplaněl ve východní Asii.⁹ V oblastech výskytu rostou narcisy od nížin po horské oblasti, dále je můžeme nalézt na pastvinách, v místech s křovinným porostem, na okrajích lesů, na březích řek nebo ve skalních puklinách.²⁵ Narcisy zahrnují přibližně 50 druhů, 60 přírodních hybridů (počet uváděných druhů v publikacích se často liší, což je způsobeno jejich přirozenou promiskuitou)^{9,24} a množství zahradních kultivarů, v současné době je registrováno 27 000 názvů rodu *Narcissus* v Mezinárodním registru narcisů (The International Daffodil Register and Classified List).²⁶ Narcis je jednou z nejdéle pěstovaných okrasných rostlin⁹, v oblastech České republiky můžeme nalézt například *N. pseudonarcissus* (n. žlutý), *N. poeticus* (n. bílý) (Obrázek 5) a dále řadu okrasných kultivarů.¹⁷



Obrázek 5: Dva botanické druhy narcisů, vlevo *Narcissus pseudonarcissus*, vpravo *Narcissus poeticus*^{27,28}

3.3.1 Klasifikace rodu *Narcissus*

Taxonomie rodu *Narcissus* je složitá a neustálá, příčin je několik. Jednak je to rozmanitost populace divokých druhů narcisů a jejich snadná přirozená hybridizace. Druhým důvodem je pokračování ve šlechtění zahradních kultivarů. Diverzita rodu napomáhá i zplanění okrasných druhů. Z těchto důvodů byla vytvořena klasifikace jak botanických druhů, tak i zahradních kultivarů.^{9,24}

Dělení botanických rodů:

podrod: *Corbularia*

sekce *Bulbocodium*

„Zahrnuje druhy kvetoucí v časném jaru. Květní plátky mají úzké nevýrazné, naproti tomu pakorunka je velká, nálevkovitého tvar. Plátky i pakorunka mívají shodné zbarvení. Základní druh má pakorunku zářivě žlutou a květní plátky se zelenými proužky.“ Zástupce tohoto podrodu je *Narcissus bulbocodium* L.⁹

podrod *Hermione*

1. sekce *Tazettae*

„Do sekce *Tazettae* (taza je italsky šálek) jsou řazeny na jaře kvetoucí druhy s vícekvětními okolíky. Květy mohou být jednobarevné i dvoubarevné s velmi krátkou pakorunkou.“ „Plátky základního poddruhu *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* jsou žluté se žlutooranžovou pakorunkou. Výrazně voní.“ Tyto narcisy mají velmi široký areál přirozeného výskytu od jihozápadní Evropy po oblast Číny.⁹

2. sekce *Serotini*

„*Narcissus serotinus* L. vykvétá na podzim, jedním květem na stvolu. Okvětní plátky bývají bílé, pakorunka žlutá nebo oranžová. Výrazně voní. Listy má velmi úzké, v době květu jsou zatažené. Jedná se o středomořský druh.“⁹

3. Sekce *Aurelia*

Narcisy sekce *Aurelia* kvetou na podzim. Mají tři až dvanáct květů na stonku; bílé okvěti a korunku, která je zakrnělá nebo zcela chybí. Listy jsou ploché zelenošedé. Květy voní.²⁹

podrod *Narcissus*

1. Sekce *Ganymedes*

„*Narcissus triandrus* L. roste ve španělských a portugalských horách a na jihu Francie. Květy mohou být i jednotlivé, častěji však bývají sestavené v okolíku s 2-6 květy. Úzké květní plátky jsou obráceny dozadu, pakorunka je kratší miskovitá. Květy mohou být bílé, tmavě žluté, s pakorunkou citronové barvy a s jasně žlutými květními plátky.“⁹

2. Sekce *Jonquillae*

Žluté květy narcisů této sekce se vyskytují buď jednotlivě, nebo jsou uspořádány v okolíku po 2-5 květech. Doba kvetení je na jaře, zřídka na podzim. Pakorunka je obvykle širší než delší a květy voní. Zástupcem této sekce je *Narcissus jonquilla* L. (narcis okolíkatý).^{9,29}

3. sekce *Narcissus*

Narcisy této sekce kvetou na jaře a v raném létě. Květy se na stoncích nacházejí jednotlivě a jsou dvoubarevné s krátkou pakorunkou. *Narcissus poeticus* L. (narcis bílý) je původní v jihozápadní Evropě, jeho květy se skládají z bílých okvětních lístků stočených mírně dozadu a velmi krátké a široké pakorunky žluté barvy, která má červený okraj. Je to velmi starý druh, už v roce 1552 je v herbářích popisována pro své okrasné účely. Má silnou vůni.⁹

4. sekce *Pseudonarcissus*

Opět doba kvetení zástupců této sekce je na jaře a v brzkém létě. Květy mohou být jednotlivé nebo jsou uspořádány v okolíku. Mají velmi dlouhou pakorunku a okvětní lístky se mohou stáčet dozadu. Mezi zástupce této sekce patří *Narcissus cyclamineus* DC., který má květy podobné bramboříku a *Narcissus pseudonarcissus* L. (narcis žlutý) jehož květy mají barvu od žluté po bílou.⁹

5. Sekce *Apodanthi*

Do této sekce patří rody kvetoucí na jaře. Květy mohou být jednotlivé nebo v květenství, barvy bílé nebo žluté, ale vždy jsou jednobarevné. Pakorunka má pohárkovitý tvar.²⁹

6. Sekce *Tapeinanthus*

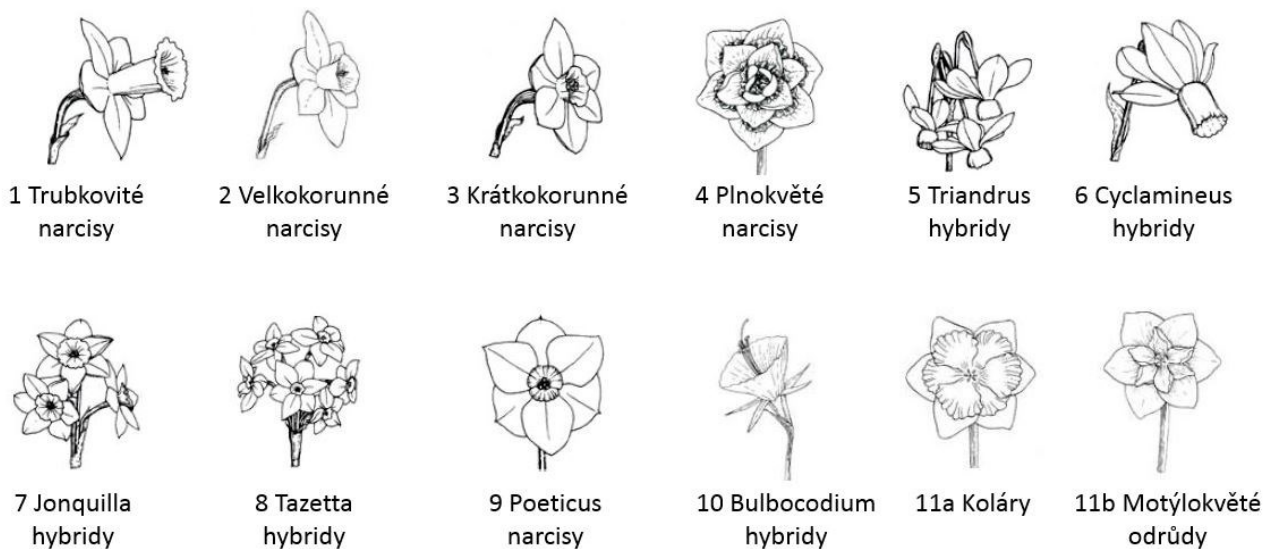
„Zástupce této sekce *Narcissus cavanillesii* Barra a G. Lopéz je dnes částí botaniků zařazen do samostatného rodu *Braxireon*.“⁹

Taxonomie kultivarů

Podle podobných vnějších znaků byly uspořádány zahradní kultivary do 12 skupin/divizí, které vycházejí z botanických druhů. Botanické druhy pak tvoří skupinu/divizi 13 (Tabulka 1, Obrázek 6). Základ klasifikaci dala královská botanická společnost (Royal Horticultural Society).^{9,30} Byl vytvořen seznam všech kultivarů, který je nazván „The International Daffodil Register and Classified List“, a jeho obsah je každoročně aktualizován doplněním nových registrovaných jmen kultivarů narcisů.²⁵

Tabulka 1: Klasifikace zahradních kultivarů^{9,29}

Skupina	Název	Výchozí botanický druh
1	Trubkovité narcisy Trumpet daffodil cultivars	<i>N. pseudonarcissus</i>
2	Velkokorunné narcisy Larged-cupped daffodil cultivars	z křížení <i>N. pseudonarcissus</i> a <i>N. poeticus</i>
3	Krátkokorunné narcisy Small-cupped daffodil cultivars	z křížení n. s velkou pakorunkou a <i>N. poeticus</i>
4	Plnokvěté narcisy Double daffodil cultivars	všechny plnokvěté odrůdy nezávisle na původu
5	Triandrus hybridy Triandrus daffodil cultivars	<i>N. triandrus</i>
6	Cyclamineus hybridy Cyclamineus daffodil cultivars	<i>N. cyclamineus</i>
7	Jonquilla hybridy Jonquilla daffodil cultivars	N. sekce <i>Jonquilla</i>
8	Tazetta hybridy Tazetta daffodil cultivars	z křížení <i>N. tazetta</i> a <i>N. poeticus</i>
9	Poeticus narcisy Poeticus daffodil cultivars	<i>N. poeticus</i>
10	Bulbocodium hybridy Bulbocodium daffodil cultivars	N. sekce <i>bulbocodium</i>
11	Odrůdy s roztřepenou (s dělenou) pakorunkou (orchideokvěté) Split corona daffodil cultivars	není uvedeno
11 a	Koláry Collar Daffodils	
11 b	Motýlokvěté odrůdy Papillon Daffodils	
12	Zvláštnosti (nezařaditelné kultivary) Other daffodil cultivars	není uvedeno



Obrázek 6: Přehled tvarů květů zahradních kultivarů²⁹

3.3.2 Obsahové látky rodu *Narcissus*

Nejdůležitějšími obsahovými látkami v rodě *Narcissus*, jako v celé čeledi Amaryllidaceae, jsou AmA, které bývají formálně řazeny mezi isochinolinové alkaloidy. Alkaloidy jsou obsaženy v celé rostlině, ale nejvíce jsou koncentrovány v cibulích (1-2 %), které se nacházejí v klidovém stádiu. Doposud bylo identifikováno přibližně 100 látek alkaloidní povahy v narcisech. Prvním izolovaným alkaloidem byl v roce 1877 lykorin z druhu *Narcissus pseudonarcissus*.²⁴ U jednoho druhu narcisu se nachází několik dominantních látek a velké množství látek, které se objevují v nízkých koncentracích.³¹

Lykorinový a homolykorinový typ alkaloidů jen nejčastější v rodě *Narcissus*. Obzvláště časté jsou lykorin, galanthin a pluviin (lykorinový typ), homolykorin a lykorenin (homolykorinový typ), z uvedených sloučenin je lykorin zcela nejběžnější. Tyto dva typy AmA jsou rozšířené hlavně v sekci *Narcissus* (hlavně lykorinový typ), *Pseudonarcissi* (hlavně homolykorinový typ) a *Tazettae* divokých druhů a ve skupině kultivarů 1, 2 a 4. Homolykorinové AmA se v některých kmenech čeledi Amaryllidaceae vůbec nevyskytují, a proto je možné je pokládat za charakteristický znak kmene *Narcisseae*.²⁵

Třetím hojným typem v rodě *Narcissus* je galanthaminový typ. Nejreprezentativnějším a nejužívanějším zástupcem je galanthamin.²⁵ V některých kultivarech a divokých druzích narcisů se nachází vysoká koncentrace galanthaminu, uvádí se, že *Narcissus confusus* obsahuje až 0,1 % galanthaminu vztaženo na čerstvou váhu cibulí.³² V současné době jsou narcisy také využívány pro získání galanthaminu pro léčebné účely. Česká firma TEVA využívá pro izolaci kultivar *N. pseudonarcissus* cv. CARLTON.³³ Dalšími významnými skupinami alkaloidů jsou montaninový a mesembranový (*Sceletium*) typ alkaloidů a dva nezařazené alkaloidy cheryllin a pallidiflorin.²⁵ Příklady izolovaných alkaloidů z rodu *Narcissus* jsou uvedeny v Tabulka 2.

Narcisy se svým ročním cyklem přizpůsobily místu původního výskytu ve Středomoří, které se vyznačuje suchými horkými léty, chladnými zimami a jen krátkým vlhkým obdobím vhodným pro růst. Se sezonním cyklem se mění i složení specifických látek a jejich množství v jednotlivých rostlinných orgánech. Změny v koncentraci látek v jednotlivých orgánech pravděpodobně souvisí s ochrannou funkcí těchto látek. V nadzemní části šťavelan vápenatý chrání rostlinu před spásením zvěří, nebo dalším poškozením. AmA nejspíše vznikají v nadzemní části rostliny, kde se spolupodílí na ochranné funkci a pravděpodobně mohou sloužit i jako signální sloučeniny. Na konci vegetačního období jsou transportovány do cibulí, kde brání jejich pozření zvířaty.^{24,25}

Tabulka 2: Vybrané alkaloidy izolované z rodu *Narcissus*³³

Strukturní typ	Izolovaný alkaloid	Rostlina
galanthaminový	narwedín	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. pumilus</i> var. <i>plenus hort.</i> , <i>N. nanus</i> cv. ELKA, <i>N. jonquilla</i>
	lykoramin	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. cyclamineus</i> cv. FEBRUARY GOLD, <i>N. jonquilla</i> , <i>N. papyraceus</i>
	galanthamin	<i>N. pseudonarcissus</i> cv. CARLTON, <i>N. confusus</i> , <i>N. poeticus</i> subsp. <i>radiiflorus</i> , <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. cv. SUNDISC</i> , <i>N. cv. WATTERPERRY</i>
	norlykoramin	odrůdy <i>N. pseudonarcissus</i> , <i>N. cv. VAN SION</i> , <i>N. cv. INGLES COMBE</i>
	lykoraminon	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. sp.</i>
haemanthaminový	seko-isopowelaminon	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL
	maritidin	<i>N. tazetta</i> var. <i>Chinensis</i> , <i>N. papyraceus</i>
	haemanthamin	<i>N. asturiensis</i> , <i>N. bujei</i> , <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. cv. SEALING</i> , <i>N. cv. BRIDAL CROWN</i>
lykorinový	lykorin	<i>N. canaliculatus</i> , <i>N. cv. FOLLY</i> , <i>N. bicolor</i> , <i>N. × incomparabilis</i> spp.
	pluviin	<i>N. cv. INSULINDE</i> , <i>N. cyclamineus</i> cv. PEEPIN TOM, <i>N. × incomparabilis</i> spp., <i>N. poeticus</i> , <i>N. pseudonarcissus</i> spp.
	galanthin	<i>N. cyclamineus</i> cv. BERYL, <i>N. cyclamineus</i> cv. CAIRHAYS, <i>N. jonquilla</i> cv. GOLDEN SCEPTRE, <i>N. pseudonarcissus</i> spp.
	assoanin	<i>N. assoanus</i> , <i>N. nanus</i> cv. LITTLE GEM, <i>N. nanus</i> cv. TOPOLINO, <i>N. jacetanus</i>
	oxoassoanin	<i>N. assoanus</i> , <i>N. jacetanus</i>
	karanin	<i>N. cv. LIVIA</i> , <i>N. cv. ICE FOLLIES</i>
	hippeastrin	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. × incomparabilis</i> cv. FORTUNE, <i>N. × odorus</i> var. <i>rugulosus</i>
homolykorinový	homolykorin	<i>N. cyclamineus</i> cv. FEBRUARY GOLD, <i>N. eugeniae</i> , <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. munozii-garmendiae</i> , <i>N. papyraceus</i>
	masonin	<i>N. jonquilla</i> cv. GOLDEN SCEPTRE, <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. pseudonarcissus</i> cv. CARLTON
	8-O-demethylhomolykorin	<i>N. cv. INGLES COMBE</i> , <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. pallidiflorus</i> , <i>N. papyraceus</i> , <i>N. primigenius</i>
	odulin	<i>N. × incomparabilis</i> cv. FORTUNE, <i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL, <i>N. jonquilla</i> cv. GOLDEN SCEPTRE
	lykorenin	<i>N. poeticus</i> , <i>N. triandrus</i> cv. THALIA, <i>N. pseudonarcissus</i> cv. UNSURPASSABLE, <i>N. cv. INGLES COMBE</i>
tazettinový	tazettin	<i>N. tazetta</i> , <i>N. bulbocodium</i> var. <i>Conspicuus</i> , <i>N. cv. SWEETNESS</i>
	pretazettin	<i>N. confusus</i> , <i>N. panizzianus</i> , <i>N. obesus</i> , <i>N. pallidiflorus</i>
narciklasinový	narciklasin	<i>N. canaliculus</i> , <i>N. cyclamineus</i> , <i>N. jonquilla</i> , <i>N. incomparabilis</i> , <i>N. cv. VERGER</i>
mesembranový	mesembrin	<i>N. pallidus</i> , <i>N. triandrus</i>
	joubertiamin	
	skeletin A4	
montaninový	pankracin	<i>N. angustifolius</i> subsp. <i>transcarpathicus</i>
galanthindolový	galanthindol	<i>N. poeticus</i> cv. PINK PARASOL
cheryllinový	cheryllin	<i>N. munozii-garmendiae</i>

3.3.3 Využití rostlin rodu *Narcissus* v tradiční a lidové medicíně

Rostliny čeledi Amaryllidaceae, zejména rod *Narcissus*, mají v dějinách tradiční a západní medicíny významné místo.³⁴ Již z doby před více jak 2 400 lety existují záznamy o využití extraktů z rostlin čeledi Amaryllidaceae pro léčbu rozmanitých zdravotních problémů.³⁵ Rod *Narcissus* v tradiční medicíně má důležitou roli. Ve starověku Hippokrates z Kósu popsal účinky narcisů k terapii nádorových onemocnění. Ve starověkém Římě zaznamenal antineoplastické účinky *Narcissus poeticus* a *N. pseudonarcissus* Plinius Starší.³⁶ Zmínka o druhu *N. poeticus* se nachází i v bibli, kde je popsána terapie příznaků, které by se v současné době dali označit jako rakovina.³⁷ Léčba nádorových bujení pomocí narcisů pokračovala i v období středověku v arabských oblastech, v severní Africe a Číně³⁸, kde byl používán okrasný druh *N. tazetta* var. *chinensis*.²⁵

Dalšími známými účinky bylo působení antiflogistické a analgetické. Narcis byl aplikován na rány, těžké abscesy, natažené šlachy, ztuhlé nebo bolavé klouby a další lokální onemocnění. V období antiky bylo používáno mazání „*Narcissimum*“.³⁹ Renesanční lékař Pietro Andrea Matthioli popsal terapii cibulemi nebo rozmačkanými listy z devíti různých narcisů, jež byly aplikovány na popáleniny, vředy a špatně se hojící rány.⁹ Obdobné indikace byly zaznamenány v herbáři Ira Johna K'Eoghose, který doporučoval obklady z rozdrčených kořenů narcisu smíšených s medem.¹¹ V současné době je v Turecku *N. tazetta* pro své antiflogistické a analgetické vlastnosti využíván jako domácí lék proti abscesům.⁴⁰

Mezi tradiční využití rodu *Narcissus* patří i terapie infekčních onemocnění, sirupem nebo nálevem byl zmírňován městnavý bronchiální katar a epidemie dyzenterie.²⁵ Dále bylo známo použití květů a cibulí narcisů na poruchy nervového systému, na záchvaty hysterie a epilepsii.^{16,39} Narcisům jsou též připisovány schopnosti afrodisiakální, zároveň byly používány jako antikoncepce. Byly rovněž doporučovány proti plešatosti, k vyvolání zvracení nebo na léčbu spasmů.³⁹

Postupně bylo zjištěno, že za veškerými účinky stojí specifické látky bazické povahy, již zmíněné AmA. Systematicky studovány byly od druhé poloviny 19. století.²⁵ Do nedávné doby bylo izolováno více než 500 strukturně odlišných alkaloidů, které mají široké spektrum biologických aktivit, izolováno z různých druhů Amaryllidaceae.⁴¹ Během výzkumu bylo zjištěno, že tyto alkaloidy mají zajímavé fyziologické účinky, které zahrnují působení protinádorové¹⁶, antivirové⁴¹, antifungální⁴², protizánětlivé⁴³, antiparazitické¹⁶, antibakteriální¹⁶, analgetické⁴⁴, vyvolávají inhibici erytrocytární acetylcholinesterázy (HuAChE) a plazmové butyrylcholinesteráza (HuBuChE)⁴⁵

a ovlivňují další cílových struktur související s Alzheimerovou chorobou, jako je prolyl oligopetidáza (POP)⁶ nebo glykogen syntáza kináza 3 β (GSK-3 β).²²

3.4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA AMARYLLIDACEAE ALKALOIDŮ

3.4.1 Biologická aktivita spojená s léčbou Alzheimerovy nemoci

AN je neurodegenerativní onemocnění spojené s progresivním zhoršováním paměti a kognitivních funkcí.^{32,46} Představuje nejčastější typ demence, celosvětově je příčinou 60–70 % případů demence z celkového počtu 50 milionů lidí postižených demencí.⁴⁷ V České republice pravděpodobně žije více než 150 tisíc pacientů s demencí z toho je 62 % případů způsobeno Alzheimerovou nemocí.⁴⁸ Prodlužující se délka života je přímo spojena se zvyšujícím se počtem starších lidí a následně úměrná rostoucímu počtu senilních poruch, včetně neurodegenerativních onemocnění.⁴⁹ Předpokládá se, že celkový počet lidí trpících demencí dosáhne v roce 2030 82 milionů a v roce 2050 152 milionů lidí.⁴⁷

U AN zatím není známa příčina, která vyvolává onemocnění, proto v dnešní době není možná kauzální léčba a její vyléčení. Jsou však známy neurodegenerativní děje, které vedou ke vzniku demence. Současná zavedená i potenciální farmakologická léčba se zaměřuje na ovlivnění těchto patologických procesů.^{46,50} Léčiva mohou zpomalit průběh onemocnění, zmírnit jeho základní i přidružené neuropsychiatrické projevy a zlepšit výkon pacienta v běžných denních aktivitách.⁵⁰

K degradaci neuronů v korové oblasti dochází několika způsoby. Prvním z nich je extracelulární ukládání nerozpustného proteinu amyloidu β ($A\beta$) ve formě amyloidních plaků. $A\beta$ vzniká nefyziologickým štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Abnormální štěpení je způsobeno zvýšenou aktivitou β -sekretasy (Beta-site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme 1, BACE1)³³ oproti fyziologicky působící α -sekretase.⁴⁶ Vzniklé peptidové proteiny jsou delší než v mozku zdravého člověka a dochází k jejich shlukování a polymerizaci, která vyústí až ve vznik plaků.⁴⁶ Amyloidní plaky jsou pak zodpovědné za dysfunkci neuronů, rozvoj zánětu a oxidační stres.⁵¹ Druhým mechanismem ztráty neuronů je apoptóza vyvolána intracelulárními útvary zvanými neurofibrilární uzlíčky (neurofibrillary tangles, NFTs). Tyto zámočky vznikají z intraneuronálního strukturního proteinu tau, který je hyperfosforylován pomocí enzymů glykogen syntasa kinasa (GSK-3 β) a cyklin dependentní kinasa (CDK5).⁵²

Glykogen syntáza kinasa-3 β (GSK-3 β) je všudypřítomná pleiotropní serin/threoninová kinasa, která hraje klíčovou roli v buněčných funkcích, včetně regulace buněčného cyklu, diferenciaci a proliferace a genové exprese regulováním široké škály známých cílů, mezi které například patří glykogen syntasa, tau-protein a β -katenin.⁵³ GSK-3 β se podílí na buněčné signalizaci, včetně Wnt a Hedgehog cesty, na neuronálním vývoji, na regulaci tvorby inzulínu, transkripci, dělení buněk, přežití

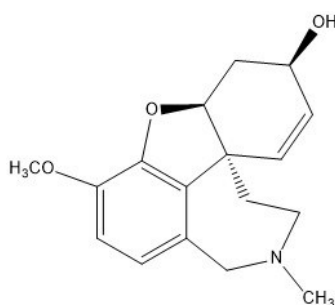
buněk a buněčné smrti.^{53–55} Z těchto důvodů se může porušená funkce GSK-3 β podílet na rozvoji řady poruch zahrnujících AN⁵⁶, nádorová onemocnění⁵⁷, diabetes mellitus⁵⁸, kardiovaskulární onemocnění⁵⁹ a psychiatrické poruchy⁶⁰. U AN je porušená funkce GSK-3 β pravděpodobně příčinou hyperfosforylace tau proteinu a může indukovat i tvorbu A β .⁵¹

Dále dochází k poruše tvorby a uvolnění některých neurotransmiterů, jedná se hlavně o acetylcholin (ACh).⁴⁶ U pacientů s AN vede deficit ACh v kortexu a hippokampu ke zhoršení úrovně cholinergních funkcí, čímž dochází k poškození paměti.³² „ACh je syntetizován pomocí enzymu cholinacetyltransferasy z cholinu a acetyl-koenzymu A.“⁴⁶ K poškození biosyntézy dochází z několika důvodů, jednak je poškozen reuptake cholinu do neuronu, poté je snížena tvorba acetyl-koenzymu A díky poškozené funkci mitochondrií⁴⁶ a v těžkých stádiích dochází také ke snížení hladiny cholinacetyltransferasy až o 90 %.⁶¹ Acetylcholin je v synaptické štěrbině odbouráván acetylcholinesterasou (AChE) na cholin a kyselinu octovou, v menší míře se na degradaci podílí i butyrylcholinesterasa (BuChE), která je méně substrátově specifickým enzymem a dokáže odbourávat jakékoli estery.^{6,46} V těžších stádiích AN však dochází k poklesu AChE, stejně jako u cholinacetyltransferasy až o 90 %, a zvyšuje se při degradaci význam BuChE.⁶¹

V dnešní době je popsáno, že některé neuropeptidy jsou důležitými modulátory kognitivních funkcí.⁶² Mezi látky účastníci se procesu učení a paměti patří vazopresin, substance P a thyreotropin uvolňující hormon.^{63,64} Uvedené sloučeniny jsou široce distribuovány v tělních orgánech, včetně mozku.⁶⁵ Všechny tyto malé peptidy obsahují AMK prolin a na jeho karboxylovém konci dochází k jejich degradaci pomocí prolyl oligopeptidasy (POP), která je řazena mezi cytosolické serinové peptidasy.^{63,64} Degradace těchto peptidů pomocí POP může urychlit proces stárnutí a případně se podílet na neurodegenerativních onemocněních souvisejících s věkem.⁶² V posledních letech POP nabývá na významu jako potenciální cíl pro léčbu schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a kognitivních poruch, které se vyskytují i u AN. Účinky POP jsou vysvětlovány hlavně jeho účastí na metabolismu inositol-1,4,5-trifosfátu, který je klíčovou molekulou v transdukční kaskádě neuropeptidové signalizace. Bylo zjištěno, že některé inhibitory POP jsou účinné proti demenci^{66,67}, proto by inhibice POP mohla být významným podpůrným nástrojem při léčbě AN.⁶

V současné době je používán jediný AmA pro léčbu AN, alkaloid galanthamin (Obrázek 7), který je dlouhodobě působícím, selektivním, reverzibilním kompetitivním inhibitorem AChE. Poprvé byl izolován z *Galanthus nivalis* L. ve 40. letech 20. století. Nejprve byl využíván pro různé klinické účely, pro ukončení svalové relaxace navozené tubokurarinem, k léčbě paralýzy po dětské obrně, k terapii myastenien gravis nebo poškození mozku úrazem. Potenciálním lékem pro terapii AN se

galanthamin stal až po roce 1986, kdy byla objevena jeho schopnosti procházet hematoencefalickou bariérou. Prvním léčivým přípravkem se stal NIVALIN[®], ve kterém se galanthamin nacházel ve formě soli, hydrobromidu. Později byl v Evropě uveden na trh přípravek jménem REMINYL[®].²⁵ V současné době je v České republice dostupný přípravek Galantamin Mylan[®].⁶⁸ Sůl galantamin hydrobromid je používána na terapii mírně a středně závažné AN.⁶⁵ Kromě inhibice AChE stimuluje pre- i post-synaptické nikotinové receptory, které mohou zvyšovat uvolnění neurotransmiterů a tím přímo stimulovat neuronální funkce. Předpokládá se také, že díky stimulaci nikotinových receptorů chrání neurony vůči apoptóze indukované toxicitou Aβ.^{25,46} Zároveň však neovlivňuje enzym BuChE, který v pozdějších stádiích nemoci získává větší význam v degradaci ACh. Proto jsou výzkumy zaměřovány na hledání látek s duální aktivitou, které budou působit inhibiči jak enzymu AChE, tak i BuChE.⁶

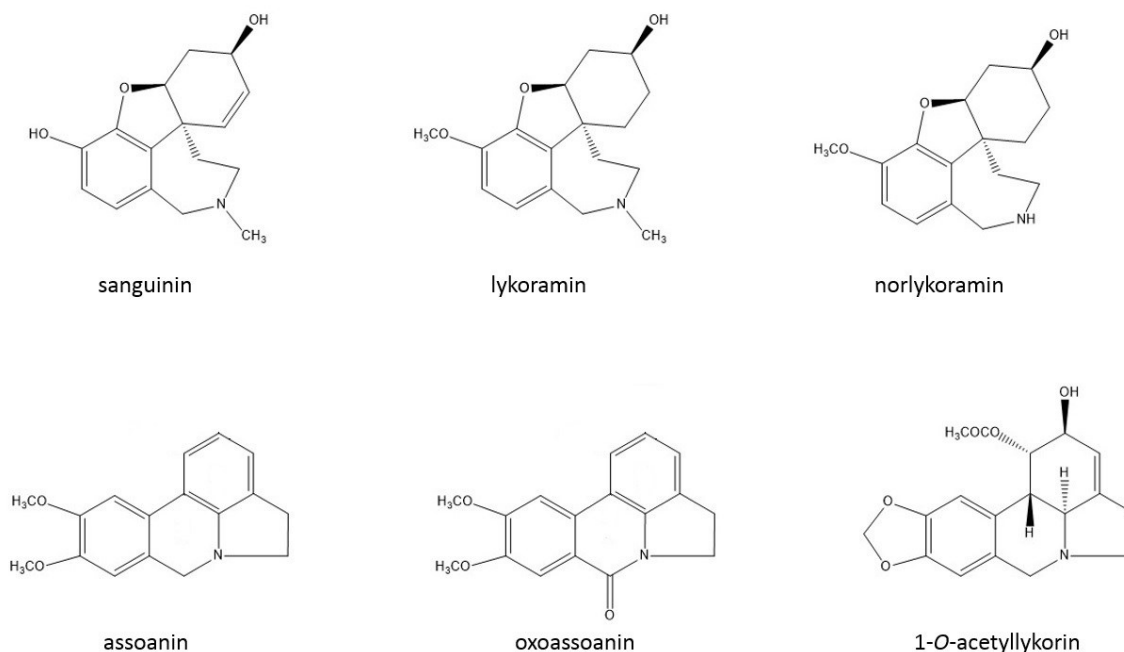


Obrázek 7: Klinicky používaný AmA galanthamin

Pokud jde o další AmA a jejich působení jako inhibitory AChE, tak bylo zaznamenáno, že je jejich aktivita spojená hlavně s alkaloidy galanthaminového a lykorinového strukturního typu, s výjimkou vlastního lykorinu.^{32,69} Naopak bylo zjištěno, že alkaloidy patřící do skupiny krininu, haemanthaminu, homolykorinu a tazettinu jsou vůči AChE neaktivní.⁷⁰ Mezi alkaloidy se zajímavou AChE inhibiční aktivitou byl zařazen například sanguinin, 11-hydroxygalanthamin, 1-O-acetyllykorin, assoanin a galanthamin, který se používá jako standard.⁶

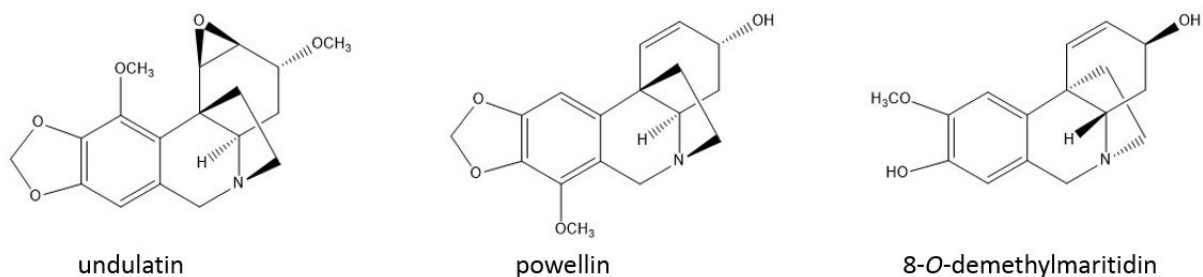
Významnou úlohu v inhibiční aktivitě AChE u galantaminu hraje intramolekulární vodíková vazba mezi hydroxylovou skupinou na C-3 a kyslíkem dihydrofuranového kruhu.⁴⁹ Sanguinin (9-O-demethylgalanthamin) je přibližně 10x účinnější inhibitor AChE než galanthamin. Jeho vyšší účinek je způsoben volnou hydroxy skupinou, která vznikla ztrátou methylu v poloze C-9. Naopak ztráta účinnosti galanthaminových alkaloidů lykoraminu a epinorlykoraminu může být způsobena nepřítomností dvojnásobné vazby v kruhu C (mezi uhlíky C-4 a C-4a).³² Snížení účinnosti vůči lidské AChE bylo zaznamenáno také u chlidantinu, který je polohovým izomerem galanthaminu.⁴⁹ Účinek proti AChE neaktivnějších alkaloidů lykorinového typu, assoaninu a oxoassoaninu, je pravděpodobně

způsoben planárním uspořádáním molekuly, které je dáno aromatickým kruhem C.³² Dále bylo zjištěno, že inhibiční aktivita lykorinových alkaloidů je ovlivněna substitucí v poloze C-1 a C-2. Jako nejefektivnější se jeví substituce acetoxy skupinou v poloze C-1 a hydroxy skupinou v poloze C-2, které se nachází v molekule 1-O-acetyllykorinu.⁶⁹ (Obrázek 8)



Obrázek 8: AmA galanthaminového a lykorinového typu, na kterých byl popsán vztah struktury a účinku

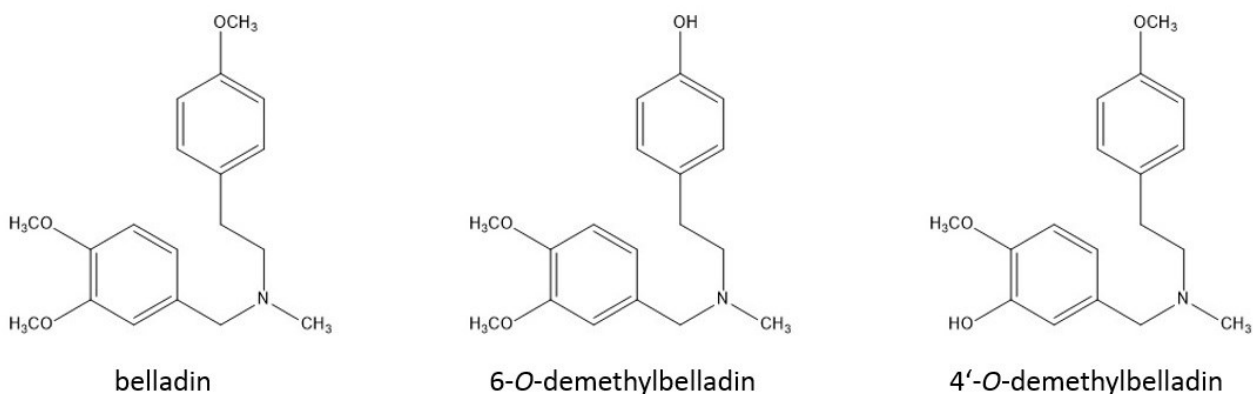
U krininového strukturního typu AmA je v literatuře uváděno, že jsou nositeli slabé inhibiční aktivity vůči AChE.⁴⁹ Krininový a haemanthaminový typ alkaloidů se liší polohou 5, 10b-ethano přemostění, bylo však zjištěno, že konfigurace tohoto přemostění neovlivňuje míru inhibice AChE. V rozporu s tímto tvrzením bylo zjištěno, že alkaloid krininového typu undulatin je velmi aktivní vůči AChE.⁷⁰ Dalšími alkaloidy krininového a haemanthaminového typu, které vykazují slibnou inhibiční aktivitu vůči AChE, jsou například powellin⁶⁵ a 8-O-demethylmaritidin¹⁵. (Obrázek 9) Mezi AmA dalších strukturních typů, které disponují slabším inhibičním účinkem, lze zařadit 3-epimakronin (tazettinový typ), ismin (narciklasinový typ) a bufanisin (krininový typ).⁴⁹



Obrázek 9: Příklady krininových a haemanthaminového alkaloidu s inhibiční aktivitou vůči AChE

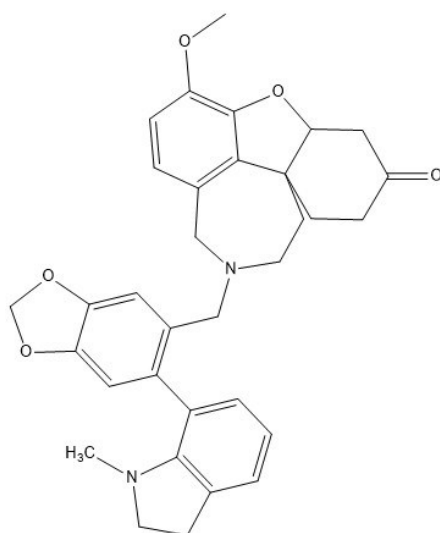
Vysvětlením zajímavé AChE-inhibiční aktivity uvedených krininových alkaloidů může být použití odlišných typů testovaných enzymů. Starší studie byly provedeny s AChE získanou z elektrického úhoře (electric eel, ee; Sigma-Aldrich).¹⁵ Význam původu enzymu v souvislosti s inhibiční aktivitou byl potvrzen při měření aktivity 1-O-acetylykorinu, který při měření inhibiční aktivity vůči AChE získané z elektrického úhoře měl velmi dobrou inhibiční aktivitu, avšak při měření lidské HuAChE byl neaktivní.⁶⁵ Naopak homolykorinový typ alkaloidů byl po měření s AChE získané z elektrického úhoře považován za neaktivní³², ale homolykorin testovaný vůči lidské AChE vykazoval mírnou inhibiční aktivitu.⁷¹

Měření aktivity čistých AmA vůči lidské BuChE bylo prováděno až v posledních deseti letech a získané výsledky pocházejí z laboratoře na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK.²³ Dosud nebylo testováno takové množství látek, ze kterých by mohl být odvozen vztah mezi strukturou a aktivitou⁶. Pouze z aktivity belladinu a jeho dvou derivátů 6-O-demethylbelladinu a 4'-O-demethylbelladinu izolovaných z rostliny *Nerine bowdenii* W. Watson, lze odhadnout, že zvýšení počtu volných hydroxy skupin zvyšuje aktivitu vůči HuBuChE. Zároveň 4'-O-demethylbelladin představuje alkaloid se srovnatelnou HuBuChE-inhibiční aktivitou s působením galanthaminu.⁶⁵ (Obrázek 10) Druhou doposud izolovanou látkou, která vykazuje aktivitu porovnatelnou s galanthaminem je heterodimerní alkaloid narcipavlin.⁷ Dále nadějnou aktivitu vůči HuBuChE vykazovaly některé deriváty haemanthaminu substituované v poloze 11 aromatickým arylem. Zajímavý inhibiční profil byl zjištěn u struktury 11-O-(2-methylbenzoyl)-haemanthaminu, který se jevil jako velmi dobrý inhibitor HuBuChE a zároveň vykazoval zajímavou HuAChE aktivitu.⁷²



Obrázek 10: Belladin a jeho dva deriváty, které vykazují vyšší inhibiční aktivitu vůči BuChE než vlastní belladin

Jak již bylo zmíněno, inhibice POP může představovat důležitý podpůrný přístup v léčbě AN.⁶⁵ Stejně jako u inhibice BuChE veškeré literární údaje týkající se POP inhibice A mA pochází z pracoviště Katedry farmaceutické botaniky FaF UK.²³ Do současné doby bylo provedeno měření na nevelkém počtu látek. První testovanou látkou s důležitou POP-inhibiční aktivitou byl krininový alkaloid undulatin, který vykazoval poloviční aktivitu než standardní látka bajkalin ($IC_{50} = 0,610 \pm 0,021$ mM).⁴⁹ U bajkalinu bylo prokázáno, že má ochranný účinek proti otoku mozku a jeho ischemickému poškození.⁶ Druhým používaným standardem je isochinolinový alkaloid berberin ($IC_{50} = 0,140 \pm 0,020$ mM), který vyazuje vyšší účinnost než bajkalin.⁶⁵ Porovnáním s těmito látkami, především s berberinem, bylo nalezeno více než deset A mA vykazujících zajímavou inhibiční aktivitu vůči POP.^{7,33,65,73} Nejvyšší účinnost vykazovaly alkaloid lykorinového typu 9-O-demethylgalanthin ($IC_{50} = 150 \pm 20$ μ M)⁷³ a heterodimerní alkaloid narcimatulin ($IC_{50} = 29,2 \pm 1,0$ μ M) izolovaný z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. DUTCH MASTER, který zároveň disponuje vysokou inhibiční aktivitou vůči HuBuChE³³. Kromě této látky byly nalezeny tři aktivní alkaloidy homolykorinového typu (homolykorin, masonin, odulin), tři lykorinového typu (1-O-acetyllykorin, acetylkarantin, inkartin), čtyři krininového typu (krinamidin, powellin, bufanidrin, deacetylbowdesin), dva belladinové (6-O-demethylbelladin a 4'-O-demethylbelladin) a galanthaminový alkaloid (narwedín).^{7,33,65,73}

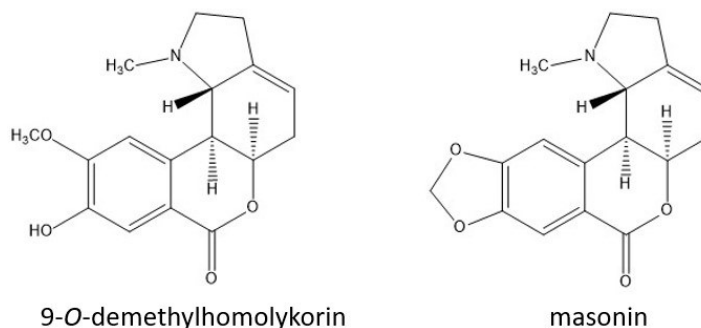


Obrázek 11: Narcimatulin, AmA s nejlepší inhibiční aktivitou vůči POP

Novým cílem, na kterém bylo v nedávné době zahájeno měření aktivity AmA, se stala GSK-3 β . Na Katedře farmaceutické botaniky Faf UK byly studovány alkaloidy izolované ze tří kultivarů rodu *Narcissus* (*N. poeticus* cv. PINK PARASOL, *N. poeticus* cv. BRACKENHURST a *N. pseudonarcissus* cv. DUTCH MASTER), dále z rostlin *Zephyranthes robusta*, *Chlidanthus fragrans* a *Nerine bowdenii*. Testováno bylo 28 alkaloidů patřících do skupiny homolykorinu, lykorinu, galanthaminu, haemanthaminu, krininu, tazettinu a belladinu a také heterodimerní alkaloid narcimatulin. Měřená byla nejprve aktivita AmA při koncentraci alkaloidu 50 μ M, poté u vybraných alkaloidů s aktivitou vyšší než 50 % byla určena hodnota IC₅₀. Získané hodnoty byly porovnány se syntetickým arylindolmaleimidovým derivátem, SB-415286.^{22,33} Tato sloučenina je vysoce selektivní inhibitor GSK-3 vyvinutý společností GlaxoSmithKline, který inhibuje GSK-3 stejně jako další organické inhibitory syntetického původu (například: thiadiazolidindiony, oxadiazolové deriváty) v rozmezí nízkých nanomolárních koncentrací.²²

Hodnoty IC₅₀ vybraných alkaloidů jsou v řádu desítek mikromolů a byly získány pro čtyři vybrané sloučeniny. Vysoká GSK-3 β -inhibiční schopnost byla prokázána u dvou AmA typu homolykorinu, u masoninu (IC₅₀ = 27,81 \pm 0,01 μ M) a 9-O-demethylhomolykorinu (IC₅₀ = 30,00 \pm 0,71 μ M), jedním alkaloidem typu lykorinu karaninem (IC₅₀ = 30,75 \pm 0,04 μ M) a posledním alkaloidem, který vykazoval nejvyšší inhibiční účinek byl heterodimerní alkaloid narcimatulin (IC₅₀ = 20,7 \pm 2,4 μ M).^{22,33} Nízký počet dostupných alkaloidů homolykorinového typu vylučoval podrobnou studii vztahu struktury a aktivity, určité obecné znaky však lze popsat. Zdá se, že přítomnost hydroxylového substituentu v poloze C-2, jak je tomu například u hippeastrinu, je spojena s výrazným snížením inhibiční aktivity vůči GSK-3 β v porovnání s alkaloidy, kde není

přítomen žádný substituent v poloze C-2, jako je tomu u masoninu. Otevření tetrahydropyranového kruhu v tetrahydromasoninu také snižuje inhibiční schopnost vůči GSK-3 β alkaloidů homolykorinového typu.²² (Obrázek 12) Aktivity vůči cílům, které souvisí s AN, uvedených alkaloidů jsou zaznamenány v Tabulka 3.



Obrázek 12: Alkaloidy homolykorinového typu bez substituentu C-2, které vykazovaly zajímavou inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β

Tabulka 3: Inhibiční aktivita Amaryllidaceae alkaloidů vůči AChE (jak humánní, tak i získané z elektrického úhoře – ee) BuChE, POP

Alkaloid	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ HuBuChE (μM)	IC ₅₀ POP (μM)	GSK-3 β (% inhibice)	IC ₅₀ GSK-3 β (μM)
Galanthaminový typ					
galanthamin ^{15,22,32,49}	1,1 ± 0,2 ee	55 ± 2	> 1000	< 50	N.
	2,5 ± 0,1				
sanguinin ³²	0,1 ± 0,0 ee	N.	N.	N.	N.
11-hydroxygalanthamin ³²	1,6 ± 0,2 ee	N.	N.	N.	N.
epinorgalanthamin ³²	9,6 ± 0,7 ee	N.	N.	N.	N.
chlidanthin ^{22,49}	147 ± 6	422 ± 15	> 1000	< 50	N.
narwedín ^{6,22}	281 ± 34	> 500	950 ± 120	< 50	N.
norlykoramin ⁷	> 500	> 500	209 ± 14	N.	N.
Lykorinový typ					
lykorin ^{22,32,49}	> 500	> 500	> 1000	< 50	N.
1-O-acetyllykorin ^{22,65,69}	1,0 ± 0,0 ee	176 ± 14	450 ± 50	< 50	N.
	> 500				
assoanin ³²	3,9 ± 0,2 ee	N.	N.	N.	N.
oxoassoanin ³²	47 ± 1 ee	N.	N.	N.	N.
pseudolykorin ³²	152 ± 32 ee	N.	N.	N.	N.
acetylkarantin ⁶⁵	444 ± 62	141 ± 13	650 ± 40	N.	N.
1,2-di-O-acetyllykorin ⁶⁹	211 ± 10 ee	N.	N.	N.	N.
inkartin ⁶	208 ± 14	> 500	910 ± 90	N.	N.
9-O-demethylgalanthin ^{22,73}	>500	> 500	150 ± 20	51 ± 9	N.
karantin ³³	321 ± 42	487 ± 55	> 1000	58 ± 9	31 ± 0

Alkaloid	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ HuBuChE (μM)	IC ₅₀ POP (μM)	GSK-3β (% inhibice)	IC ₅₀ GSK-3β (μM)
Kriginový typ					
krinin ^{22,65,69}	461 ± 14 ee > 500	> 500	> 1000	< 50	N.
krinamidin ^{22,65,69}	300 ± 27 ee 230 ± 10	> 500	790 ± 60	< 50	N. N.
undulatin ^{22,49,70}	7,4 ± 0,0 ee 23 ± 1	> 500	> 1000	< 50	N. N.
8-O-demethylmaritidin ^{15,70}	57 ± 0 ee 28 ± 1	N.	N.	N.	N.
bufanisin ^{49,65}	99 ± 4	> 500	> 1000	N.	N.
powellin ⁶⁵	29 ± 2	394 ± 5	770 ± 20	N.	N.
bufanidrin ⁶⁵	73 ± 8	> 500	370 ± 40	N.	N.
ambellin ⁶⁵	169,2 ± 7	> 500	> 1000	N.	N.
deacetylbowdesin ⁶⁵	428 ± 31	> 500	790 ± 60	N.	N.
bufanamin ⁶⁵	237 ± 32	> 500	> 1000	N.	N.
1-O-acetylbulbisin ⁶⁵	85 ± 11	482 ± 84	> 1000	N.	N.
Tazettinový typ					
3-epimakronin ⁴⁹	89 ± 3	425 ± 14	N.	N.	N.
Homolykorinový typ					
homolykorin ^{7,22,71}	64 ± 4	151 ± 15	173 ± 41	54 ± 1	N.
masonin ^{7,22}	304 ± 34	229 ± 24	314 ± 34	66 ± 4	28 ± 0
odulin ^{7,22}	> 500	> 500	252 ± 17	57,7 ± 4,4	N.
O-ethyllykorenin ³³	> 500	> 500	> 1000	58 ± 3	N.
Narciklasinový typ					
ismin ⁴⁹	82 ± 4	170 ± 7	> 1000	N.	N.
Belladinový typ					
belladin ^{22,65}	> 500	315 ± 11	> 1000	< 50	N.
6-O-demethylbelladin ⁶⁵	223 ± 24	116 ± 10	660 ± 90	N.	N.
4'-O-demethylbelladin ⁶⁵	> 500	31 ± 4	370 ± 30	N.	N.
Kombinace galanthaminového a galanthindolového typu					
narcipavlin ⁷	208 ± 37	24 ± 1	N.	N.	N.
Haemanthaminový typ					
11-O-(2-methylbenzoyl)-haemanthamin ⁷²	18 ± 1	6,6 ± 1,2	N.	N.	N.
haemanthamin ³³	> 500	> 500	> 1000	52 ± 0	N.
Heterodimerní alkaloid					
narcimatulin ³³	489 ± 60	5,9 ± 0,2	29 ± 1	67 ± 3	21 ± 2

3.4.2 Protinádorová aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

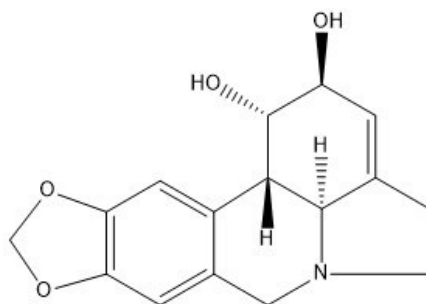
Nádorová onemocnění patří mezi přední příčiny úmrtí na celém světě a v roce 2018 byla příčinou 9,6 milionu úmrtí. Nejčastější je úmrtí na rakovina plic, tlustého střeva, žaludku, jater a prsu.⁷⁴ „Většina postižených umírá v důsledku rozšíření metastáz, které zasahují životně důležité orgány, a ty následně selhávají. Standardní léčba se skládá z chirurgických zákroků, radioterapii a chemoterapie.“³³

Klasická chemoterapeutika působí na rakovinné buňky velmi často jako proapoptická činidla. Selektivita proapopticky působících cytotoxických léčiv je založena na vyšší inhibici proliferace rychle se dělících buněk, mezi které patří právě buňky nádorové. Selektivita těchto látek však není dostatečná a toxicky působí i na zdravé buňky, tím dochází k rozvoji řady nežádoucích účinků.⁷⁵

Dalším úskalím konvenčních přípravků je rezistence nádorů na jejich působení. Rezistence je jednou z hlavních příčin selhání terapie onkologických onemocnění. Některé typy nádorů vykazují přirozenou rezistenci vůči chemoterapeutikům, která nejsou schopna u postižených buněk vyvolat apoptózu. Mezi tyto druhy rakoviny patří nádory plic, jater, žaludku, jícnu a slinivky břišní, jakož i melanomy a gliomy, z nichž všechny spojuje špatná prognóza. Přirozenou rezistencí vůči apoptóze a klasické terapii se vyznačují i metastazující nádory. Odolným vůči terapii nemusí být nádor od počátku léčby, ale může se stát imunním až v průběhu terapie. Tento typ rezistence se nazývá získaná rezistence a zahrnuje i rezistenci vůči více léčivům, které se liší strukturou i mechanismem účinku (multi-drugs resistant, MDR).⁷⁶

Z výše uvedených důvodů je stále nutné hledat nové aktivní molekuly pro léčbu nádorových onemocnění, které budou působit selektivněji a budou obcházet mechanismy rezistence.^{75,76} Izolace a hodnocení nových přírodních látek s protinádorovou aktivitou je hlavní metodou objevování léčiv využitelných v terapii rakoviny. Podle analýzy Newmana a Cragga je 85 ze 175 protinádorových léčiv s malou molekulou objevených od 40. let 20. století přírodního původu nebo jsou to přímé deriváty přírodních látek.⁷⁷ Již bylo uvedeno dříve, že protinádorový účinek extraktů amarylkovitých rostlin, přesněji rodu *Narcissus*, byl znám již od dob antického Řecka, kde jej využíval Hippokrates z Kósu k léčbě děložních nádorů.⁷⁶ V současné době je známa řada AmA, které se vyznačují vysokou selektivitou vůči buňkám nádorovým a relativně nízkou toxicitou vůči zdravým buňkám.¹⁶

„Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším.“¹⁶ Cytotoxická aktivita hlavního zástupce lykorinu je známá od 20. let 20. století. Do dnešní doby bylo studováno přibližně 150 přirozených a polosyntetických analogů lykorinu kvůli jejich cytotoxickému efektu přibližně na 100 buněčných liniích.⁷⁸



Obrázek 13: Lykordin

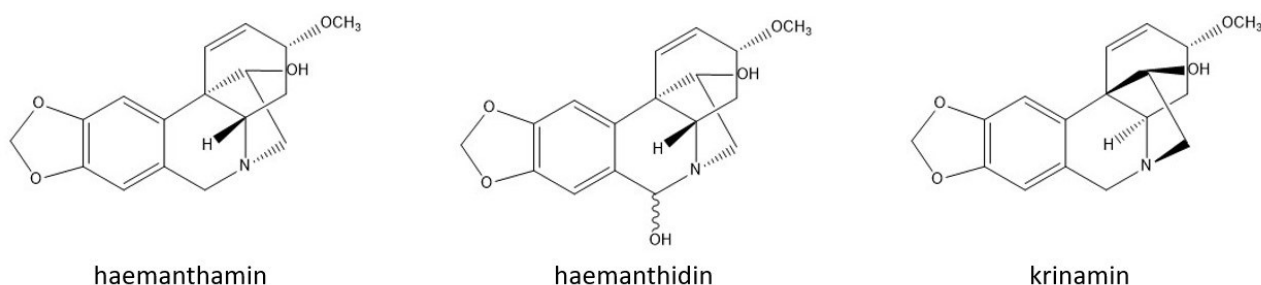
Antiproliferativní vlastnosti lykorinu byly testovány *in vitro* i *in vivo* na velkém množství buněčných linií.⁴¹ Snížení viability buněk po působení lykorinu bylo pozorováno například *in vivo* na buňkách myšího melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu.¹⁶ *In vitro* lykordin cytotoxicky působil například na buněčné linie A549 (adenokarcinom plic), HCT116 (kolorektální karcinom), SK-OV-3 (karcinom vaječníků), NCI-H460 (velkobuněčný plicní karcinom), K562 (lidská myeloidní leukémie), HL-60 (lidská myeloidní leukémie) a MCF-7 (lidský prsní adenokarcinom).⁷⁹ (Tabulka 4) Dále byl u lykorinu popsán účinek na nádorové buňky, které vykazovaly rezistenci vůči apoptóze, v mikromolárních koncentracích.¹⁶

Tabulka 4: Příklady působení lykorinu na různé nádorové linie *in vitro*⁷⁹

Linie buněk	A549	HCT116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	HL-60	MCF-7
IC ₅₀ (μM)	6,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,3	7,5 ± 0,5	4,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2

Zajímavé působení lykorinu bylo uvedeno u buněčných linií lidské myeloidní leukémie (HL-60 a K562). Na obě leukemické linie působil lykordin v koncentraci do 5 μM, ve které byl schopen zastavit buněčný cyklus ve fázi G2/M a G0/G1 a indukovat apoptózu snížením hladiny Mcl-1 protein na posttranskripční úrovni a aktivací kaspas-3, -8, -9.⁸⁰⁻⁸² Zároveň v *in vivo* experimentu s linií HL-60 se projevilo minimum závažných vedlejších účinků na zdravé buňky organismu.¹⁶ Vzhledem k uvedeným skutečnostem lze lykordin považovat za potenciální léčivo v terapii leukémií.⁸²

Dalšími skupinami AmA s významnou cytotoxickou aktivitou jsou haemanthaminový a krininový typ alkaloidů. Jak již bylo uvedeno tyto dvě skupiny se liší polohou ethylenového můstku a dříve bylo uváděno, že jeho umístění má přímý vliv na cytotoxickou aktivitu daných látek, v současné době je však toto tvrzení vyvráceno.⁸³ Mezi nejúčinnější alkaloidy těchto skupin lze zařadit haemanthamin, haemanthidin a krinamin.¹⁶ (Obrázek 14)



Obrázek 14: Cytotoxicky nejaktivnější alkaloidy haemanthaminového a krininového typu

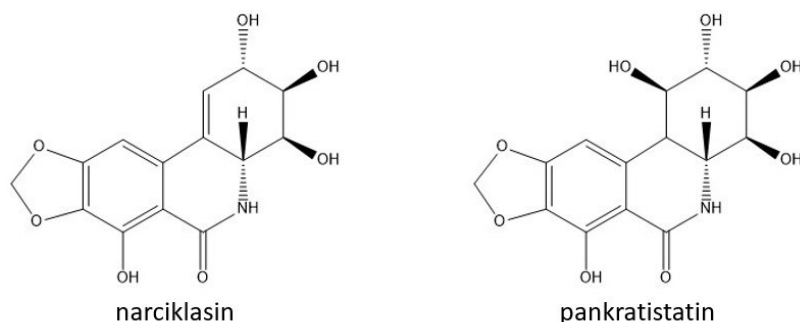
Jako příklad působení lze uvést účinek haemanthaminu v koncentraci do 10 μM na buněčných liniích CEM (akutní lymfoblastická leukémie), K562 (lidská myeloidní leukémie), MCF-7 (lidský prsní adenokarcinom), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), G-361 (lidský kavkazský maligní melanom), zároveň však po působení na normální pokožkové buňky linie BJ po dobu 72 hodin haemanthamin vykazoval cytotoxické účinky i vůči těmto zdravým buňkám.⁸⁴ (Tabulka 5) Haemanthamin pravděpodobně způsobuje inhibici proteosyntézy na ribosomální 60S podjednotce.⁵ Haemanthamin a haemanthidin také vyvolávají apoptózu vnitřní mitochondriální cestou.⁸³

Tabulka 5: Příklady působení haemanthaminu na různé nádorové linie a jednu linii normálních buněk *in vitro*⁸⁴

Linie buněk	CEM	K562	MCF-7	HeLa	G-361	BJ
IC ₅₀ (μM)	2,1 \pm 0,4	3,4 \pm 1,6	8,1 \pm 3,3	7,0 \pm 2,2	3,7 \pm 0,4	2,7 \pm 0,2

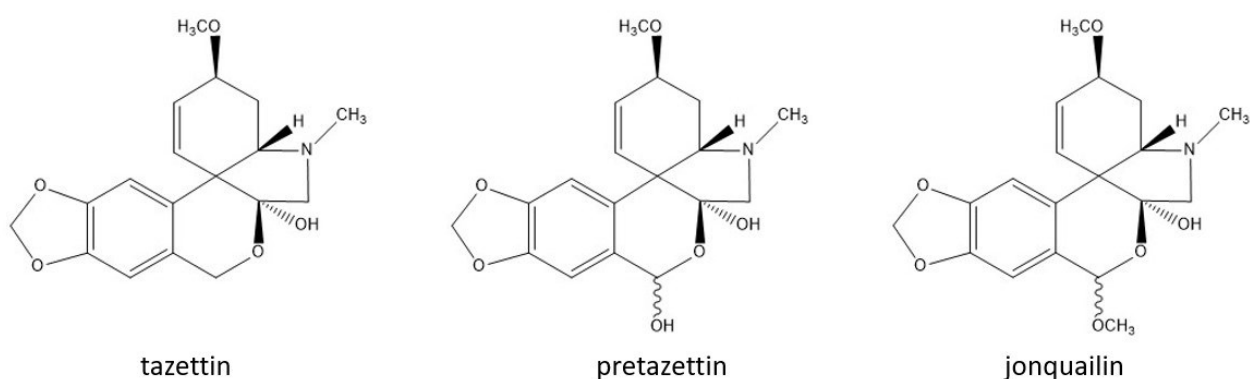
Z AmA narciklasinového typu mají nejslibnější cytotoxickou aktivitu látky narciklasin a pankratistatin.¹⁶ (Obrázek 15) Protinádorová aktivita narciklasinu je testována od 70. let 20. století. V americkém národním institutu pro výzkum rakoviny (NCI, national cancer institute) byly provedeny *in vitro* testy na 60 nádorových liniích a průměrná hodnota IC₅₀ byla 0,046 μM .⁸⁵ Mechanismus účinku narciklasinu je založen na inhibici proteosyntézy na ribosomální podjednotce 60S, dříve bylo uváděno, že působí antimitoticky.¹⁶ Narciklasin díky svým lipofilním vlastnostem představuje potenciální léčivo pro terapii nádorů mozku. Přestup přes hematoencefalickou bariéru byl dokázán v terapii xenograftového nádoru mozku imunokopromitovaných myší. Dále byl narciklasin testován na protirakovinné působení široké škály buněčných linií, kde vykazoval hodnoty IC₅₀ v desítkách nM, zároveň byl zaznamenán nižší toxický účinek vůči liniím normálních buněk.⁸⁵ Pankratistatin byl také testován na velkém množství buněčných linií *in vitro* i *in vivo* a vykazoval

cytotoxický účinek v koncentracích již okolo 1 μM .^{16,85} Zajímavý je synergický efekt pankratistatinu v koncentraci 0,5 μM s protirakovinným léčivem Tamoxifenem vůči buněčné linii MCF-7 lidského prsního karcinomu.⁸⁵



Obrázek 15: Neaktivnější látky narciklasinového typu

AmA tazettinového typu také mají určitou protinádorovou aktivitu. Tazettin je pouze mírně aktivní, ale jeho prekurzor pretazettin vykazuje velmi zajímavou aktivitu. Pretazettin je považován za jeden z neaktivnějších AmA vůči linii Molt4 (akutní lymfoblastická leukémie) a dále například působí na rozvinutou Rauscherovu leukémii, kde působí jak přímo proti růstu nádorových buněk, tak i antivirotický vůči viru Rauscherovy leukémie. Jedinou nevýhodou pretazettinu je jeho samovolné přeskupení do struktury tazettinu a tím ztráta účinku.⁵ Jonquailin je dalším cytotoxicky aktivním alkaloidem, který se vyznačuje působením na rakovinné linie rezistentní vůči konvenčním léčivům včetně MDR. Dokonce bylo popsáno synergické působení s paklitaxelem proti rakovině plic rezistentní vůči léčivům.⁷⁶



Obrázek 16: Cytotoxicky působící AmA tazettinového typu

Zbylé skupiny AmA nejsou příliš cytotoxicky zajímavé. Alkaloidy homolykorinového typu mírně inhibují jak *in vitro*, tak *in vivo* některé linie nádorových buněk, bohužel však vykazují

cytotoxické účinky i vůči nenádorovým liniím.¹⁶ O cytotoxickém působení montaninového typu alkaloidů nebyly nalezeny žádné informace.⁵ U nejdůležitějšího zástupce galanthaminového typu AmA galanthaminu bylo potvrzeno, že nevykazuje žádnou cytotoxickou aktivitu, což snižuje riziko potenciálních nežádoucích účinků v klinickém využití.¹⁶

3.4.3 Antimalarická aktivita

Malárie je komárem přenášené infekční onemocnění lidí a jiných zvířat způsobená prvoky rodu *Plasmodium*.⁸⁶ Patří mezi nejčastější chronické infekce, které se vyskytují především na venkově a v chudých čtvrtích měst tropických a subtropických oblastí po celém světě. Jsou považovány za důležitý zdravotní a sociálně-ekonomický problém v kterékoli oblasti jejich endemického výskytu. Působení základních léčiva používaných v současné době (chlorochin a deriváty artemisinu) není zcela uspokojivé kvůli nedostatečné účinnosti a také toxicitě.⁸⁷

Nejznámější plasmodia, která kromě zvířat jsou schopna infikovat i člověk, jsou *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*.⁸⁸ Životní cyklus plasmodií je složitý. Přenašeč infekce je samička komára rodu *Anopheles* sp., která přenáší plasmodia ve stádiu sporozoitů. Sporozoité napadají játra, kde dochází k vývoji plasmodií. Ve formě merozoitů se uvolňují do krve, napadají erythrocyty, posléze dochází k rozkladu erythrocytů.⁸⁹ Erythrocytární stádium se projevuje klinicky anémií, horečkou, zimnicí, nevolností a ve vážných případech způsobuje kóma a smrt.⁹⁰

Aktivita AmA vůči plasmodiím byla studována na krevních stádiích na konvenční léčbu citlivých (FCR3, NF54, W-2) i na konvenční léčbu resistantních kmenů (K1, D-6) *P. falciparum*. Některé studie byly provedeny i na jaterních stádiích původce myší malárie *P. berghei*. Jaterní stádium se klinicky neprojevuje a mohlo by být ideálním cílem pro očkování, nebo pro profylaktické působení.⁷

Vysokou aktivitu vykazují lykorinové deriváty, jejich působení bylo testováno na kmenu FCR3 a K1. Zkoumány byly tyto látky: 1,2-di-*O*-butanoyllykorin, 1-*O*-propanoyllykorin, 1-*O*-(3'*R*)-hydroxybutanoyllykorin a 1-*O*-(3'*S*)-hydroxybutanoyllykorin, jejich hodnoty antimalarického působení jsou $IC_{50} = 0,67; 0,37; 0,60$ a $0,62 \mu\text{g/ml}$ pro kmen K1 a $IC_{50} = 0,53; 0,30; 0,45$ a $0,49 \mu\text{g/ml}$ pro kmen FCR3 (hodnoty IC_{50} jsou uvedeny ve stejném pořadí, jako lykorinové deriváty, ke kterým patří).⁹¹ Dalším lykorinovým derivátem, který vykazuje antiplasmodiální aktivitu, je (+)-5,6-dehydrolykorin s hodnotami IC_{50} $1,9 \mu\text{M}$ pro W-2 kmen a $2,3 \mu\text{M}$ pro kmen D-6 *P. falciparum*, jeho aktivita je přibližně čtyřikrát vyšší než aktivita standardu (chlorochinu).⁹⁰

Díky syntéze 27 derivátů lykorinu a jejich určení aktivity vůči kmenům *P. falciparum* citlivým na chlorochin bylo možné stanovit některé souvislosti mezi strukturou a účinkem. Nejlepší aktivitu proti původci malárie vykazovali deriváty lykorinu, které obsahovaly volné hydroxylové skupiny na C-1 a C-2 nebo tyto polohy byly esterifikovány za vzniku acetátu nebo isobutyrátu. Přítomnost dvojná vazby mezi C-2 a C-3 je také nezbytná pro jejich účinnost.⁹²

Alkaloidy montaninového typu nangustin a pankracin byly testovány na působení vůči kmenu K1 a NF54. Pankracin vykazoval slabou aktivitu, hodnota IC_{50} byla 0,75 $\mu\text{g/ml}$ pro kmen K1 a pro kmen NF54 0,70 $\mu\text{g/ml}$, v porovnání s chlorochinem a artemisinem, které jsou brány jako standard. Naopak angustin byl označen u obou kmenů jako neaktivní.⁹³

Dále aktivitu vůči plasmodiím vykazují alkaloidy heamanthaminového typu, u kterých pro dosažení vysoké aktivity je důležitá dvojná vazba mezi C-1 a C-2 a volná hydroxylová skupina v poloze C-11.⁹² Krininový typ alkaloidů vykazuje mírnou antimalarickou aktivitu vůči erytrocytárním stádiím a homolykorinový typ bohužel nevykazuje aktivitu žádnou.⁹⁰

Působení na jaterní stádium plasmodia bylo studováno na alkaloidech izolovaných z *Narcissus poeticus* cv. PINK PARASOL, mezi kterými bylo pět látek homolykorinového typu, čtyři látky galanthaminového typu, dva deriváty haemanthaminu, jeden galanthindolový a lykorinový alkaloid a dva nezařazené alkaloidy. Avšak žádná z těchto látek nevykazovala detekovatelnou aktivitu.⁷

3.5 NARCISSUS CV. PROFESSOR EINSTEIN



Obrázek 17: *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN⁹⁴

Pro fytochemickou studii byl zvolen na základě předešlé práce provedené na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. V tomto kultivaru bylo identifikováno zajímavé spektrum alkaloidů a alkaloidní extrakt vykazoval relativně dobrou aktivita vůči lidské butyrylcholinesteráze ($IC_{50}(\text{HuBuChE}) = 49,99 \pm 5,38 \mu\text{g/ml}$).⁸ Dalším důvodem byla

možnost získat surovinu pro izolaci v dostatečném množství díky komerčnímu prodeji cibulí *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN.

Kultivar *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN je řazen do skupiny 2 (narcisy s velkou korunkou). Tyto narcisy se vyznačují korunkou, která má délku více než jednu třetinu délky okvětních lístků, ale není delší než okvětní lístek celý. *N.* cv. PROFESSOR EINSTEIN nese jeden květ na stonku, který má bílé okvětní lístky a červenooranžovou korunku popsané délky. Charakteristická je také jeho vůně.⁹⁴

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ CHEMICKÉ LÁTKY

4.1.1 Rozpouštědla

Aceton, p.a (Penta)
Amoniak, p.a. (Penta)
Benzin, p.a. (Penta)
Cyklohexan, p.a. (Penta)
Diethylether, p.a. (Penta)
Ethanol, p.a. (Penta)
Ethylacetát, p.a. (Penta)
Chloroform, p.a. (Penta)
Methanol, p.a. (Penta)
Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)
Toluen, p.a. (Penta)

4.1.2 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková (Penta)
Síran sodný, bezvodý (Penta)
Uhličitan sodný (Penta)

4.1.3 Mobilní fáze (MF) pro sloupcovou chromatografii

Sloupcová chromatografie byla prováděna technikou stupňovité eluce. Postupně byla zvyšována polarita MF. Nejprve byla použita směs benzínu (Bz) a chloroformu (CHCl_3) (v poměru od 70:30 do 20:80), dále byl využit čistý chloroform, který byl následován směsí chloroformu a ethanolu (EtOH) (v poměru od 99:1 do 50:50) a na závěr byl použit čistý ethanol. Jejich přehled je uveden v Tabulka 6.

Tabulka 6: Přehled MF využitých při sloupcové chromatografii

pořadí	MF	koncentrace (% w/w)
1.	Bz : CHCl ₃	70 : 30 – 20 : 80, poměr byl měněn po 5 %
2.	CHCl ₃	100
3.	CHCl ₃ : EtOH	99 : 1 – 50 : 50, poměr byl měněn nerovnoměrně, bylo použito 99%, 98%, 95%, 90%, 80% a 50% CHCl ₃
4.	EtOH	100

4.1.4 Mobilní fáze pro preparativní tenkovrstvou chromatografii (TLC)

Izolace alkaloidů z frakce 26 byla prováděna pomocí preparativní TLC. Tato frakce byla získána jako polárnější při dělení sumárního alkaloidního extraktu pomocí sloupcové chromatografie. Vzhledem k již zmíněné vyšší polaritě frakce byla pro její další dělení vybrána MF složená nejprve z ethylacetátu, methanolu a diethylaminu; dále z cyklohexanu, acetonu a amoniaku; jako třetí byla použita MF ve složení toluen, aceton, ethanol a amoniak a poslední MF byla směs toluenu, ethylacetátu a diethylaminu. Přesné složení MF pro preparativní TLC je uvedeno v Tabulka 7.

Tabulka 7: MF použité při preparativní TLC

MF	poměr
EtOAc : MeOH : DEA	8 : 1 : 1
cHx : Aceton : NH ₃	50 : 50 : 1
To : Aceton : EtOH : NH ₃	40 : 40 : 6 : 2
To : EtOAc : DEA	15 : 75 : 10

4.1.5 Detekční činidlo pro detekci alkaloidů na deskách pro TLC

Pro vizualizaci alkaloidů po provedení tenkovrstvé chromatografie bylo použito Dragendorffovo činidlo. Jeho složení a příprava jsou uvedeny v Tabulka 8.

Tabulka 8: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁹⁵

roztok A:	roztok B:	vlastní činidlo:
1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého 20 g kyseliny vinné 80 ml vody	16 g jodidu draselného 40 ml vody	5 ml kyseliny vinné 50 ml vody 5 ml zásobního roztoku
zásobní roztok:		
smíšené roztoky A a B v poměru 1 : 1 (takto připravený může být uchováván v lednici)		

4.1.6 Adsorbenty pro chromatografii

Sloupcová chromatografie: oxid hlinitý (Al_2O_3) deaktivovaný 6 % vody

TLC: lité desky: silikagel F254

komerční desky: Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ s UV indikátorem

4.2 POSTUPY A TECHNIKY POUŽÍVANÉ PŘI IZOLACI ALKALOIDŮ

4.2.1 Destilace

Destilace byla využita k přečištění většiny rozpouštědel, která byla použita během izolace a detekce alkaloidů. Nejprve byl jímán destilační předek, poté bylo jímáno vlastní rozpouštědlo při jeho tabelární teplotě varu. Předestilovaná rozpouštědla byla uchovávána v hnědých lahvích.

4.2.2 Extrakce

Pro izolaci alkaloidů z rostlinného materiálu byla použita extrakce. Před samotným extrakčním procesem byly cibule rozdrceny pro snadnější uvolnění zkoumaných látek. Rozmělněný rostlinný materiál byl za varu extrahován ethanolem (96% v,v). Po extrakci byly filtrací přes vliselín odstraněny mechanické nečistoty. Tímto způsobem byl připraven sumární ethanolický extrakt.

Dále byly extrakční postupy využity pro čištění primárního extraktu od látek tukové povahy a nealkaloidních složek. Použita byla extrakce kapaliny kapalinou, kde organickou fází byl chloroform (CHCl_3) a ether (Et_2O). Rozdělování mezi vodnou a organickou fází se řídilo acidobazickými vlastnostmi alkaloidů a ustalováním lipofilně-hydrofilní rovnováhy.

4.2.3 Chromatografie sloupcová

Pro základní rozdělení směsného extraktu alkaloidů byla použita sloupcová chromatografie. Stacionární fáze (SF) tvořil oxid hlinitý (Al_2O_3), který byl na kolonu nalit v suspenzi rozpouštědel (CHCl_3 : bz 30 : 70), kterými poté byla zahájena eluce. Sumární alkaloidní extrakt byl aplikován na kolonu ve formě roztěru. Roztěr byl připraven naadsorbováním extraktu rozpuštěného v dostatečném množství směsi rozpouštědel na Al_2O_3 a následně odpařením rozpouštědel.

Počáteční mobilní fáze byla vybrána podle retenčního faktoru, zvolena byla směs chloroformu a benzínu, jak je uvedeno v předešlém odstavci. Poté se polarita mobilní fáze postupně zvyšovala. Eluát byl jímán do baněk po frakcích o objemu 250 ml. Z každé z těchto frakcí byl odebrán vzorek, který byl kontrolován pomocí analytické TLC, na jejímž základě byly frakce spojovány do podfrakcí viz Tabulka 10 v kapitole „4.4 Sloupcová chromatografie sumárního alkaloidního extraktu“.

4.2.4 Chromatografie tenkovrstvá

Během izolace byla použita preparativní a analytická chromatografie na tenké vrstvě. Pro preparativní TLC byly využity dva typy desek, desky lité a komerční. Větší množství extraktu bylo děleno na litých deskách, jejichž kapacita byla přibližně 5 mg/cm. Komerční desky s kapacitou 1 mg/cm byly používány na dělení menšího množství směsi a na kontrolní analytické TLC během celé separace.

Lité desky byly připravované před preparací přímo v laboratoři takto: Skleněné desky byly nejprve omyty vodou a poté odmaštěny chloroformem. Přichystané desky byly pokryty rovnoměrnou vrstvou silikagelu suspendovaného ve vodě. Schnutí jednotlivých desek probíhalo při teplotě v laboratoři a trvalo minimálně 24 hodin. Komerční desky byly použity typu Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ s UV indikátorem.

Vzorek byl nanášen na desky pomocí chromatografického pera nebo kapiláry podle typu TLC. Desky byly následně vyvíjeny ve chromatografických komorách nasycených vybranými MF. Konkrétní MF byly voleny na základě předpokládané polarit izolovaných alkaloidů a podle předešlých zkušeností.

4.2.5 Odpařování rozpouštědel z extraktu

Pro odpařování rozpouštědel byly využity dva typy odparek s různou objemovou kapacitou. První byla poloprovozní vakuová odparka Laborta 20 Heidolph, která byla použita k odpařování sumárního ethanolického extraktu na vodní lázni.

Druhou odparkou byla odparka Laborta 4000 Heidolph. Na ní byly odpařovány jednotlivé frakce získané sloupcovou chromatografií a dále také frakce získané preparativní tenkovrstvou chromatografií.

4.2.6 Detekce alkaloidů

Detekční činidla

Mayerovo činidlo

Mayerovo činidlo bylo využito pro důkaz alkaloidů v kyselém vodném roztoku při vytřepávání jako kontrola.⁹⁶

Dragendorffovo činidlo

Dragendorffovo činidlo bylo používáno pro detekci alkaloidů na chromatogramu vzniklého tenkovrstvou chromatografií. Podstatou důkazu alkaloidů, je vznik sytě oranžové sraženiny, kterou tvoří komplexní sůl činidla a alkaloidu.^{96,97}

UV detekce

UV detekce byla využita pro zobrazení alkaloidů po tenkovrstvé chromatografii. Detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Principem detekce bylo potlačení fluorescence a vznik tmavých skvrn v místech, kde se nacházela separovaná látka. Uvedený způsob detekce byl umožněn indikátorem, který byl součástí silikagelu na komerčních deskách.⁹⁸

4.3 PŘÍPRAVA SMĚSNÉHO ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU

4.3.1 Biologický materiál

Pro izolaci alkaloidů byly využity čerstvé cibule *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, které byly zakoupeny u firmy Lukon (Sadská, Česká republika). Ověření pravosti provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal CSc. na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. V herbáriu této katedry byl také uložen dokladový vzorek s označení CUFPH-16130/AL-447.

4.3.2 Příprava ethanolického extraktu

Pro izolaci alkaloidů bylo k dispozici 34,3 kg čerstvých cibulí. V první fázi byly cibule *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN rozemlety v mlýnku a následně rozmixovány ručním mixérem²³. Poté byla surovina rozdělena do dávek s hmotností 1,2 kg. Nakonec byla provedena extrakce za horka (2× 30 min) veškerého rostlinného materiálu.

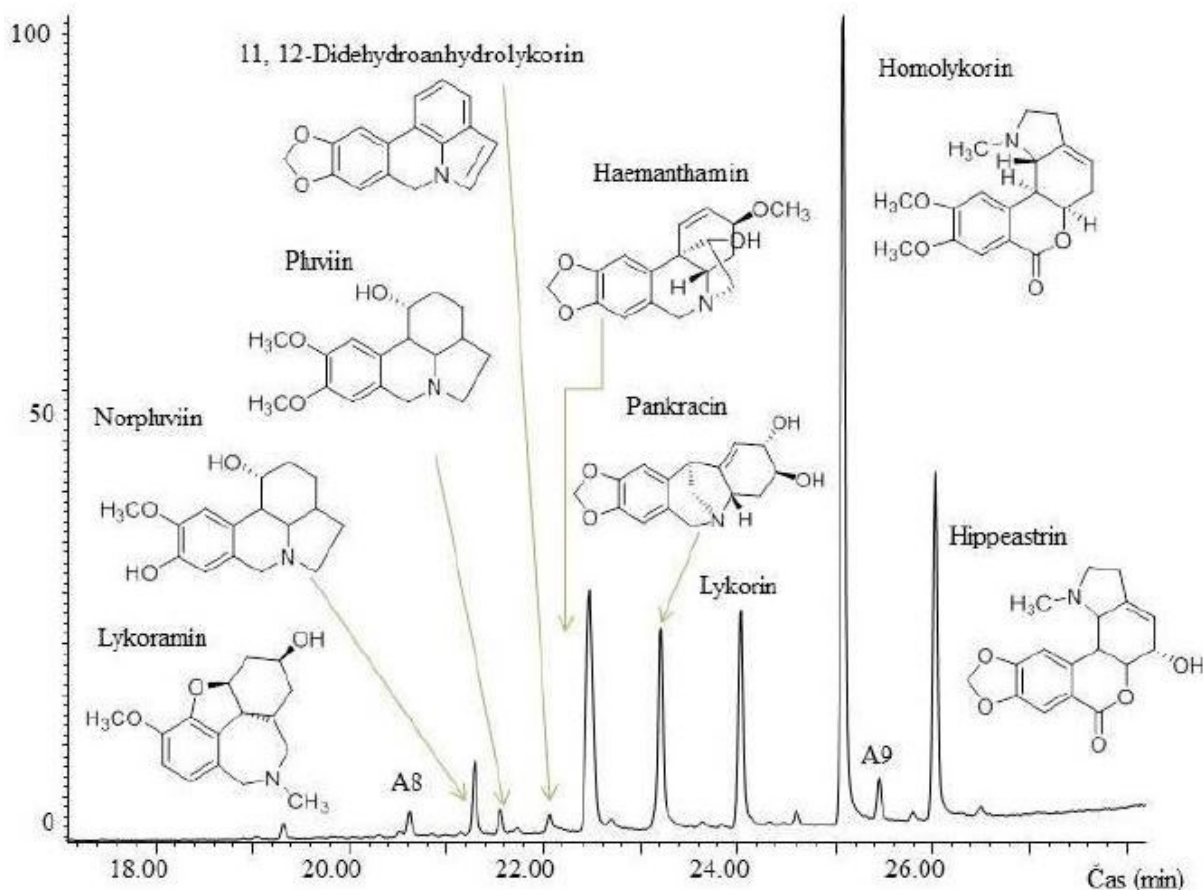
4.3.3 Čištění sumárního alkaloidního extraktu

První fáze vytřepávání

Odparek o hmotnosti 638 g byl rozpuštěn přibližně v 1,5 l kyseliny chlorovodíkové (HCl, 5%), dvakrát filtrován přes vliselín a destilovanou vodou zředěn na objem 4,5 l o pH 1. Poté bylo přistoupeno k odstranění tuků vytřepáváním kyselé vodné fáze s diethyletherem (Et₂O, 2× 4 l). Následnou alkalizací vodné fáze pomocí uhličitanu sodného (Na₂CO₃, 10%) na pH 10 bylo umožněno zpětné vytřepávání volných bází alkaloidů do organické fáze, která byla tvořena chloroformem (CHCl₃, 4× 4 l). Kontrola přechodu alkaloidů byla prováděna pomocí Mayerova činidla, kdy za přítomnosti solí alkaloidů vznikají ve vodném roztoku bílé zbarvené sraženiny. Výsledkem první fáze čištění byla, po odpaření extrakčního činidla, hnědá hmota sirupovité konzistence (51,44 g).

Druhá fáze vytřepávání

Sumární alkaloidní extrakt byl ještě jednou přečištěn pomocí vytřepávání. Extrakt byl rozpuštěn v 2% HCl (1030 ml), aby vznikl 5% alkaloidní roztok, který byl přefiltrován přes křemelinu, zbytky byly promyty destilovanou vodou. Tím bylo získáno přibližně 1,5 l vodné fáze, který byla nadvakrát odtučněna Et₂O (2× 0,5 l) a následně alkalizována 10% Na₂CO₃ (2× 230 ml). Jako organické fáze, do kterých byly alkaloidy zpětně vytřepávány, byly využity diethylether (Et₂O, 5× 500 ml) a poté ještě chloroform (CHCl₃, 8× 500 ml). Chloroform byl zvolen pro vytřepávání po kontrolní reakci s Mayerovým činidlem. Jako sušidlo organické fáze byl použit bezvodý síran sodný (Na₂SO₄), kterým byly odstraněny zbytky vodné fáze. Poté byl Na₂SO₄ z alkaloidního roztoku odstraněn filtrací přes filtrační papír. Po odpaření rozpouštědel a spojení extraktů bylo získáno 31,73 g alkaloidního extraktu. Alkaloidní extrakt byl podroben analýze pomocí plynové chromatografie spojené s hmotností spektrometrií (GC-MS) za účelem identifikace hlavních obsahových látek (Obrázek 18).



Obrázek 18: Chromatogram alkaloidního extraktu z cibulí *Narcissus* cv. *PROFESSOR EINSTEIN*⁸

4.4 SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE SUMÁRNÍHO ALKALOIDNÍHO EXTRAKTU

Sloupcová chromatografie byla prováděna na skleněné koloně o průměru 5,8 cm. V prvním kroku byla připravena stacionární fáze (SF), která byla aplikovaná do kolony na vat. Byla tvořena oxidem hlinitým (Al_2O_3 , 2100 g), který byl 12 hodin sušen při teplotě 200 °C a deaktivován 6 % vody. Přenesení na kolonu bylo prováděno v suspenzi s chloroformem a benzínem. Směs rozpouštědel byla tvořena ze 30 % CHCl_3 a ze 70 % benzínem a stejná směs byla použita i pro zahájení chromatografie. Mrtvý objem kolony byl 1570 ml.

Na stacionární fázi byl ve druhém kroku aplikován směsný alkaloidní extrakt. Nejprve bylo pro případnou kontrolu odebráno 100 mg alkaloidního extraktu stranou. Ze zbylého množství byl vytvořen roztěr v poměru 1 : 4 (w/w) s oxidem hlinitým (Al_2O_3 , 124 g). Před adsorpcí na sorbent byl extrakt rozpuštěn ve směsi dichlormethanu (CH_2Cl_2) a chloroformu (CHCl_3). Tento roztok byl naadsorbován na připravený sorbent. Poté byla odstraněna rozpouštědla vysušením a roztěr byl nanesen na kolonu.

MF byla vybírána podle retenčního faktoru (RF) z různých poměrů chloroformu a benzínu. Jako nejideálnější se ukázal poměr 40 : 60 (CHCl₃ : bz) s RF 0,175. Nakonec však byla jako počáteční MF vybrána méně polární s 30% koncentrací chloroformu. Polarita mobilních fází byla postupně zvyšovala od směsi benzínu a chloroform (od 30 : 70 do 80 : 20), přes čistý chloroform, směs chloroformu a ethanolu (od 1 : 99 po 50 : 50) až po čistý ethanol (viz Tabulka 10).

V průběhu chromatografie byly jímány jednotlivé frakce o objemu 250 ml. Celkový počet takto získaných frakcí byl 493. První z nich byly testovány pouze na přítomnost alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla. Frakce s detekovanými alkaloidy byly dále podrobeny analytické TLC za využití 6 různých mobilních fází (Tabulka 9). Na základě výsledků tenkovrstvé chromatografie byly frakce sloučeny do 27 nově vzniklých podfrakcí. Poté byla provedena souhrnná analytická chromatografie pro frakce 1 až 15, kdy MF tvořil toleun, ethylacetát a diethylaminu, a pro frakce 13 až 27 vyvíjené ve směsi ethylacetátu, methanolu a diethylaminu. (Obrázek 19) Nakonec byla provedena GC-MS analýza každé frakce. Chromatogram frakce 26, která byla použita pro izolaci alkaloidu v čistém stavu, je uveden na Obrázek 20.

Tabulka 9: MF pro analytické TLC a jednotlivé frakce v nich vyvíjené

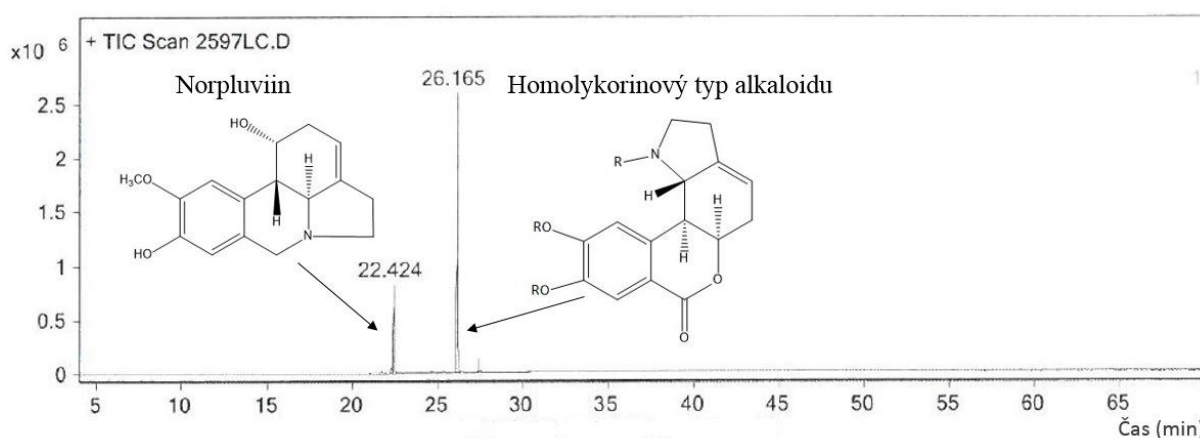
MF pro analytické TLC základních frakcí		MF pro souhrnné TLC spojených frakcí	
Frakce	MF	Frakce	MF
1 – 137	Alkaloidy nedetekovány	1 – 15 13 – 27	To : EtOAc : DEA (7 : 2 : 1) EtOAc : MeOH : DEA (5 : 4 : 1)
137 – 204	To : EtOAc : DEA (7 : 2 : 1)		
205 – 272	To : EtOAc : DEA (45 : 45 : 10)		
273 – 372	To : EtOAc : DEA (15 : 75 : 10)		
373 – 376	EtOAc : DEA (9 : 1)		
377 – 416	EtOAc : MeOH : DEA (8 : 1 : 1)		
417 – 493	EtOAc : MeOH : DEA (5 : 4 : 1)		

Tabulka 10: Přehled původních frakcí, nově vzniklých frakcí, využitých mobilních fází a výtěžků jednotlivých frakcí

Nová frakce	Spojené frakce	Mobilní fáze	Množství (mg)
-	1–110	Bz : CHCl ₃ (70 : 30) Bz : CHCl ₃ (65 : 35) Bz : CHCl ₃ (60 : 40) Bz : CHCl ₃ (55 : 45) Bz : CHCl ₃ (50 : 50)	0
1	111–145	Bz : CHCl ₃ (45 : 55) Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	10
2	146–150	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	20
3	151–158	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	30
4	159–173	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	70
5	174–177	Bz : CHCl ₃ (40 : 60)	50
6	178–187	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	1590
7	188–191	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	1690
8	192–195	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	300
9	196–199	Bz : CHCl ₃ (35 : 65)	80
10	200–215	Bz : CHCl ₃ (35 : 65) Bz : CHCl ₃ (30 : 70)	270
11	216–221	Bz : CHCl ₃ (30 : 70)	170
12	222–297	Bz : CHCl ₃ (30 : 70) Bz : CHCl ₃ (25 : 75) Bz : CHCl ₃ (20 : 80)	3160
13	298–324	Bz : CHCl ₃ (20 : 80) CHCl ₃ (100) CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	310
14	325–329	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	183
15	330–332	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	828
16	333–336	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	616
17	337–357	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	1206
18	358–373	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1426
19	374–381	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1388
20	382–386	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	1134
21	387–397	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	585
22	398–402	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2) CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	127
23	403–408	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	182
24	409–429	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5) CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	936
25	430–466	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10) CHCl ₃ : EtOH (80 : 20)	6543
26	467–478	CHCl ₃ : EtOH (80 : 20) CHCl ₃ : EtOH (50 : 50)	672
27	479–493	CHCl ₃ : EtOH (50 : 50) EtOH (100)	941
Celkové množství: 24,517 g			



Obrázek 19: Kontrolní analytické TLC všech 27 frakcí, které byly získány sloupcovou chromatografií. Zvýrazněná je frakce 26, která byla dále zpracovávána.



Obrázek 20: Souhrnný MS-EI chromatogram frakce 26

4.5 PREPARATIVNÍ TENKOVrstvá CHROMATOGRÁFIE

Za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu byla vybrána polárnější frakce číslo 26 o hmotnosti 672 mg. Před vlastní přípravou chromatografických desek byla zvolena vyvíjecí soustava. Podle vlastností dané frakce byly navrženy dvě MF. První byla směsí ethylacetátu a diethylaminu (EtOAc : DEA 9 : 1) a druhá byla směs ethylacetátu, methanolu a diethylaminu (EtOAc : MeOH : DEA 8 : 1 : 1). Vhodná soustava byla vybrána na základě kvality rozdělení jednotlivých alkaloidů na dvou kontrolních TLC. Jako úvodní MF byla zvolena směs se složením EtOAc, MeOH, DEA.

Celý vzorek byl rozpuštěn v malém množství směsi EtOH a CHCl_3 (1 : 1), pomocí chromatografického pera byl tekutý extrakt kvantitativně nanesen na 16 litých desek (množství vzorku přibližně 45 mg na desku). Vyvíjení bylo prováděno v komorách sycených 20 až 30 minut mobilní fází a probíhalo dvakrát. Po každém vyvinutí byly všechny desky sušeny v digestoři a vzniklé zóny byly detekovány pomocí UV lampy a Dragendorffova činidla. Zjištěny byly 4 zóny (26/1 až 26/4).

Každá zjištěná zóna alkaloidů byla pod UV světlem označena, podle označení z každé desky vyškrabána společně se silikagelem. Extrakty byly vymyty z adsorbentu na kolonce na vrstvě křemeliny pomocí směsi EtOH a CHCl₃ (1 : 1). Rozpouštědla z extraktu byla odpařena na vakuové odparce. Získané podfrakce se stejným označením jako zjištěné zóny byly kvantitativně převedeny do malých baněk a uzavřeny zátkou nebo hliníkovou folií. Hmotnosti jednotlivých podfrakcí jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 11).

Pro další zpracování byly vybrány podfrakce 26/2 a 26/3 a jejich dělení probíhalo obdobným způsobem jako preparativní chromatografie celá frakce č. 26.

Tabulka 11: Frakce získané dělením základní frakce č. 26 a jejich hmotnosti

Podfrakce	26/1	26/2	26/3	26/4
Hmotnost (mg)	93,7	59,5	434,5	74,4



Obrázek 21: Kontrolní chromatogram čtyř podfrakcí, které byly vytvořeny dělením frakce 26. Podle tohoto chromatogramu byly vybrány frakce pro následné dělení.

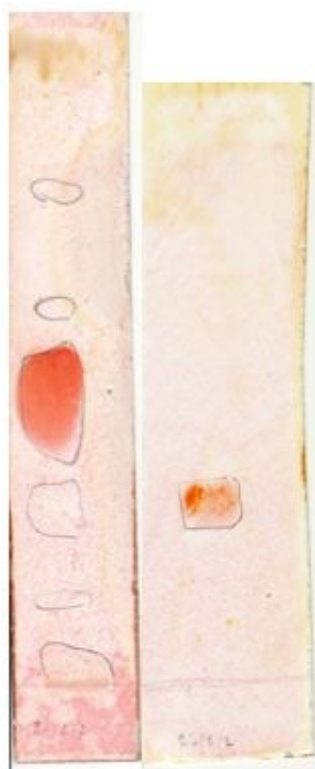
4.5.1 Dělení podfrakce 26/2

Na vyvíjení podfrakce 26/2 o hmotnosti 59,5 mg byla použita jako MF směs CHx : Aceton : NH₃ (50 : 50 : 1). V této soustavě byly desky s naneseným vzorkem vyvíjeny 3× a byly

tak získány 2 linie, 26/2/1 a 26/2/2, jejich hmotnosti jsou opět shrnuty v následující tabulce (Tabulka 12). Majoritní podfrakce 26/2/2 se zdála být alkaloidně čistá. Proto dalším krokem bylo odstranění nečistot jiné povahy na komerčních deskách pomocí soustavy se složením EtOAc : MeOH : DEA (8 : 1 : 1). Díky tomu bylo získáno 26,5 mg čisté látky, která byla podrobena GC-MS.

Tabulka 12: Podfrakce vzniklé z frakce 26/2 po vyvinutí soustavou cHx : aceton : NH₃ (50 : 50 : 1)

26/2	59,5 mg	26/2/1	4,3 mg		
		26/2/2	40,1 mg	GC 109	čistá l. 26,5 mg



Obrázek 5: Kontrolní TLC podfrakce 26/2/2, před přečištěním a po něm, vyvinená v soustavě EtOAc : MeOH : DEA 8 : 1 : 1

4.5.2 Dělení podfrakce 26/3

Frakce 26/3 byla rozdělena na litých deskách v soustavě cHx : aceton : NH₃ (50 : 50 : 1) na tři podfrakce. Majoritní podfrakce 26/3/2 o hmotnosti 218,9 mg byla opakovaně dělena pomocí MF složené z EtOAc : MeOH : DEA (8 : 1 : 1). Vzniklo tak několik dalších podfrakcí z nichž byla nejdůležitější hlavní podfrakce 26/3/2/2/2 s hmotností 151,4 mg, která se jevila jako alkaloidně čistá. Tato frakce byla pomocí analytické TLC porovnána s frakcí 26/2/2 a byla zjištěna shodnost obou

frakcí. Frakce byly spojeny v jednu o celkové hmotnosti 179 mg. Nová frakce byla přečištěna, tím bylo získáno 133 mg čisté látky s označením 26-2, která byla podrobena strukturní analýze.

Dělením frakce 26/3/3 (její hmotnost nebyla zaznamenána) pomocí MF se složením cHx, aceton a NH₃ (50 : 50 : 1). Vznikla řada podfrakcí, většina z nich však neobsahovala žádné alkaloidy. Pouze podfrakce 26/3/3/6/1 a 26/3/3/6/2 alkaloidy obsahovaly, ty se však pro účely této práce nepodařilo získat v čistém stavu. Výtěžky všech frakcí jsou zaznamenány v Tabulka 13.

Tabulka 13: Přehled podfrakcí, které vznikly dělením frakce 26/3

26/3 434,5 mg	26/3/1 46,3 mg				
	26/3/2 218,9 mg	26/3/2/1 15,0 mg			
		26/3/2/2 197,0 mg	26/3/2/2/1 26,4 mg		
			26/3/2/2/2 151,4 mg	shoda s 26/2/2	
	26/3/3	26/3/3/1 5,0 mg	nejsou alkaloidy		
		26/3/3/2	nejsou alkaloidy		
		26/3/3/3 14,0 mg	nejsou alkaloidy		
		26/3/3/4 19,0 mg	fenolické látky – shoda s 26/3/3/6/3		
		26/3/3/5 19,0 mg	nejsou alkaloidy		
		26/3/3/6 98,0 mg	26/3/3/6/1 7,0 mg		
			26/3/3/6/2 32,0 mg		
	26/3/3/6/3 42,0 mg		fenolické látky – shoda s 26/3/3/4		

4.6 STRUKTURNÍ IDENTIFIKACE IZOLOVANÉHO ALKALOIDU

4.6.1 Plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)

Pro základní predikci struktury izolované látky byla aplikována GC-MS s elektronovou ionizací (EI) 70 eV. Stanovení bylo provedeno na plynovém chromatografu 7890A GC System Agilent Technologies s kolonou HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Průběh teplotního režimu byl následující: od 100 °C do 180 °C stoupala teplota rychlostí 15 °C/min. Poté byla teplota stabilizována jednu minutu při 180 °C. Dále od 180 °C do 300 °C stoupala teplota rychlostí 5 °C/min, po kterém opět došlo ke stabilizaci teploty 300 °C patnáct minut. Nosným plynem bylo helium, jehož rychlost byla 0,8 ml/min, Nastříkovaný objem vzorku byl 1 μ l, split 1:10 a nástřik probíhal při teplotě 280 °C.

4.6.2 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

Za účelem získání molekulové hmotnosti (M_m) izolované látky byla také použita metoda ionizace elektrosprejem (ESI). Měření bylo prováděno na spektrometru LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném módu, jako analyzátor byla zvolena iontová past. Kolizní energie během měření byla 40 eV. Alkaloid byl rozpuštěn v MeOH, vzniklý roztok o koncentraci 1 mg/ml byl zaváděn přímo na sondu. Chromatogramy získané měřením GC-MS i metodou ESI byly porovnány s údaji v knihovně spekter NIST, literaturou a spektry standardů získaných na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK.

4.6.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Struktura byla určena také pomocí nukleární magnetické rezonance, byla vytvořena ^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektra izolovaného alkaloidu. Měření bylo prováděno na spektrometru Bruker Avance DRX 500 Spectrometer operation. Pracovní frekvence spektrometru byla 500 MHz (pro jádra ^1H) a 125 MHz (pro jádra ^{13}C), vzorek izolované látky byl rozpuštěn v deuteriochloroformu (CDCl_3) a měření probíhalo při teplotě 25 °C. Spektrum udávalo chemický posun δ (pars per milion, ppm), multiplicitu jednotlivých segmentů (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplot) a interakční konstantu J (Hz). Standardy, ke kterým byly vztahovány hodnoty ze spektra testované látky, byly tetramethylsilan (TMS; 7,26 ppm) pro ^1H -NMR a signál solventu (77,0 ppm) pro ^{13}C -NMR.

4.6.4 Optická otáčivost

Stanovení optické otáčivosti bylo provedeno na polarimetru P3000 při teplotě 25 °C. Vzorek látky byl měřen v jeho chloroformovém roztoku. Specifická otáčivost byla poté vypočtena podle následujícího vzorce:

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

t = teplota měření [°C]; D = D-linie sodíkového světla ($\lambda = 589,3$ nm); α = naměřený úhel otočení [°]; c = koncentrace měřeného alkaloidu [g. 100 ml⁻¹]; l = délka kyvety [dm]

4.7 SPEKTRUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ

4.7.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

Měření inhibiční aktivity bylo prováděno na Katedře farmaceutické botaniky, FaF UK a zabýval se jím prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Stanovení bylo provedeno Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB). Studována byla schopnost testované látky inhibovat lidskou acetylcholinesterasu (HuAChE), která byla získána hemolýzou lidských erytrocytů, a lidskou butyrylcholinesterasu (HuBuChE) obsaženou v plazmě. Poklesy aktivit HuAChE a HuBuChE byly vypočítány z nárůstu absorbance za 1 min. Ze získaných výsledků byly pomocí nelineární regrese v programu GraphPAD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce: GraphPAD 56 Software, San Diego, Ca, USA) určeny hodnoty IC₅₀ (koncentrace studované látky, která je schopna inhibovat cholinesterasu z 50 %). Standardy, se kterými byla porovnána aktivita testované látky jsou: galanthamin, huperzin, berberin a eserin. Jejich aktivity jsou uvedeny v kapitole „5. Výsledky“ spolu s aktivitou izolované látky. Úplný popis postupu je uveden v publikaci Ellman et al.,1961.⁹⁹

4.7.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase (POP)

Inhibiční aktivita vůči prolyl oligopeptidase byla měřena ve spolupráci s Centrem pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Jedná se, stejně jako u metody použité na stanovení aktivity vůči cholinesterasám, o metodu spektrofotometrickou, kde vznik p-nitroanilinu je přímo úměrný aktivitě POP. Měření bylo provedeno na microplate ELISA readeru EL800. Schopnost izolované látky inhibovat POP byla vyjádřena jako hodnota IC₅₀. Standardy, ke kterým byla hodnota IC₅₀ (POP) vztahována, jsou bajkalin, berberin a Z-Pro-prolinal,

jejich aktivita je opět uvedena v části „5. Výsledky“ spolu s hodnotou izolované látky. Podrobný popis využití metody testování inhibiční aktivity POP je uveden v díle Cahlíková et al., 2013.⁴⁹

4.7.3 Stanovení inhibice glykogen synthasy kinasy-3 β (GSK-3 β)

Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β bylo provedeno v rámci stáže Erasmus+ Mgr. Daniely Hulcové, Ph.D. ve spolupráci s pracovníky z Department for Life Quality Studies University of Bologna. Podrobný popis studie je uveden v publikaci Hulcová et al. (2018)²² a metoda stanovení je popsána v práci Baki a et al. (2007)¹⁰⁰.

4.7.4 Stanovení cytotoxicity *in vitro*

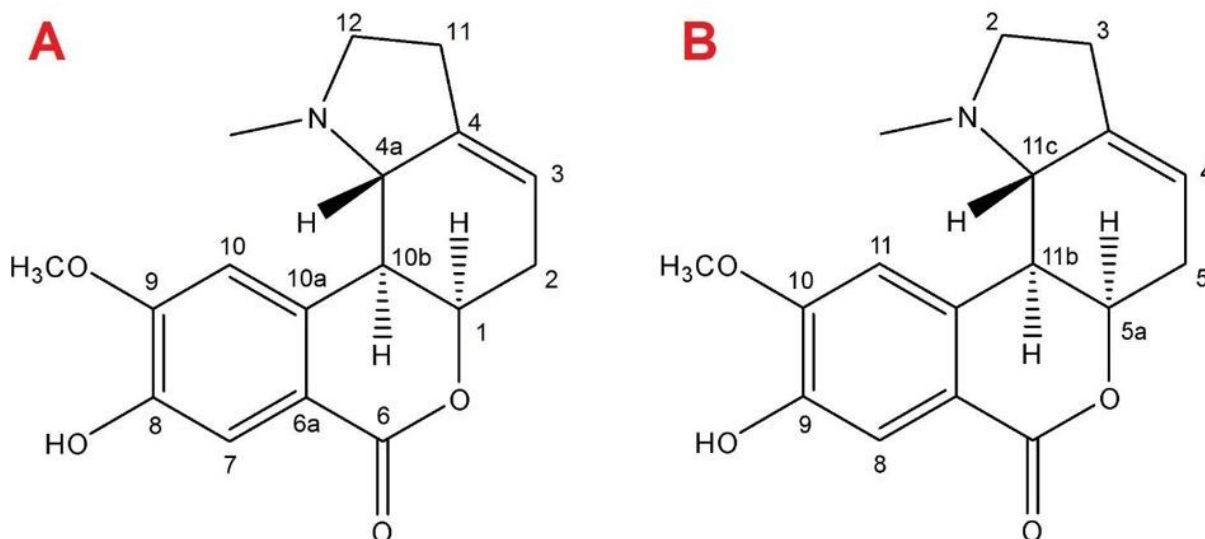
Stanovení cytotoxického působení izolované látky bylo provedeno ve spolupráci s pracovníky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze a Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Popis postupů stanovení a souhrn studií jsou uvedeny v publikacích Doskočil et al. (2015)¹⁰¹ a Havelek et al. (2017)¹⁰².

4.7.5 Stanovení aktivity vůči plazmodiím *in vitro*

Inhibiční aktivita vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei in vitro* byla měřena Mgr. Kateřinou Breitrovou Ph.D. ve spolupráci s výzkumníky z MPrudêncio Lab, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Lisabon v rámci Erasmus+ stáže. Úplný popis postupu stanovení a zacházení s komáry je uveden v publikaci Ploemen et al. (2009).¹⁰³

5. VÝSLEDKY

V rámci této diplomové práce bylo izolováno ve spojené frakci 26-2 133 mg látky identifikované porovnáním jejích GC-MS, NMR spekter a zjištěnými fyzikálními vlastnostmi s literaturou jako 9-*O*-demethylhomolykorin. Dále byla identifikovaná látka testována na potenciální biologickou aktivitu.



Obrázek 6: Vzorce získané látky: A) podle tradičního číslování Amaryllidaceae alkaloidů byla látka nazvána 8-*O*-demethylhomolykorin B) podle pravidel pojmenování organických sloučenin byla popsána jako 9-*O*-demethylhomolykorin

5.1 STRUKTURNÍ IDENTIFIKACE

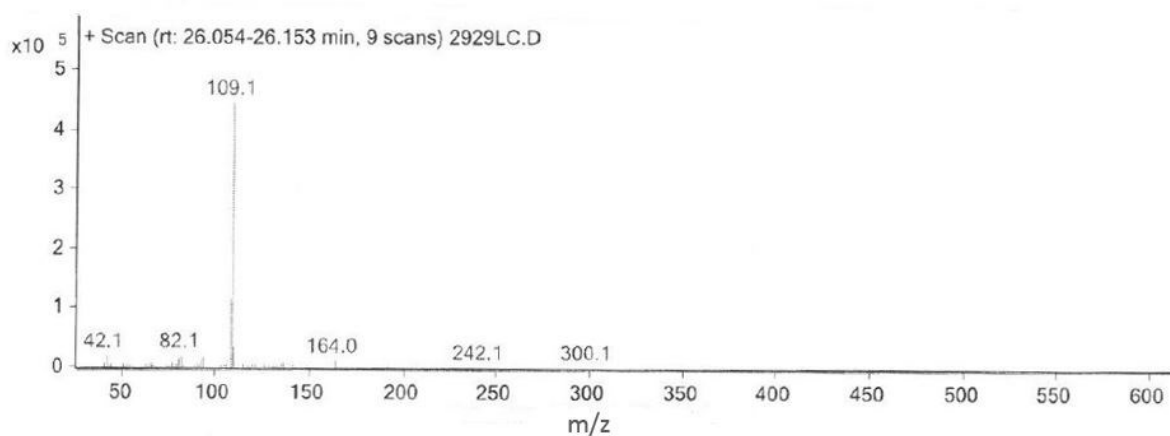
5.1.1 MS charakteristika 9-*O*-demethylhomolykorinu

Analýzou GC-MS s EI bylo získáno spektrum pouze s jedním výrazným iontem v m/z 109 a téměř žádnou odezvou iontu molekulárního. Na základě předchozích zkušeností ion m/z = 109 indikuje alkaloid homolykorinového strukturního typu⁷¹. Za účelem zjištění molekulárního iontu bylo potřeba změřit i ESI hmotnostní spektrum izolované látky. Z chromatogramu GC-MS s EI bylo zjištěno, že se jedná o látky homolykorinového typu, která není substituována v poloze C-2⁷¹.

Přesnější predikce izolované látky byla možná až po použití metody měření s ESI, kdy odezva molekulárního iontu již byla dostatečná. Získaná spektra byla porovnána s knihovnou spekter NIST a spektra získanými na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK.

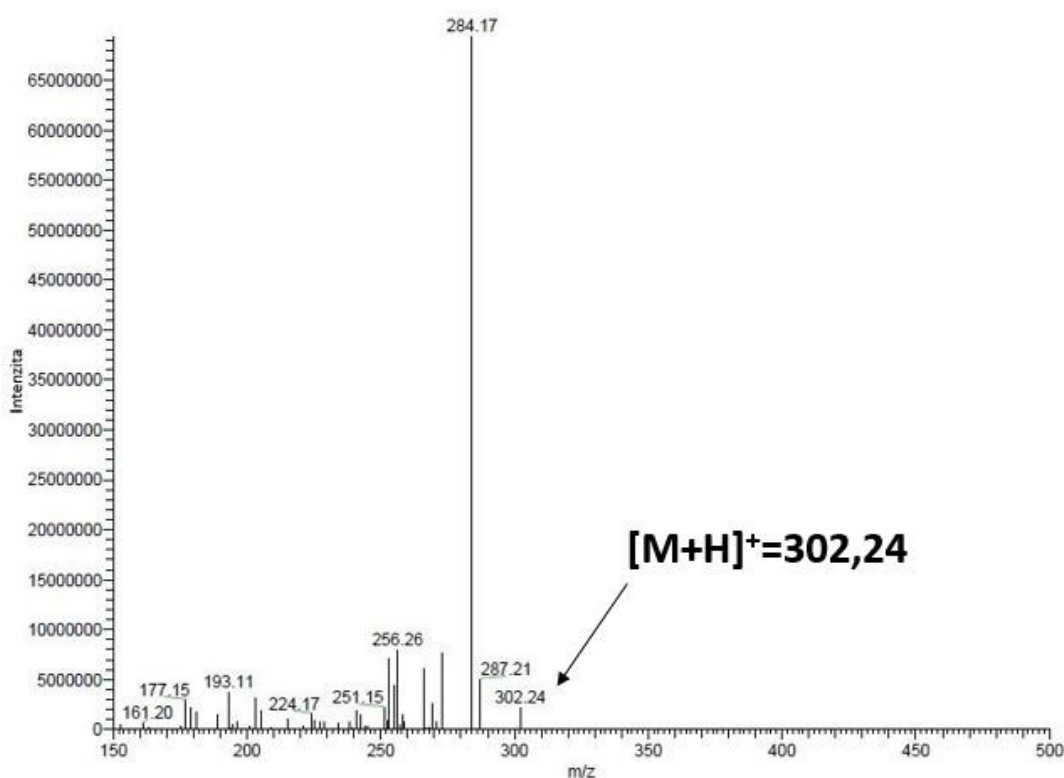
EI-MS analýza 9-O-demethylhomolykorinu

EI-MS, 70 eV, m/z (rel. int.) 164 (<0,1), 110 (<0,1), 109 (100), 108 (<1), 94 (<0,1), 93 (<0,1), 82 (<0,1), 81 (<0,1), 65 (<0,1), 42 (<0,1)



Obrázek 22: EI-MS spektrum 9-O-demethylhomolykorinu

ESI-MS analýza 9-O-demethylhomolykorinu



Obrázek 23: ESI MS spektrum 9-O-demethylhomolykorinu s vyznačenou hodnotou molekulového iontu

Molekulová hmotnost

Mr = 301,342

5.1.2 NMR analýza 9-O-demethylhomolykorinu

U izolované látky byla provedena ¹H-NMR a ¹³C-NMR studie. Interpretací ¹H-NMR a ¹³C-NMR spekter a jejich porovnáním s údaji v literatuře¹⁰⁴ byla stanovena její struktura.

¹H-NMR studie

¹H NMR (500MHz, CDCl₃, 25 °C) δ 7.59 (1H, s, H8), 6.98 (1H, s, H11), 5.52-5.48 (1H, m, H4), 4.79-4.76 (1H, m, H5a), 3.94 (3H, s, OCH₃), 3.17-3.12 (1H, m, H2), 2.76-2.70 (1H, m, H11c), 2.66 (1H, dd, J=9.7 Hz, J=2.1 Hz, H11b), 2.62-2.58 (2H, m, H5), 2.53-2.47 (2H, m, H3), 2.26 (1H, q, J= 9.5 Hz, H2), 2.00 (3H, s, NCH₃).

¹³C-NMR studie

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃, 25 °C) δ 165.6 (C7), 150.8 (C10), 145.6 (C9), 140.6 (C3a), 136.7 (C11a), 117.6 (C7a), 116.0 (C8), 115.4 (C4), 110.3 (C11), 77.5 (C5a), 66.5 (C11c), 56.5 (C2), 56.3 (OCH₃), 44.0 (C11b), 43.7 (NCH₃), 31.2 (C5), 27.9 (C3).

5.1.3 optická otáčivost 9-O-demethylhomolykorinu

$[\alpha]_D^{25} = 215,7^\circ$

5.2 VÝSLEDKY TESTŮ BIOLOGICKÝCH AKTIVIT

5.2.1 9-O-Demethylhomolykorin a jeho vliv na Alzheimerovu chorobu

Výsledky testů inhibice lidských cholinesteráz jsou uvedeny v Tabulka 14. Bylo prokázáno, že vůči HuAChE a vůči HuBuChE je 9-O-demethylhomolykorin neúčinný v porovnání s referenčními látkami. Výsledek testu 9-O-demethylhomolykorinu na inhibici POP je zaznamenán v Tabulka 14. Stejně jako v případě inhibiční aktivity vůči cholinesterázám je 9-O-demethylhomolykorin vůči POP neúčinný v porovnání se standardy. Zajímavou aktivitu vykazoval 9-O-demethylhomolykorin pouze vůči GSK-3β, při koncentraci 50 μM inhiboval GSK-3β z 63,6 ± 1,3 %. Dále u něho byla určena hodnota IC₅₀, která je uvedena v Tabulka 14, a byla vztažena k referenční látce SB-415286.

Tabulka 14: Biologická aktivita 9-O-demethylhomolykorinu vůči HuAChE, HuBuChE a POP

Izolovaný Alkaloid	IC ₅₀ HuAChE (μM)	IC ₅₀ HuBuChE (μM)	IC ₅₀ POP (mM)	IC ₅₀ GSK-3β (μM)
9-O-demethylhomolykorin	> 1000	> 1000	1807 ± 167	30,00 ± 0,71
Referenční látky				
Galanthamin	1,710 ± 0,065	42,301 ± 0,065		
Huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000		
Berberin	0,705 ± 0,104	30,721 ± 3,492	0,14 ± 0,02	
Eserin	0,063 ± 0,001	0,13 ± 0,00		
Bajkalin			0,61 ± 0,02	
Z-Pro-prolinal			2,75·10 ⁻⁶ ± 0,00·10 ⁻⁶	
SB-415286				70,00 nM

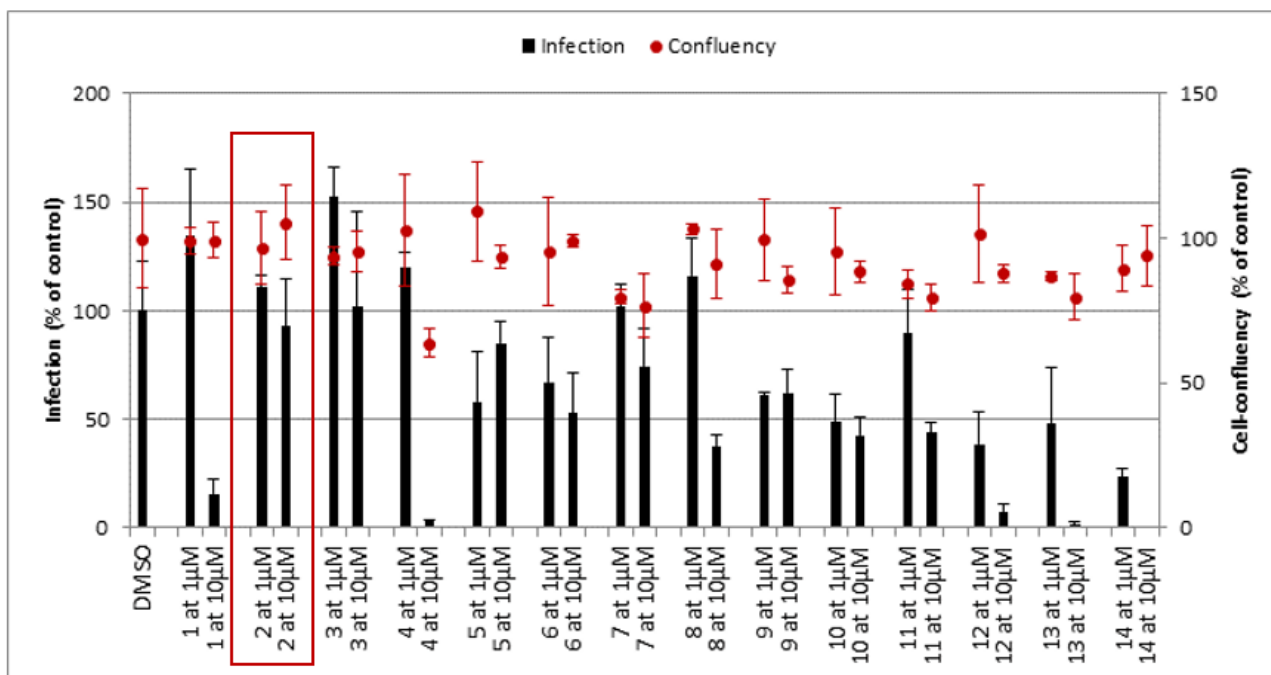
5.2.2 Cytotoxická aktivita 9-O-demethylhomolykorinu

Ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové byla provedena screeningová studie na 10 buněčných liniích. Působení 9-O-demethylhomolykorinu bylo vystaveno devět nádorových linií, Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (linie buněk akutní lymfoblastické leukémie), A549 (linie buněk adenokarcinomu plic), HT-29 (kolorektální karcinom), PANC 1 (linie buněk epiteliálního karcinomu slinivky), A2780 (linie buněk karcinomu vaječníku), HeLa (linie buněk adenokarcinomu děložního čípku), MCF 7 (linie buněk adenokarcinomu prsu), SAOS 2 (linie buněk osteosarkomu), a kontrolní linie MRC-5 (linie buněk zdravých plicních fibroblastů). Koncentrace testované látky byla 10 μM a na buněčné linie působila po dobu 48 hodin. Po uplynutí daného času byla určena viabilita buněk jednotlivých linií, která byla porovnána s viabilitou buněk po působení doxorubicinu, který byl použit jako standard. Viabilita všech testovaných buněčných linií po působení 9-O-demethylhomolykorinu byla vyšší než 90 % a 9-O-demethylhomolykorin byl označen jako neaktivní. Zároveň byl sledován netoxický vůči zdravým buňkám linie MRC-5 (viabilita buněk byla 93 %), které byly použity jako kontrola.

Druhé stanovení cytotoxického působení 9-O-demethylhomolykorinu bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Měření bylo provedeno na dvou liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29, jako kontrola byla využita linie zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva FHs-74Int. Výsledkem byla hodnota IC_{50} , u 9-O-demethylhomolykorinu byla její hodnota vyšší než $10 \mu\text{M}$ u obou nádorových linií i u linie zdravých buněk FHs-74Int. V porovnání se standardem vinorelbinem (IC_{50} pro linii Caco-2 je $0,03 \pm 0,01$ a pro linii FHs-74Int je $4,0 \pm 0,3$) je 9-O-demethylhomolykorin považován za neaktivní a zároveň netoxický vůči zdravým buňkám.

5.2.3 Antimalarické působení 9-O-demethylhomolykorinu

Stanovení bylo provedeno na původci myši malárie *Plasmodium berghei* (PbA-LuciGFPcon) *in vitro* na buněčné linii HuH-7. 9-O-demethylhomolykorin vykazoval velmi nízkou inhibiční aktivitu vůči *Plasmodium berghei*. Jeho IC_{50} je vyšší než $20 \mu\text{M}$ (hodnota IC_{50} primachinu, který se používá jako standard u jaterního stádia, je $5,74 \pm 0,86 \mu\text{M}$).



Obrázek 24: Rozsah infekce a buněčné konfluency v % v porovnání s kontrolou (DMSO), výsledek 9-O-demethylhomolykorinu je vyznačen červeným orámováním

6. DISKUZE

Cílem předložené diplomové práce bylo zpracování čerstvých cibulí rostliny *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, jež patří mezi zahradní kultivary rodu *Narcissus*, získat čistou alkaloidní látku a u izolované látky představit výsledky biologických aktivit, na které byla daná látka testována.

Uvedený kultivar byl vybrán na základě screeningu jednoděložných rostlin čeledi Amaryllidaceae provedeného na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK.⁸ V uvedené práci byly alkaloidní sumární extrakty testovaných rostlin podrobeny GC-MS studii a dále byla zjišťována biologická aktivita extraktů. *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN vykazoval pozoruhodné alkaloidní spektrum a také zajímavou aktivitu vůči BuChE. Proto byl vybrán pro podrobnou fytochemickou studii.

V průběhu vlastní fytochemické studie bylo zpracováno 34,3 kg čerstvých cibulí daného kultivaru do podoby přečištěného alkaloidního extraktu o hmotnosti 31,7 g. Připravený extrakt byl dělen nejprve pomocí sloupcové chromatografie, jejímž výsledkem byl vznik 27 frakcí. Pro další zpracování byla vybrána frakce 26, která byla dělena pomocí preparativní TLC. Opakovaným dělením byla získána čistá látka, která byla po strukturní analýze označena jako 9-*O*-demethylhomolykorin. 9-*O*-Demethylhomolykorin patří do homolykorinového strukturního typu, který se společně s typem lykorinovým v rodě *Narcissus* nachází velmi často.²⁵ Stejně tak samotný 9-*O*-demethylhomolykorin je látka často se vyskytující v rodě *Narcissus*.¹⁰⁵

9-*O*-Demethylhomolykorin byl izolován v množství, které umožňovalo provést řadu biologických testů. Nejprve byla provedena stanovení související s potenciální terapií Alzheimerovy choroby, mezi která patří inhibice HuAChE, HuBuChE, POP a GSK-3 β . 9-*O*-demethylhomolykorin však vykazoval mírnou aktivitu pouze vůči GSK-3 β (IC₅₀ = 30,00 \pm 0,71 μ M) v porovnání se standardní látkou SB-415286 (70 nM).

Dále byl proveden screening cytotoxické aktivity vůči devíti nádorovým buněčným liniím (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a kontrolní linie MRC-5. Navíc byla provedena samostatná studie cytotoxicity na dvou buněčných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2, HT-29) s kontrolní linií zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva FHs-74Int. Bohužel byl 9-*O*-demethylhomolykorin neaktivní vůči všem nádorovým liniím, také vůči zdravým buňkám nevykazoval cytotoxické působení.

Poslední testovanou aktivitou bylo působení vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei*, jakožto původci malárie. Bohužel i v tomto testu byl 9-*O*-demethylhomolykorin neúčinný.

Na základě výsledků z provedených testů lze říci, že 9-*O*-demethylhomolykorin není příliš biologicky zajímavý. Pouze aktivita vůči GSK-3 β se jeví jako poutavá. V literatuře pak lze nalézt další čtyři alkaloidy homolykorinového typu (masonin, *O*-ethyllykorenin, odulin, tetrahydromasonin), které vykazují zajímavou GSK-3 β inhibiční aktivitu.²² V současné době se těchto pět AmA řadí mezi nejsilnější GSK-3 β inhibitory ze skupiny AmA. Dále lze uvést, že byl v odborné literatuře popsán případ slabší cytotoxické aktivity 9-*O*-demethylhomolykorinu vůči leukemickým buňkám MOLT-4 a zároveň cytotoxické působení i vůči nenádorovým buňkám myších fibroblastů LMTK, ačkoli v této práci nevykazoval cytotoxický účinek vůči žádným testovaným liniím buněk.¹⁰⁶

7. LITERATURA

- (1) Dohnal, F. *Studijní Texty k Dějinám Farmacie*, 1.; Karolinum: Praha, 2014.
- (2) Zenk, M. H.; Juenger, M. Evolution and Current Status of the Phytochemistry of Nitrogenous Compounds. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22), 2757–2772.
- (3) Jahodář, L. *Farmakobotanika: Semenné Rostliny*, 3.; Karolinum: Praha, 2011.
- (4) Spilková, J.; Jan, M.; Siatka, T.; Tůmová, L.; Kašparová, M. Alkaloidy. In *Farmakognozie*; Karolinum: Praha, 2016.
- (5) Bastida, J.; Berkov, S.; Torras, L.; Pigni, N. B.; Andrade, J. P. de; Martínez, V.; Codina, C.; Viladomat, F. Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids. **2011**, 65–100.
- (6) Havlasová, J.; Šafratová, M.; Siatka, T.; Štěpánková, Š.; Novák, Z.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Benešová, N.; et al. Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some Narcissus Species and Varieties and Their Biological Activity. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9* (8), 1151–1155.
- (7) Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Hulcová, D.; Breiterová, K.; Hrabcová, V.; Machado, M.; Fontinha, D.; Prudêncio, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; et al. Alkaloids from Narcissus Poeticus Cv. Pink Parasol of Various Structural Types and Their Biological Activity. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41* (2), 208–218.
- (8) Breiterová, K. Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů jednoděložných alkaloidních rostlin. VIII. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2015.
- (9) Křesadlová, L.; Vilín, S. *Encyklopedie tulipánů, hyacintů, begonií a dalších okrasných cibulnatých a hlíznatých rostlin*; Computer Press: Brno, 2009.
- (10) *Květena České republiky*; Slavík, B., Štěpánková, J., Eds.; Academia: Praha, 2010.
- (11) Grulich, V.; Vančurová, J. AMARYLLIS BELLADONNA L. – zornice <https://botany.cz/cs/amaryllis-belladonna/> (accessed Aug 10, 2019).
- (12) Svobodová, V. CRINUM ASIATICUM L. – křín <https://botany.cz/cs/crinum-asiaticum/> (accessed Apr 7, 2019).
- (13) PROČ KLÍVIE NEKVETE? <https://zahradkaruvrok.cz/2018/02/se-mame-starat-klivii/> (accessed Jun 26, 2019).
- (14) Opletal, L.; Koula, V. <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2> (accessed Apr 15, 2019).
- (15) Kulhánková, A.; Cahlíková, L.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Opletal, L. Alkaloids from Zephyranthes Robusta Baker and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (6), 1120–1127.
- (16) Dalecká, M.; Havelek, R.; Královec, K.; Brůčková, L.; Cahlíková, L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy* **2013**, *107*, 701–708.
- (17) Jahodář, L. *Rostliny způsobující otravy*; Karolinum: Praha, 2018.
- (18) Louw, C. A. M.; Regnier, T. J. C.; Korsten, L. Medicinal Bulbous Plants of South Africa and Their Traditional Relevance in the Control of Infectious Diseases. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82* (2), 147–154.
- (19) Tram, N. T. N.; Titorenkova, Tz. V.; Bankova, V. S.; Handjieva, N. V.; Popov, S. S. Crinum L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia* **2002**, *73* (3), 183–208.
- (20) Hoskovec, L. BOOPHONE DISTICHA (L. f.) Herb. <https://botany.cz/cs/boophone-disticha/> (accessed Jun 27, 2019).
- (21) Hoskovec, L. AGAPANTHUS PRAECOX Willd. – kalokvět <https://botany.cz/cs/agapanthus-praecox/> (accessed Apr 9, 2019).

- (22) Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules* **2018**, *23* (4), 719.
- (23) Šafratová, M. Studium Inhibičního (Toxického) Vlivu Alkaloidů Vybraných Druhů Rostlin z Čeledi Amaryllidaceae Na Některé Lidské Enzymové Systémy (in Vitro Studie) III. Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2017.
- (24) Jones, M.; Pulman, J.; Walker, T. Drugs from Daffodils. *Chem. Ind.* **2011**, No. 4, 18–20.
- (25) Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F. Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press, 2006; Vol. 63, pp 87–179.
- (26) Kington, S. *The International Daffodil Register and Classified List 2008*; Royal Horticultural Society: London, 2008.
- (27) Hoskovec, L. NARCISSUS POËTICUS L. – narcis bílý / narcis biely | BOTANY.cz <https://botany.cz/cs/narcissus-poeticus/> (accessed Aug 15, 2019).
- (28) Krása. NARCISSUS PSEUDONARCISSUS L. – narcis žlutý / narcis žltý | BOTANY.cz <https://botany.cz/cs/narcissus-pseudonarcissus/> (accessed Aug 15, 2019).
- (29) horticultural classification <https://www.rhs.org.uk/plants/pdfs/plant-registration-forms/daffhortclass.pdf> (accessed Aug 13, 2019).
- (30) Daffodil Divisions Using the RHS System of Classification <https://daffodilusa.org/daffodil-info/daffodil-divisions-cultivars/> (accessed Apr 20, 2019).
- (31) Takos, A. M.; Rook, F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (6), 11713–11741.
- (32) López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and Narcissus Extracts. *Life Sci.* **2002**, *71* (21), 2521–2529.
- (33) Hulcová, D. Biologická aktivita alkaloidů Narcissus pseudonarcissus L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae). Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2018.
- (34) Pettit, G. R.; Gaddamidi, V.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Sagawa, Y. Isolation and Structure of Pancratistatin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, No. 24, 1693–1694.
- (35) Pettit, G. R.; Pettit III, G. R.; Groszek, G.; Backhaus, R. A.; Doubek, D. L.; Barr, R. J. Antineoplastic Agents, 301. An Investigation of the Amaryllidaceae Genus Hymenocallis. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (5), 756–759. <https://doi.org/10.1021/np50119a017>.
- (36) Pettit, G. R.; Gaddamidi, V.; Herald, D. L.; Singh, S. B.; Cragg, G. M.; Schmidt, J. M.; Boettner, F. E.; Williams, M.; Sagawa, Y. Antineoplastic Agents, 120. Pancratium Littorale. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49* (6), 995–1002.
- (37) Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B.; Duke, J. A.; Doubek, D. L. Antineoplastic Agents, 162. Zephyranthes Candida. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53* (1), 176–178.
- (38) Pettit, G.; Pettit, G. R.; Backhaus, R. A.; Boyd, M. R.; Meerow, A. W. Antineoplastic Agents, 256. Cell Growth Inhibitory Isocarbostryls from Hymenocallis. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56* (10), 1682–1687.
- (39) The Folklore of Narcissus. In *Narcissus and Daffodil: The Genus Narcissus*; Hanks, G. R., Ed.; CRC Press: London, 2002; pp 19–29.
- (40) Çakici, I.; Uluğ, H. Y.; İnci, S.; Tunçtan, B.; Abacıoğlu, N.; Kanzik, I.; Sener, B. Antinociceptive Effect of Some Amaryllidaceae Plants in Mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49* (8), 828–830.
- (41) He, M.; Qu, C.; Gao, O.; Hu, X.; Hong, X. Biological and Pharmacological Activities of Amaryllidaceae Alkaloids. *RSC Adv.* **2015**, *5* (21), 16562–16574.

- (42) Pigni, N. B.; Berkov, S.; Elamrani, A.; Benaissa, M.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Two New Alkaloids from *Narcissus Serotinus* L. *Molecules* **2010**, *15* (10), 7083–7089.
- (43) Saltan Çitoğlu, G.; Bahadır Acıkara, Ö.; Sever Yılmaz, B.; Özbek, H. Evaluation of Analgesic, Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Effects of Lycorine from *Sternbergia Fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* **2012**, *83* (1), 81–87.
- (44) Fennell, C. W.; van Staden, J. Crinum Species in Traditional and Modern Medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *78* (1), 15–26.
- (45) Harvey, A. L. The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogues. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *68* (1), 113–128.
- (46) Farmakoterapie Alzheimerovy Choroby. *Farmakoter. Inf. Měsíř. Lékaře Farm.* **2014**, No. 12, 1–4.
- (47) Dementia <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed Jul 10, 2019).
- (48) Mátl, O.; Mátlová, M.; Holmerová, I. *Zpráva o Stavu Demence 2016*, 1.; Česká alzheimerovská společnost: Praha, 2016.
- (49) Cahlíková, L.; Hrabínová, M.; Kulhánková, A.; Benešová, N.; Chlebek, J.; Jun, D.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Kuča, K.; et al. Alkaloids from *Chlidanthus Fragrans* and Their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8* (11), 1934578X1300801110.
- (50) Prokopová, I. Farmakoterapie Alzheimerovy Demence a Přidružených Neuropsychiatrických Symptomů – 1. Část. *Psychiatr. Praxi* **2018**, *19* (1), 7–10.
- (51) Palop, J. J.; Mucke, L. Amyloid- β -Induced Neuronal Dysfunction in Alzheimer's Disease: From Synapses toward Neural Networks. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13* (7), 812–818.
- (52) Plattner, F.; Angelo, M.; Giese, K. P. The Roles of Cyclin-Dependent Kinase 5 and Glycogen Synthase Kinase 3 in Tau Hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (35), 25457–25465.
- (53) Saraswati, A. P.; Ali Hussaini, S. M.; Krishna, N. H.; Babu, B. N.; Kamal, A. Glycogen Synthase Kinase-3 and Its Inhibitors: Potential Target for Various Therapeutic Conditions. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 843–858.
- (54) Cohen, P.; Frame, S. The Renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (10), 769–776.
- (55) Phukan, S.; Babu, V. S.; Kannoji, A.; Hariharan, R.; Balaji, V. N. GSK3 β : Role in Therapeutic Landscape and Development of Modulators. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160* (1), 1–19.
- (56) Maqbool, M.; Mobashir, M.; Hoda, N. Pivotal Role of Glycogen Synthase Kinase-3: A Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *107*, 63–81.
- (57) Luo, J. Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) in Tumorigenesis and Cancer Chemotherapy. *Cancer Lett.* **2009**, *273* (2), 194–200.
- (58) Henriksen, E. J.; Dokken, B. B. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Curr. Drug Targets* **2006**, *7* (11), 1435–1441.
- (59) Lal Hind; Ahmad Firdos; Woodgett James; Force Thomas. The GSK-3 Family as Therapeutic Target for Myocardial Diseases. *Circ. Res.* **2015**, *116* (1), 138–149.
- (60) Jope, R.; Roh, M.-S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. *Curr. Drug Targets* **2006**, *7* (11), 1421–1434.
- (61) Giacobini, E. Cholinergic Function and Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2003**, *18* (S1), S1–S5.
- (62) Puttonen, K. A.; Lehtonen, Š.; Raasmaja, A.; Männistö, P. T. 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. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20* (8), 1446–1454.

- (63) Polgár, L. The Prolyl Oligopeptidase Family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2002**, *59* (2), 349–362.
- (64) García-Horsman, J. A.; Männistö, P. T.; Venäläinen, J. I. On the Role of Prolyl Oligopeptidase in Health and Disease. *Neuropeptides* **2007**, *41* (1), 1–24.
- (65) Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabínová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; et al. Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine Bowdenii* W. Watson and Their Biological Activities. *RSC Adv.* **2016**, *6* (83), 80114–80120.
- (66) 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. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *56* (3), 427–434.
- (67) Tarragó, T.; Kichik, N.; Claasen, B.; Prades, R.; Teixidó, M.; Giralt, E. Baicalin, a Prodrug Able to Reach the CNS, Is a Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (15), 7516–7524.
- (68) GALANTAMIN MYLAN
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0191787&tab=info> (accessed Jul 15, 2019).
- (69) Elgorashi, E. E.; Stafford, G. I.; Staden, J. van. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70* (3), 260–262.
- (70) Cahlíková, L.; Pérez, D. I.; Štěpánková, Š.; Chlebek, J.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Opletal, L. In Vitro Inhibitory Effects of 8-O-Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted Penetration across the Blood–Brain Barrier. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1189–1192.
- (71) Cahlíková, L.; Ločárek, M.; Benešová, N.; Kučera, R.; Chlebek, J.; Novák, Z.; Opletal, L. Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8* (6), 781–785.
- (72) Kohelová, E.; Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Maříková, J.; Kučera, T.; Martínez González, L.; Hrabínová, M.; Vorčáková, K.; et al. Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1307.
- (73) Šafratová, M.; Novák, Z.; Kulhánková, A.; Kunes, 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. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9* (6), 787–788.
- (74) Key facts about cancer <http://www.who.int/cancer/about/facts/en/> (accessed Aug 6, 2019).
- (75) Dumont, P.; Ingrassia, 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 Pathways in Cancer Cells But Not in Normal Fibroblasts. *Neoplasia* **2007**, *9* (9), 766–776.
- (76) Masi, M.; Frolova, L. V.; Yu, X.; Mathieu, V.; Cimmino, A.; De Carvalho, A.; Kiss, R.; Rogelj, S.; Pertsemliadis, A.; Kornienko, A.; et al. Jonquiline, a New Pretazettine-Type Alkaloid Isolated from *Narcissus Jonquilla* Quail, with Activity against Drug-Resistant Cancer. *Fitoterapia* **2015**, *102*, 41–48.
- (77) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311–335.
- (78) Nair, J. J.; van Staden, J. Cytotoxicity Studies of Lycorine Alkaloids of the Amaryllidaceae. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9* (8), 1193–1210.

- (79) Wang, P.; Yuan, H.-H.; Zhang, X.; Li, Y.-P.; Shang, L.-Q.; Yin, Z. Novel Lycorine Derivatives as Anticancer Agents: Synthesis and In Vitro Biological Evaluation. *Molecules* **2014**, *19* (2), 2469–2480.
- (80) Li, L.; Dai, H.-J.; Ye, M.; Wang, S.-L.; Xiao, X.-J.; Zheng, J.; Chen, H.-Y.; Luo, Y.; Liu, J. Lycorine Induces Cell-Cycle Arrest in the G0/G1 Phase in K562 Cells via HDAC Inhibition. *Cancer Cell Int.* **2012**, *12* (1), 1–6.
- (81) Liu, J.; Hu, W.-X.; He, L.-F.; Ye, M.; Li, Y. Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.febslet.2004.10.095> (accessed Aug 24, 2019).
- (82) Liu, X.; Jiang, J.; Jiao, X.; Wu, Y.; Lin, J.; Cai, Y. Lycorine Induces Apoptosis and Down-Regulation of Mcl-1 in Human Leukemia Cells. *Cancer Lett.* **2009**, *274* (1), 16–24.
- (83) Nair, J. J.; Van Staden, J. Caspase-Inducing Effects of Lycorane and Crinane Alkaloids of the Amaryllidaceae. *South Afr. J. Bot.* **2019**, *120*, 33–38.
- (84) Nair, J. J.; Rárová, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; van Staden, J. Apoptosis-Inducing Effects of Distichamine and Narciprimine, Rare Alkaloids of the Plant Family Amaryllidaceae. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (19), 6195–6199.
- (85) Habartová, K.; Cahlíková, L.; Řezáčová, M.; Havelek, R. The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11* (10), 1587–1594.
- (86) Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I. The Global Distribution of Clinical Episodes of Plasmodium Falciparum Malaria. *Nature* **2005**, *434* (7030), 214–217.
- (87) Osorio, E. J.; Berkov, S.; Brun, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Cabezas, F.; Bastida, J. In Vitro Antiprotozoal Activity of Alkaloids from Phaedranassa Dubia (Amaryllidaceae). *Phytochem. Lett.* **2010**, *3* (3), 161–163.
- (88) Ashley, E. A.; Phyo, A. P.; Woodrow, C. J. Malaria. *The Lancet* **2018**, *391* (10130), 1608–1621.
- (89) Suh, K. N.; Kain, K. C.; Keystone, J. S. Malaria. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* **2004**, *170* (11), 1693–1702.
- (90) Hao, B.; Shen, S.-F.; Zhao, Q.-J. Cytotoxic and Antimalarial Amaryllidaceae Alkaloids from the Bulbs of Lycoris Radiata. *Molecules* **2013**, *18* (3), 2458–2468.
- (91) Toriizuka, Y.; Kinoshita, E.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Ishiyama, A.; Otaguro, K.; Yamada, H.; Ōmura, S.; Takayama, H. New Lycorine-Type Alkaloid from Lycoris Traubii and Evaluation of Antitrypanosomal and Antimalarial Activities of Lycorine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (24), 10182–10189.
- (92) Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Lycorine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (13), 4694–4701.
- (93) Labraña, J.; Machocho, A. K.; Kricsfalussy, V.; Brun, R.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. Alkaloids from Narcissus Angustifolius Subsp. Transcarpathicus (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **2002**, *60* (8), 847–852.
- (94) Narcissus “Professor Einstein” - Plant Finder <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=251151&isprofile=0&> (accessed Aug 6, 2019).
- (95) Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*, 2.; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- (96) Dušek, J.; Kašparová, M.; Siatka, T.; Spilková, J.; Tůmová, L. *Praktická Cvičení z Farmakognozie*, 2.; Karolinum: Praha, 2008.
- (97) Rolf, K. *Analytická chemie pro farmaceuty*, 4.; Karolinum: Praha, 2013.

- (98) TLC Evaluation | Merck <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytcs-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/tlc-process/TLC-Evaluation/4tab.qB.RXkAAAFVN.VDx07e,nav> (accessed Mar 3, 2019).
- (99) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7* (2), 88–95.
- (100) Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keserü, G. M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2007**, *5* (1), 75–84.
- (101) Doskočil, I.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Benešová, N.; Havlík, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Královec, K.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Cytotoxic Activities of Amaryllidaceae Alkaloids against Gastrointestinal Cancer Cells. *Phytochem. Lett.* **2015**, *13*, 394–398.
- (102) Havelek, R.; Muthna, D.; Tomsik, P.; Kralovec, K.; Seifrtova, M.; Cahlikova, L.; Hostalkova, A.; Safratova, M.; Perwein, M.; Cermakova, E.; et al. Anticancer Potential of Amaryllidaceae Alkaloids Evaluated by Screening with a Panel of Human Cells, Real-Time Cellular Analysis and Ehrlich Tumor-Bearing Mice. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *275*, 121–132.
- (103) Ploemen, I. H. J.; Prudêncio, M.; Douradinha, B. G.; Ramesar, J.; Fonager, J.; Gemert, G.-J. van; Luty, A. J. F.; Hermsen, C. C.; Sauerwein, R. W.; Baptista, F. G.; et al. Visualisation and Quantitative Analysis of the Rodent Malaria Liver Stage by Real Time Imaging. *PLOS ONE* **2009**, *4* (11), e7881.
- (104) Huang, S.-D.; Zhang, Y.; He, H.-P.; Li, S.-F.; Tang, G.-H.; Chen, D.-Z.; Cao, M.-M.; Di, Y.-T.; Hao, X.-J. A New Amaryllidaceae Alkaloid from the Bulbs of *Lycoris Radiata*. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11* (4), 406–410.
- (105) Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Rubiralta, M.; Quirion, J.-C.; Husson, H.-P. 9-O-Demethyl-2 α -Hydroxyhomolycorine, an Alkaloid from *Narcissus Tortifolius*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (8), 2683–2684.
- (106) Weniger, B.; Italiano, L.; Beck, J.-P.; Bastida, J.; Bergoñon, S.; Codina, C.; Lobstein, A.; Anton, R. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Med.* **1995**, *61* (01), 77–79.

8. ABSTRAKT

Vytrvalé rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou obecně známé pro svoji krásu, ale také jako byliny, které obsahují široké spektrum alkaloidů. Do dnešních dnů bylo izolováno více než 500 alkaloidů. Amaryllidaceae alkaloidy (AmA) jsou odvozeny od aminokyseliny tyrosinu a jsou rozděleny do devíti základních skupin. Biologická aktivita těchto látek zahrnuje protinádorovou, antibakteriální, antifungální, antivirovou, protimalarickou aktivitu a některé z nich jsou používány pro léčbu Alzheimerovy choroby.

Narcissus cv. PROFESSOR EINSTEIN byl vybrán díky předešlému výzkumu jeho sumárního extraktu. Pomocí GC-MS bylo detekováno dvacet alkaloidů a deset z nich bylo identifikováno (např.: lykoramin, pluviin, haemanthamin, pankracin, homolykorin). Díky této rozmanitosti alkaloidů a faktu, že sumární extrakt vykazoval relativně vysokou inhibiční aktivitu ($IC_{50} = 49,99 \pm 5,38 \mu\text{g/ml}$) vůči HuBuChE, byl narcis vhodným pro izolaci alkaloidů a následně pro studium jejich biologické aktivity.

Sumární ethanolický extrakt pro získání čistých látek byl připraven z 34,3 kg čerstvých cibulí. Dělení bylo zahájeno sloupcovou chromatografií a extrakt byl rozdělen do téměř 500 frakcí. Některé z nich byly na základě TLC analýzy sloučeny a ve výsledku bylo vytvořeno 27 podfrakcí. Podfrakce č. 26 byla vybrána pro následnou izolaci čistých alkaloidů. Podfrakce byly opakovaně děleny a pomocí preparativní TLC. Díky této metodě byla získána jedna čistá sloučenina. Po strukturní analýze (NMR) bylo zjištěno, že izolovaný alkaloid je 9-*O*-demethylhomolykorin.

Poté byla měřena biologická aktivita 9-*O*-demethylhomolykorinu proti HuAChE, HuBuChE, POP a GSK-3 β . Testováno bylo cytotoxické působení na deseti nádorových liniích (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, Caco-2, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a na dvě línii zdravých buněk (MRC-5, FHS-74Int). Stanovena byla také aktivita vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei* in vitro. Bohužel 9-*O*-demethylhomolykorin vykazoval slibnou aktivitu pouze vůči GSK-3 β ($IC_{50} = 30,00 \pm 0,71 \mu\text{M}$), v ostatních testech byl 9-*O*-demethylhomolykorin neaktivní.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Alzheimerova nemoc, Cytotoxicita, Aktivita vůči plasmodiím

9. ABSTRACT

Perennial plants from the Amaryllidaceae family are generally known for their beauty but also like herbs which contain wide range of alkaloids. To these days more than 500 alkaloids have been isolated. Amaryllidaceae alkaloids (AmA) are derivatived from aminoacid tyrosine and divided into nine basic groups. Biological activity of these substances includes antitumor, antibacterial, antifungal, antiviral, antimalarial activity and some of them are used for treatment Alzheimer's disease (AD).

Narcissus cv. PROFESSOR EINSTEIN have been chosen thanks to previous research of summary extract. Twelve alkaloids have been detected by GC-MS and ten of them have been identified (e.g.: lykoramine, pluviine, haemanthamine, pancracine, homolycorine). Due to this diversity of alkaloids and the fact that summary extract has relatively high inhibitory activity ($IC_{50} = 49,99 \pm 5,38 \mu\text{g/mL}$) against HuBuChE *Narcissus* have been appropriate for isolation of the alkaloids and for further study of their biological activity.

Summary ethanolic extract for gain pure compounds was prepared from 34.3 kg fresh bulbs. Separation was initiated by column chromatography and extract was divided into almost 500 fractions. Some of them were put together owing to TLC analysis and finally 27 subfractions were formed. Subfraction Nr. 26 was selected for following isolation of the pure alkaloids. The subfraction was repeatedly divided by preparative TLC. Thanks this method one pure compound was obtained. After structural analysis (NMR) it was found that isolated alkaloid is 9-*O*-demethylhomolycorine.

Then were measured biological activities of 9-*O*-demethylhomolycorine against HuAChE, HuBuChE and POP and GSK-3 β . Cytotoxic activity was tested on ten tumor cell lines (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, Caco-2, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) and on two healthy cell lines (MRC-5, FHS-74Int). Activity against liver stage *Plasmodium berghei* in vitro was determined, too. Unfortunately 9-*O*-demethylhomolycorine showed promising activity only against GSK-3 β ($IC_{50} = 30,00 \pm 0,71 \mu\text{M}$), in other tests 9-*O*-demethylhomolykorin was non active.

Keywords: Amaryllidaceae, *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN, Alzheimer's disease, Cytotoxicity, Antiplasmodial activity