

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické botaniky**



**Diplomová práce**

**Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a jejich biologická  
aktivita**

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

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

Hradec Králové, květen 2020

Adéla Potůčková

**Charles University**  
**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**  
**Department of Pharmaceutical Botany**



**Diploma thesis**  
**Derivatives of Amaryllidaceae alkaloids a their biological  
activity**

Head of department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

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

Hradec Králové, May 2020

Adéla Potůčková

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

Hradec Králové, květen 2020

.....  
Adéla Potůčková

Tato práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 548 a projektu Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání OPVVV 02\_16\_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu.

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné rady, užitečné poznámky, poskytnuté materiály, čas, a především za trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Velké díky patří také celé katedře farmaceutické botaniky za ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1. ÚVOD.....   | 7  |
| 2. CÍL PRÁCE.....  | 9  |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST.....  | 10 |
| 3.1. Čeleď Amaryllidaceae.....   | 10 |
| 3.2. Amaryllidaceae alkaloidy a jejich biosyntéza.....   | 10 |
| 3.3. Galantaminový strukturní typ.....   | 15 |
| 3.4. Biologická aktivita dalších Amaryllidaceae alkaloidů.....   | 17 |
| 3.4.1. Lykorin.....  | 17 |
| 3.4.2. Haemantamin.....  | 20 |
| 3.4.3. Pankratistatin.....   | 22 |
| 3.4.4. Narciklasin.....  | 23 |
| 3.5. Alzheimerova choroba.....   | 24 |
| 3.5.1. Definice a příznaky.....  | 24 |
| 3.5.2. Hypotézy patogeneze.....  | 24 |
| 3.5.2.1. Cholinergní hypotéza.....   | 25 |
| 3.5.2.2. Hypotéza amyloidní kaskády.....   | 25 |
| 3.5.2.3. Hypotéza mikrotubulární nestability.....  | 26 |
| 3.5.2.4. Genetické faktory patogeneze.....   | 26 |
| 3.5.3. Současná léčba.....   | 27 |
| 3.6. Galantamin a jeho polosyntetické deriváty jako inhibitory cholinesteráz použitelné<br>v terapii Alzheimerovy choroby..... | 29 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....  | 36 |
| 4.1. Materiál.....   | 36 |
| 4.1.1. Chlidantin.....   | 36 |
| 4.1.2. Rozpouštědla a chemikálie použité pro přípravu derivátů.....  | 36 |
| 4.1.3. Vyvíjecí soustavy TLC.....  | 36 |
| 4.1.4. Adsorbenty TLC.....   | 37 |
| 4.1.5. Chemikálie pro přípravu hydrochloridů.....  | 37 |
| 4.2. Příprava hydrochloridů.....   | 37 |
| 4.3. Strukturní analýza.....   | 38 |
| 4.3.1. NMR spektroskopie.....  | 38 |
| 4.3.2. ESI-MS spektroskopie.....   | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3.3. Optická otáčivost.....   | 39 |
| 4.4. Biologická aktivita připravených derivátů.....                         | 39 |
| 4.4.1. Stanovení inhibiční aktivity derivátů proti AChE a BuChE.....        | 39 |
| 4.4.2. Stanovení protinádorové aktivity derivátů.....                       | 39 |
| 4.5. Syntéza derivátů.....  | 41 |
| 4.5.1. Příprava 3- <i>O</i> -(benzoyl)chlidantinu (LC-145).....             | 41 |
| 4.5.2. Příprava 3- <i>O</i> -(4-methylbenzoyl)chlidantinu (LC-160).....     | 42 |
| 4.5.3. Příprava 3- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)chlidantinu (LC-258).....      | 43 |
| 4.5.4. Příprava 3- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)chlidantinu (LC-259).....     | 44 |
| 4.5.5. Příprava 3- <i>O</i> -(3-methylbenzoyl)chlidantinu (LC-255).....     | 45 |
| 4.5.6. Příprava 3- <i>O</i> -(2-methoxybenzoyl)chlidantinu (LC-254).....    | 46 |
| 4.5.7. Příprava 3- <i>O</i> -(3-methoxybenzoyl)chlidantinu (LC-253).....    | 47 |
| 4.5.8. Příprava 3- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)chlidantinu (LC-256)..... | 48 |
| 4.5.9. Příprava 3- <i>O</i> -(1-naftoyl)chlidantinu (LC-214).....           | 49 |
| 4.5.10. Příprava 3- <i>O</i> -(2-naftoyl)chlidantinu (LC-215).....          | 50 |
| 5. VÝSLEDKY.....  | 52 |
| 5.1. Příprava polosyntetických derivátů.....                                | 52 |
| 5.2. Screening biologických aktivit.....                                    | 53 |
| 6. DISKUZE A ZÁVĚR.....   | 55 |
| 7. SEZNAM POUZITÉ LITERATURY.....   | 57 |
| 8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....  | 64 |
| ABSTRAKT.....   | 66 |
| ABSTRACT.....   | 67 |

# 1. ÚVOD

Rostliny jsou člověkem využívány od nepaměti, především jako zdroj potravy, ale také pro své léčivé účinky. V tradičním léčitelství a medicíně byly používány různé odvary, extrakty, prášky či obklady k léčbě nejrůznějších onemocnění.<sup>[1]</sup> Příkladem může být odvar z makovic rostliny *Papaver somniferum*, který se používal k tišení bolesti.<sup>[2]</sup> Postupem času se díky rozvoji věd prohlubovaly znalosti o léčivých rostlinách a jejich účincích. Na začátku 19. století byly poprvé izolovány čisté látky přírodního původu, a to alkaloidy morfin, chinin a emetin.<sup>[3]</sup> Vzhledem ke skutečnosti, že jejich struktura byla objasněna až dlouho po jejich objevení se i dnes používají původní názvy podle rostlin, v nichž byly objeveny nebo podle jejich účinků, objevitele a fyzikálních vlastností. Tyto látky dnes slouží také jako předloha k syntéze nových sloučenin, které mají pro použití výhodnější vlastnosti.

Sekundární metabolity jsou organické látky, které jsou přítomny především ve vyšších rostlinách. Dříve se předpokládalo, že se jedná o odpadní látky, dnes jsou však považovány za důležité produkty rostlin, sloužící například k jejich ochraně. Velkou skupinou sekundárních metabolitů jsou alkaloidy, které se nachází ve více než 4000 rostlinných druzích. Odhaduje se, že až 20 % rostlin obsahuje alkaloidy. Většina rostlin obsahuje více alkaloidů najednou. Jeden z nich můžeme označit za hlavní alkaloid, ten bývá zastoupen ve větší míře než ostatní. Vedlejší alkaloidy mívají často stejnou základní strukturu jako hlavní alkaloid, pouze s odlišnými substituenty. Obsah alkaloidů v jednotlivých druzích není konstantní, ale kolísá v závislosti na mnoha faktorech jako jsou například složení půdy nebo roční období.<sup>[4][5]</sup>

Čeď Amaryllidaceae obsahuje mnoho, z farmaceutického hlediska, zajímavých alkaloidů. Jejich první zdokumentované lékařské využití se datuje do 4. století před Kristem, kdy Hippokrates z Kóu použil extrakt z rostliny *Narcissus poeticus* k léčbě nádoru dělohy.<sup>[6]</sup> V dnešní době je v klinické praxi zaveden pouze jeden Amaryllidaceae alkaloid a to galantamin, který je díky svému účinku inhibice acetylcholinesteráz (AChE) používán v léčbě Alzheimerovy choroby (AD).<sup>[7]</sup> Na druhé straně patří čeď k rostlinám způsobujícím otravy, kde můžeme jmenovat jako zástupce rody *Narcissus*, *Galanthus*, *Amaryllis* nebo *Lycoris*.<sup>[4]</sup>

AD je vážné neurodegenerativní onemocnění, které výrazně ovlivní život pacienta i celé jeho rodiny. Klinicky se projevuje jako demence a je to jedna z nejčastějších primárních příčin smrti.<sup>[7]</sup>

Amaryllidaceae alkaloidy (AA) jsou intenzivně studovány na mnoha pracovištích. Jedním z nich je Katedra farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde se již několik let zabývají výzkumem potencionálně využitelných přírodních látek

a jejich derivátů v terapii AD. V rámci tohoto výzkumu vznikla také tato diplomová práce, která se věnuje přípravě polosyntetických derivátů alkaloidu chlidantinu, který je polohovým izomerem zmíněného galantaminu.



## 2. CÍL PRÁCE

Hlavní cíle této diplomové práce byly:

1. zpracování literatury na téma polosyntetické deriváty galantaminového strukturního typu a jejich biologická aktivita,
2. příprava aromatických derivátů (esterů) alkaloidu chlidantinu,
3. strukturní identifikace připravených derivátů (NMR, MS, optická otáčivost),
4. příprava vzorků derivátů pro biologické testování,
5. analýza výsledků a sepsání diplomové práce.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. Čeleď Amaryllidaceae

Amaryllidaceae (amarylkovité) je čeleď patřící do řádu Asparagales (chřestotvaré).<sup>[8]</sup> Jedná se o třídu jednoděložných (Liliopsida), krytosemenných (Magnoliophyta) rostlin. Čeleď zahrnuje asi 60 rodů s přibližně 1000 druhy. Vyskytují se, především v oblasti jižní Ameriky, jižní Afriky a Středozeří.<sup>[9]</sup>

Nejvýznamnější a nejrozsáhlejší jsou rody *Crinum* L., *Zephyranthes* L., *Nerine* L., *Leucojum* L., *Galathus* L., *Narcissus* L., *Amaryllis* L. Pro tuto práci je důležitý také rod *Chlidanthus* L.

Jedná se o vytrvalé byliny s cibulemi, hlízkami nebo oddenky. Stonek je většinou bezlistý. Listy mají úzké, čárkovité, většinou přízemní. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem, jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Plodem je tobolka nebo bobule.<sup>[10][11]</sup>

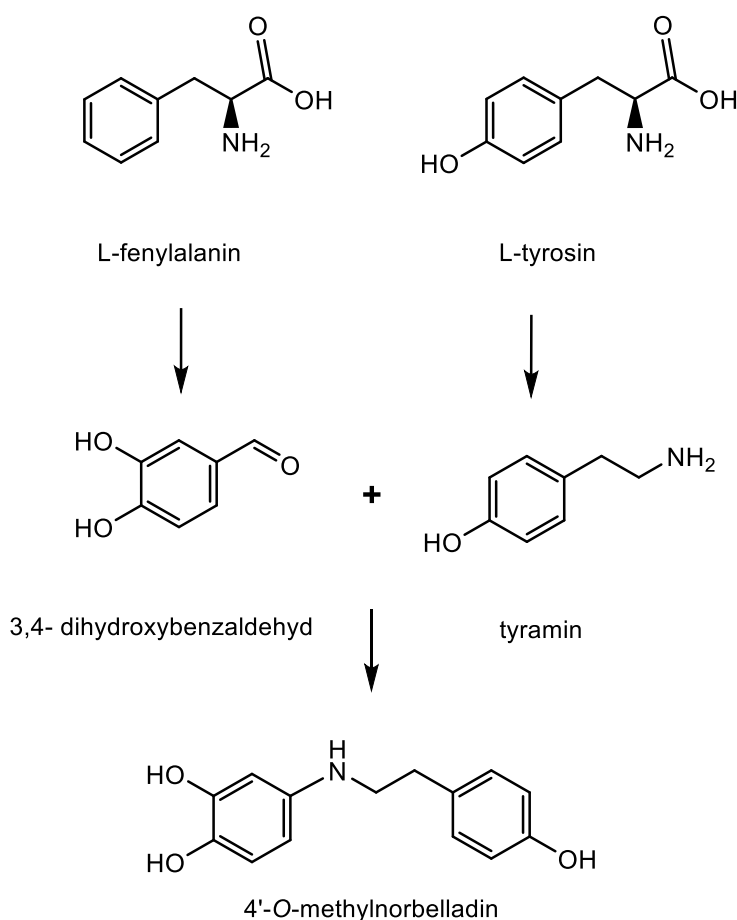
Pro čeleď je typický výskyt specifické skupiny alkaloidů, které podle názvu čeledi označujeme jako Amaryllidaceae alkaloidy. Tyto alkaloidy se nachází v celé rostlině, ale jejich největší koncentrace je v cibuli. V literatuře je popsáno mnoho účinků od protinádorových, inhibice AChE, antifungálních, antivirových, antibakteriálních, antimalarických, až po účinky analgetické.<sup>[12]</sup>

Pro své účinky mají tyto rostliny použití také v tradiční medicíně, v Jižní Africe se například rostlina *Boophone disticha* používá k léčbě duševních chorob jako jsou deprese, demence nebo epilepsie. Rostlina *Clivia miniata* je zase používána k léčbě neplodnosti a k vyvolání a usnadnění porodu. Některé rostliny vykazují také halucinogenní účinky, díky nimž jsou používány při rituálech domorodých kultur. K tomu jsou využívány kupříkladu rostliny *Pancratium tenuifolium* a *Brunsvigia radulosa*.<sup>[9]</sup> Odvar z rostlin rodu *Ammocharis* se používá k léčbě otevřených ran, z cibulí rodu *Brunsvigia* zase k léčbě kašle a nachlazení. Rostliny rodu *Crinum* jsou využívány jako silná emetika, v Asii a Americe k léčbě nádorů a v Indii jako *rubefaciens* při léčbě revmatismu.<sup>[13]</sup>

#### 3.2. Amaryllidaceae alkaloidy a jejich biosyntéza

Alkaloidy jsou přírodní organické látky obsahující dusík v heterocyklickém kruhu. Jejich název alkaloid pochází od alkalické povahy, a proto mají schopnost s kyselinami tvořit soli. Ve

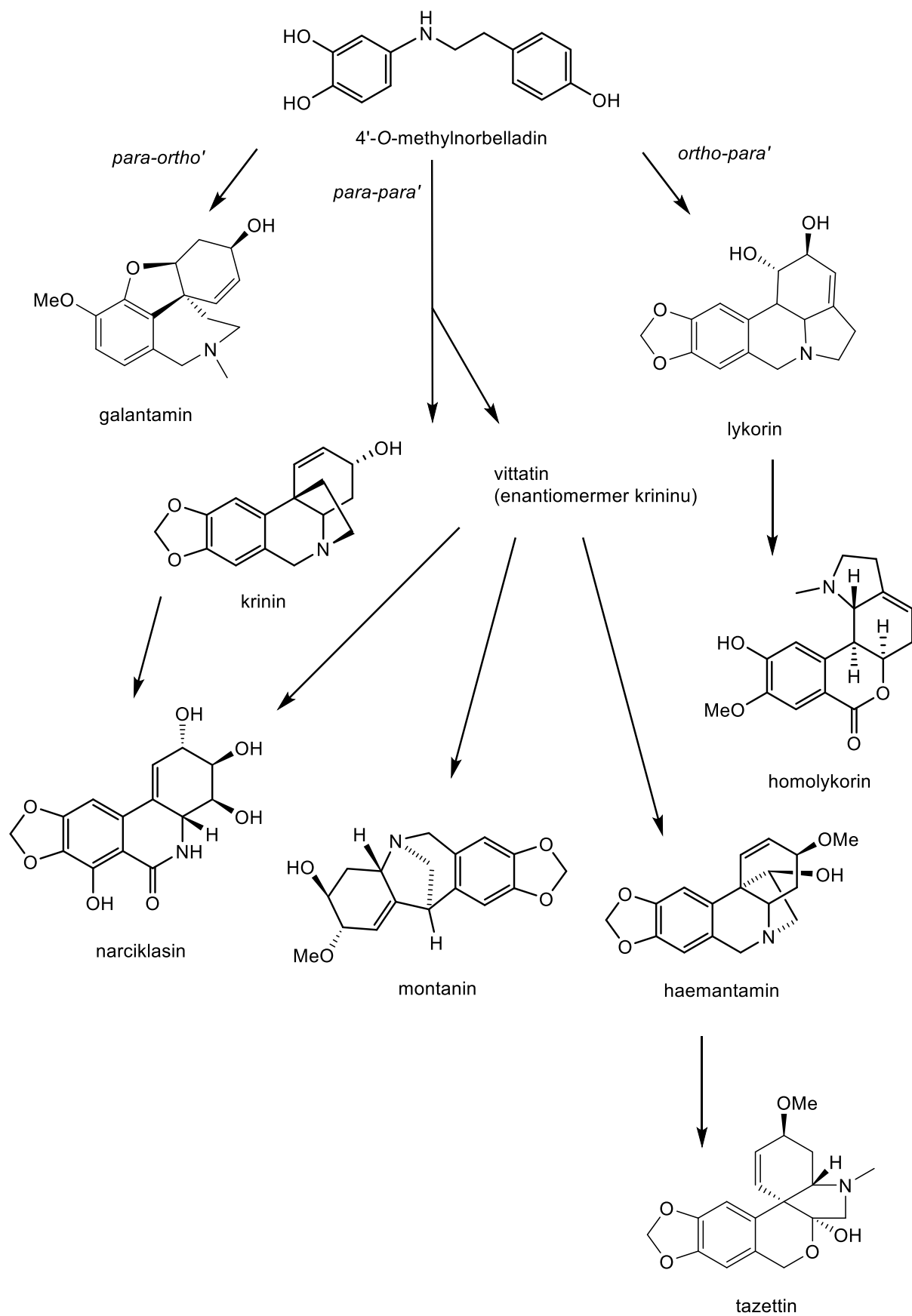
formě volných bází mají lipofilní povahu, díky které jsou ve vodě málo rozpustné. Biosyntéza alkaloidů vychází u většiny z aminokyselin. Alkaloidy třídíme podle struktury do několika skupin na protoalkaloidy (neheterocyklické), vlastní alkaloidy a pseudoalkaloidy, které můžeme rozdělit ještě na terpenické a steroidní. Vlastní alkaloidy můžeme dále dělit podle obsažené heterocyklické sloučeniny na isochinolinové, indolové, chinolinové, imidazolové, pyridinové, piperidinové, chinolizidinové a tropanové. AA řadíme mezi isochinolinové alkaloidy, díky jedné z výchozích látek, kterou je aminokyselina tyrosin. Na rozdíl od ostatních alkaloidů ze skupiny nevznikají ze dvou molekul tyrosinu, ale spojením tyrosinu s další aminokyselinou fenylalaninem.<sup>[5]</sup> Syntéza AA probíhá specifickou cestou, kterou podle klíčového meziprojektu označujeme jako tzv. norbelladinovou cestu. Výchozími látkami, jak již bylo řečeno jsou L-fenylalanin a L-tyrosin. L-Tyrosin je přeměněn na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z nich po několika reakcích vzniká 4'-O-methylnorbelladin (Obr. 1).<sup>[6]</sup>



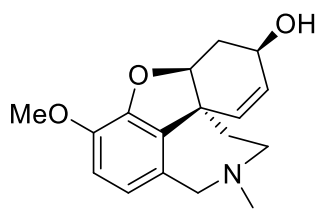
**Obr. 1:** Zjednodušené schéma biosyntézy 4'-O-methylnorbelladinu<sup>[6]</sup>

Na základě 3 typů cyklizace, *ortho-para'*, *para-para'* a *para-ortho'* (Obr. 2) vznikají různé strukturní typy AA, které jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce. Spojením *ortho-para'* vzniká lykorinový (lykorin) a homolykorinový typ (homolykorin). Spojením *para-para'* vzniká krinanový (krinin), haemantaminový (heamantamin), tazettinový (tazettin), narciklasinový (narciklasin) a montaninový typ (montanin). Spojením *para-ortho'* vzniká galantaminový typ (galantamin). Norbelladin jako prekurzor je také jedním ze strukturních typů.<sup>[6]</sup>

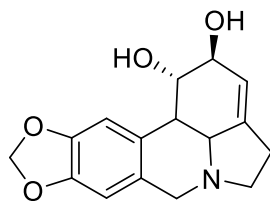
Na dalším obrázku (Obr. 3) jsou poté ukázány hlavní zástupci jednotlivých strukturních typů AA.



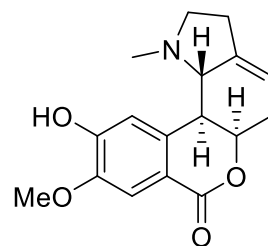
**Obr. 2:** Schéma biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů (převzato a upraveno [14][15])



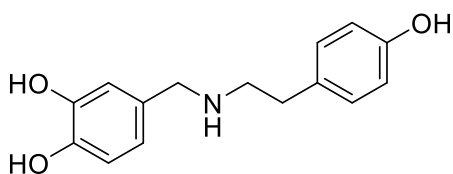
galantamin



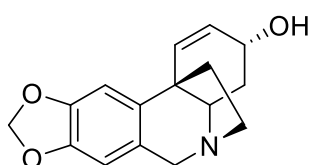
lykorin



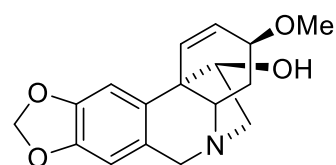
homolykorin



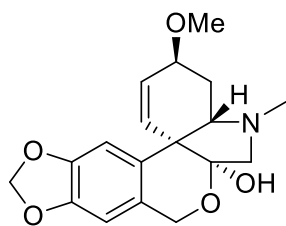
norbelladin



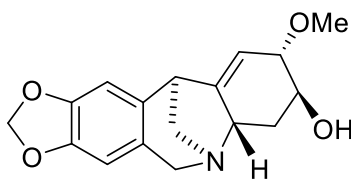
krinin



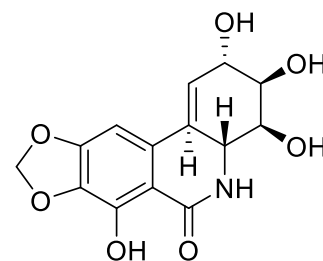
haemantamin



tazettin



montanin

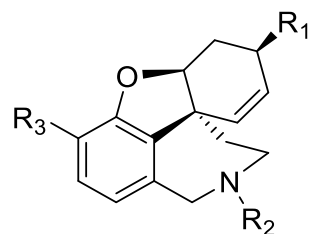


narciklasin

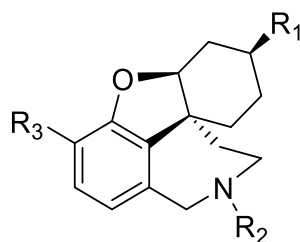
**Obr. 3:** Struktura základních typů Amaryllidaceae alkaloidů

### 3.3. Galantaminový strukturní typ

Tento strukturní typ je jediným, který vzniká *para-ortho* 'cyklizací. Mezi alkaloidy tohoto typu řadíme například galantamin, norgalantamin, chlidantin, sanguinin, lykoramin a norlykoramin. <sup>[16][17]</sup>



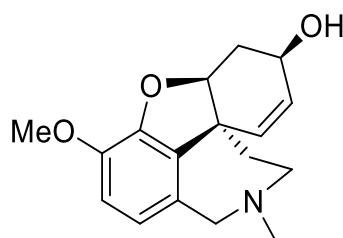
|                      |                     |                      |               |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------|
| R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = Me | R <sub>3</sub> = OMe | Galantamin    |
| R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OMe | Norgalantamin |
| R <sub>1</sub> = OH  | R <sub>2</sub> = Me | R <sub>3</sub> = OH  | Sanguinin     |
| R <sub>1</sub> = OMe | R <sub>2</sub> = Me | R <sub>3</sub> = OH  | Chlidantin    |



|                     |                     |                      |              |
|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|
| R <sub>1</sub> = OH | R <sub>2</sub> = Me | R <sub>3</sub> = OMe | Lykoramin    |
| R <sub>1</sub> = OH | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OMe | Norlykoramin |

**Obr. 4:** Vzorce vybraných alkaloidů galantaminového typu <sup>[16][17]</sup>

Hlavními zdroji těchto alkaloidů jsou rody *Galanthus*, *Narcissus*, *Leucojum*, *Zephyranthes*. <sup>[18][19]</sup>



galantamin

Galantamin byl původně izolován z rostliny *Galanthus nivalis* L. ve 40. letech minulého století. <sup>[14]</sup> Je selektivním reverzibilním inhibitorem AChE a zároveň zesiluje vlastní účinek

acetylcholinu na nikotinové receptory. Zatím jako jediný zástupce těchto alkaloidů se používá se v terapii AD. Díky jeho alosterickému efektu na nikotinové receptory, zasahuje i do jiných neurotransmiterových systémů jako jsou monoaminový, glutamátový nebo GABA systém. Tyto účinky z něj dělají potenciálně užitečnou molekulu v léčbě některých duševních onemocnění jako je schizofrenie nebo bipolární porucha. U galantaminu nebyla prokázána žádná cytotoxická aktivita. Mezi jeho další účinky můžeme zařadit zúžení zornic a zvýšení tonu kosterního svalstva.<sup>[5][6][20][21]</sup> Literatura uvádí jeho efekt na zesílení neuromuskulárního přenosu, ovlivněním iontových membránových procesů. Uvádí také schopnost potlačit traumatický šok, pozitivní vliv na jet-lag, únavový syndrom a mužskou impotenci. V očních kapkách snižuje nitrooční tlak. Jeho analgetické účinky jsou srovnatelné s morfinem, vykazuje slabou antimalarickou aktivitu a hypotenzní účinky. Byl také patentován k léčbě závislosti na nikotinu a alkoholu.<sup>[14]</sup>

Chlidantin je polohovým izomerem galantaminu. Liší se pouze v umístění hydroxy a methoxy skupiny (Obr. 4). Proti galantaminu má chlidantin nižší schopnost inhibice AChE. Nižší schopnost inhibice je dána pravděpodobně nemožností vytvoření intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylem na C-3 a kyslíkem na dihydrofuranovém kruhu jako je tomu u galantaminu. Chlidantin byl poprvé izolován v roce 1956 z rostliny *Chlidanthus fragrans*, poté z *Haemanthus multilflorus* a *Hippeastrum aulicum*.<sup>[19]</sup>

Sanguinin se v testech ukázal až 10krát účinnější v inhibici AChE než galantamin. Podle studie vztahu struktury a účinku se ukázalo, že správně umístěná hydroxy skupina na molekule galantaminu přispívá k efektivnější vazbě na AChE. Právě díky jedné hydroxylové skupině navíc k interakci s AChE je sanguinin silným inhibitorem.<sup>[18]</sup> Bohužel ta ho činí také hydrofilnějším než galantamin a redukuje jeho schopnost přejít přes hematoencefalickou bariéru, díky tomu se v praxi nepoužívá.<sup>[22]</sup> Dalším důvodem, proč se nepoužívá, je jeho obtížné získávání, v rostlinách se vyskytuje pouze ve stopovém množství.<sup>[23]</sup>

Lykoramin a norlykoramin prakticky nedisponují inhibičním potenciálem proti AChE. Je to pravděpodobně v důsledku nepřítomnosti dvojné vazby v kruhu C, díky čemuž nemohou zaujmout prostorovou konfiguraci potřebnou pro inhibici AChE jako jiné alkaloidy z této skupiny.<sup>[18]</sup>

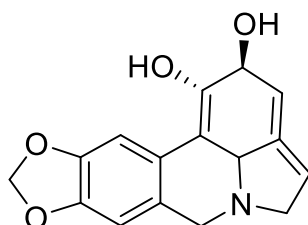


**Tabulka 1:** Inhibiční aktivita proti AChE alkaloidů galantaminového typu vyjádřená jako IC<sub>50</sub> [15] [18][19]

| Alkaloid     | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------------|-----------------------|
| Galantamin   | 1,07 ± 0,18 [18]      |
| Chlidantin   | 24,10 ± 5,0 [19]      |
| Sanguinin    | 0,10 ± 0,01 [18]      |
| Lykoramin    | 456 ± 57 [15]         |
| Norlykoramin | >> 1000 [18]          |

### 3.4. Biologická aktivita dalších Amaryllidaceae alkaloidů

#### 3.4.1. Lykorin



Lykorin poprvé byl izolován v roce 1877 z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*, jako vůbec první AA. Díky tomuto faktu a jeho častému zastoupení v rostlinách čeledi Amaryllidaceae, má také nejvíce prostudovanou biologickou aktivitu.<sup>[14][24]</sup> Dalšími rostlinami, ve kterých je hojně zastoupený lykorin jsou *Lycoris radiata*, *Leucojum aestivum*, *Hippeastrum equestre* nebo rod *Clivia*.<sup>[24]</sup>

Nejvýraznějším účinkem je protinádorová aktivita, která byla prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo* na různých typech nádorových buněk. V dalších studiích bylo také zjištěno, že jeho účinky jsou selektivní k nádorovým buňkám a na zdravé buňky nemají takový efekt (15x vyšší účinnost na nádorové než na normální buňky).<sup>[14][25]</sup> Mechanismus cytotoxického účinku lykorinu nebyl doposud zcela objasněn, ale studie ukazují, že hlavní mechanismy jsou spojeny s inhibicí proliferace a indukci apoptózy u nádorových buněk. Proliferaci u HL-60 buněk inhibuje lykorin zastavením buněčného cyklu v G2/M fázi, down-regulací Mcl-1 proteinu a up-regulací inhibitoru cyklin-dependetní kinázy p21 a TNF-α. Mcl-1 protein patří do rodiny proteinů Bcl-2, které mají rozhodující vliv na regulaci apoptózy.<sup>[6]</sup> Protein Mcl-1 inhibuje apoptózu interakcí s proapoptickými proteiny. Nadměrnou expresi proteinu Mcl-1 můžeme pozorovat u myeloidních progenitorových buněk. Buněčný cyklus mnohočetného myelomu KM3 zastavuje ve fázi G0/G1 down-regulací CD1 a CDK4, inhibicí aktivity HDAC a up-

regulací p53 a tím p21.<sup>[26]</sup> Lykorin hydrochlorid je schopný indukovat apoptózu MCF-7 rakoviny prsu přes dráhu receptoru smrti (Fas/FasL).<sup>[27]</sup> U buněk T24 nádoru močového měchýře lykorin indukuje apoptózu inhibicí exprese fosforylované proteinkinázy B a následnou aktivací kaspázy-3 a Bax (aktivátor apoptózy) *in vitro*.<sup>[28]</sup> Následující tabulka (Tab.2) souhrnně ukazuje protinádorovou aktivitu lykorinu.

**Tabulka 2:** Hodnoty IC<sub>50</sub> lykorinu na nádorových buněčných liniích <sup>[26][29][30][31]</sup>

| Typ nádoru                    | Buněčná linie | IC <sub>50</sub> (μM) |
|-------------------------------|---------------|-----------------------|
| leukémie                      | HL-60         | 1                     |
|                               | K562          | 1,25                  |
|                               | U937          | 2,42                  |
|                               | CEM           | 1,6 ± 0,0             |
| nádor vaječníku               | Hey1B         | 1,2                   |
| mnohočetný myelom             | KM3           | 1,25                  |
| adenokarcinom prsu            | MCF-7         | 13,0 ± 2,9            |
| adenokarcinom tl.střeva       | HT-29         | 3,2                   |
| karcinom jater                | HepG2         | 3,7                   |
| melanom                       | G-361         | 5,0 ± 0,3             |
|                               | C8161         | 1,2                   |
|                               | SKMEL-28      | 8,4 ± 0,2             |
|                               | B16F10        | 6,3 ± 0,2             |
| Adenokarcinom děložního čípku | Hela          | 10,6 ± 0,9            |
| nádor plic                    | A549          | 4,2 ± 0,4             |
| nádor plic                    | LLC           | 0,5                   |
| glioblastom                   | Hs683         | 6,9 ± 0,5             |
|                               | U373          | 7,6 ± 0,4             |
| nádor jícnu                   | OE21          | 4,5 ± 0,7             |

Antivirová aktivita lykorinu byla dokázána několika studii. Byla zjištěna aktivita proti polioviru, SARS coronaviru, HIV, flaviviru, ptačí chřipce, herpes viru typu 1 či viru neštovic.<sup>[14][26][32]</sup> Mechanismus účinku není plně objasněn. Jedna ze studií označila za mechanismus účinku inhibici virové RNA replikace a potlačení virové syntézy proteinů <sup>[26]</sup>, druhá inhibici pomnožení a inhibici virové DNA polymerázy.<sup>[14]</sup>

Studie z roku 2014 zkoumala antifungální aktivitu lykorinu na kolekci 24 patogenních hub *in vitro*. Nejúčinnější se ukázal lykorin proti houbám *Alternaria oleracea*, *Fusarium graminearum* a *Colletotrichum gloeosporioides* (Tab. 3). Naopak nejnižší míra inhibice byla proti *Fusarium oxysporum*. Mechanismus účinku je pravděpodobně poškození buněčné membrány a ovlivnění metabolismu. Lykorin jako přírodní léčivá chemická látka by mohl být použit jako fungicid nebo se stát předlohou pro vývoj nového biologického fungicidu.<sup>[33]</sup>

**Tabulka 3:** Míra inhibice lykorinu proti 24 patogenním houbám *in vitro* <sup>[33]</sup>

| patogenní houba rostlin                               | Inhibice v % |          |
|---|--------------|----------|
|   | 500µl/ml     | 100µl/ml |
| <i>Alternaria oleracea</i> M. Ibrath                  | 78,1         | 61,9     |
| <i>Fusarium graminearum</i>                           | 74,7         | 63,7     |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz et Sacc    | 73,9         | 57,2     |
| <i>Alternaria solani</i> (Ell et Mart) Jones et Grout | 73,9         | 48,5     |
| <i>Fusarium graminearum</i> Schw                      | 62,3         | 21,8     |
| <i>Pleospora lycopersici</i>                          | 61,3         | 52,6     |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>   | 60,3         | 70,1     |
| <i>Pseudocercospora variicola</i> (Wint.) Guo et Liu  | 58,8         | 46,1     |
| <i>Cercospora arachidicola</i> Hori                   | 54,6         | 45,5     |
| <i>Fusarium oxysporum</i>                             | 53,4         | 42,9     |
| <i>Exserohilum turcicum</i>                           | 51,4         | 42,6     |
| <i>Colletotrichum ophiopogonis</i>                    | 51,2         | 63,2     |
| <i>Cercospora personata</i> Berk et Curt              | 47,1         | 28,2     |
| <i>Rhizoctonia cereali</i>                            | 45,4         | 51,1     |
| <i>Corynespora cassiicola</i>                         | 44,1         | 35,1     |
| <i>Alternaria alternata</i>                           | 43,8         | 13,2     |
| <i>Gloeosporium loeosporium</i> sp.                   | 42,6         | 30,9     |
| <i>Bipolaris carbonum</i> Wilson                      | 36,1         | 36,1     |
| <i>Phytophthora vignae</i> Purss                      | 30,8         | 15,9     |

**Tabulka 3:** Míra inhibice lykorinu proti 24 patogenním houbám *in vitro* <sup>[33]</sup> (pokračování)

|   |      |      |
|---|------|------|
| <i>Cladosporium ladosporium</i> sp                        | 28,2 | 29,3 |
| <i>Alternaria pluriseptata</i>                            | 23,3 | 16,9 |
| <i>Fusarium pointed</i> watermelon                        | 9,9  | 4,8  |
| <i>Trichoderma atrovoride</i>                             | 15,5 | 12,2 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>vasinfectum</i> | 3,6  | 0    |

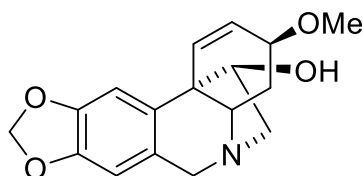
Inhibice AChE je spojená s lykorinovým a galantaminovým strukturním typem, ale samotný lykorin ji postrádá.<sup>[19][34]</sup> Z aktivních alkaloidů lykorinového typu můžeme jmenovat například assonin, oxoassonin a 1-*O*-acetyllykorin.<sup>[14][36]</sup>

Lykorin je silným inhibitorem syntézy kyseliny askorbové. Konkrétně je inhibitorem L-galaktono- $\gamma$ -laktondehydrogenázy, což je terminální enzym syntézy kys. askorbové nacházející se v mitochondriální membráně.<sup>[14][26]</sup>

Antimikrobiální účinky lykorinu ukazuje inhibice růstu několika kmenů *Saccharomyces cerevisiae* a *Trichomonas vaginalis*. Je také nejúčinnějším alkaloidem proti *Plasmodium falciparum* s hodnotou IC<sub>50</sub> 0,13  $\mu$ M.<sup>[26][35]</sup>

Mezi vlastnosti lykorinu patří také inhibice růstu a dělení buněk vyšších rostlin a řas, inhibice dýchání resistantního ke kyanidu nebo protizánětlivé účinky.<sup>[25]</sup> Můžeme u něj pozorovat i analgetické účinky, které jsou vyšší než u aspirinu, pravděpodobně díky jeho podobnosti se strukturou morfinu a kodeinu. Lykorin dále vykazuje broncholytické a antiarytmické účinky stimulací  $\beta$ -adrenergní receptorů.<sup>[14]</sup> Rostlina *Lycoris radiata*, ve které je lykorin obsažen, je používána v tradiční čínské medicíně pro už výše popsané účinky.<sup>[26]</sup>

### 3.4.2. Haemantamin



Haemantamin je hojně se vyskytující AA, který byl poprvé byl izolován z rostlin rodu *Haemanthus*. Dále ho můžeme nalézt například v rostlinách rodů *Crinum*, *Narcissus*, *Hymenocallis* a *Zephyranthes*.<sup>[36]</sup>

Haemantamin je schopný překonat rezistenci nádorových buněk k apoptóze, díky tomu ho můžeme považovat za potenciálně využitelnou protinádorovou látku. Zasahuje velkou

podjednotku ribozomu přeskupením rRNA a zastavením elongační fáze translace. Ukázalo se také, že haemantamin a další AA jsou schopni specificky inhibovat ribozomální biogenezi a spouští stresovou odpověď jádérka, což vede ke stabilizaci p53. P53 je transkripční faktor zabráňující vzniku nádorů.<sup>[37]</sup>

Haemantamin vykazuje výraznou *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti různým typům rakovinových buněčných linií (MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, A2780, SW1573, T47-D, WiDr). Vykazuje také aktivitu proti fibroblastům A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL, B16F10. Přehled cytotoxické aktivity ukazuje následující tabulka (Tab. 4). Porovnání antiproliferativních aktivit alkaloidů vittatinu, 11-hydroxyvittatinu, haemantaminu a haemantidinu ukázalo důležitost přítomnosti methoxy skupiny na C3 a OH skupiny na C11 pro tuto aktivitu.<sup>[38][39]</sup>

**Tabulka 4:** Hodnoty IC<sub>50</sub> haemantaminu proti vybraným nádorovým buněčným liniím <sup>[38][40][41]</sup>

| <b>buněčná linie</b> | <b>IC<sub>50</sub> (μM)</b> |
|----------------------|-----------------------------|
| A2780                | 0,68 ± 0,2                  |
| SW1573               | 2,1 ± 2,0                   |
| T47-D                | 0,87 ± 0,4                  |
| WiDr                 | 1,2 ± 0,5                   |
| CaCo-2               | 0,99 ± 0,14                 |
| HT-29                | 0,59 ± 0,01                 |
| CEM                  | 2,1 ± 0,4                   |
| K562                 | 3,4 ± 1,6                   |
| MCF-7                | 8,1 ± 3,3                   |
| HeLa                 | 7,0 ± 2,2                   |

Nedávné studie ukázaly enzym glykogen syntázu kinázu 3β (GSK-3β) jako potencionální terapeutický cíl u AD, bipolární poruchy, mrtvice, více než 15 typů rakoviny a diabetu. GSK-3β pravděpodobně hraje svoji roli u nádorů rezistentních k chemo-, radio-, nebo cílené terapii. Na základě uvedených skutečností by inhibitory GSK-3β mohly být použity v terapii. V rámci studie v roce 2018 byla studována aktivita AA vůči GSK-3β. Z doposud studovaných AA se nejúčinnějším ukázal alkaloid masonin (homolykorinový typ). Z alkaloidů haemantaminového strukturního typu byl nejúčinnějším samotný haemantamin. (Tab.5).<sup>[42]</sup>

**Tabulka 5:** Amaryllidaceae alkaloidy haemantaminového typu a jejich vliv na inhibici GSK-3 $\beta$  v porovnání s alkaloidem masoninem <sup>[42]</sup>

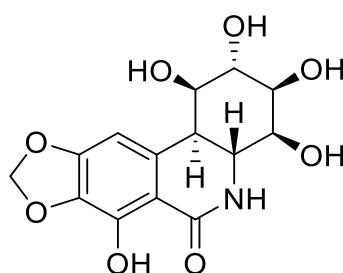
| alkaloid             | % inhibice (50 $\mu$ M) |
|----------------------|-------------------------|
| haemantamin          | 52,4 $\pm$ 0,1          |
| epimaritidin         | 45,2 $\pm$ 1,1          |
| haemantidin          | 33,0 $\pm$ 2,2          |
| hamayn               | 33,9 $\pm$ 0,1          |
| seko-isopowellaminon | 38,5 $\pm$ 0,8          |
| masonin              | 66,0 $\pm$ 4,0          |

Studie z roku 2015 zkoumala antimikrobiální aktivitu AA. Haemantamin vykazoval určitou antimikrobiální aktivitu proti *Candida albicans* (MIC<sub>80</sub> = 512  $\mu$ g/ml), *Candida dubliniensis* (MIC<sub>80</sub> = 512  $\mu$ g/ml) a *Lodderoyces elongiosporus* (MIC<sub>80</sub> = 256  $\mu$ g/ml).<sup>[43]</sup>

Haemantamin a další AA, jako lykorin a homolykorin, jsou schopni inhibovat *in vitro* replikaci HIV (human immunodeficiency virus) typu 1 inhibicí reverzní transkriptázy.<sup>[29][44]</sup>

Haemantamin neprokázal žádnou aktivitu v inhibici AChE.<sup>[44]</sup> Mezi jeho další účinky ale můžeme zařadit antimalarickou aktivitu. Malárie je parazitární infekce způsobená prvoky rodu *Plasmodium*, kde nejčastější je *P. falciparum* a *P. vivax*. Haemantamin vykazuje aktivitu proti *P. falciparum*.<sup>[14][45]</sup>

### 3.4.3. Pankratistatin



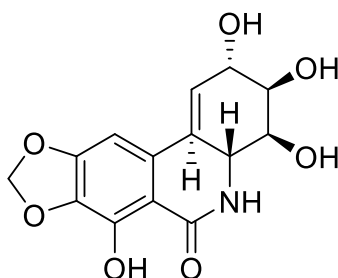
Pankratistatin byl poprvé izolován z rostliny *Pancreatum littorale*.<sup>[46]</sup> Dále ho můžeme nalézt v rostlinách *Pancreatum maritimum* nebo *Hymenocallis kalbreyeri*.<sup>[47]</sup> Pankratistatin disponuje antineoplastickými (protinádorovými) účinky. Výsledky některých studií ukazují, že místem účinku by mohla být selektivní indukce apoptózy v nádorových buňkách a působení v mitochondriích. V nádorových buňkách pankratistatin způsobuje zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS), snížené hladiny ATP a permeabilitu mitochondriální membrány, což

ukazuje na aktivaci mitochondriální cesty apoptózy. V kombinaci s antiestrogenní látkou Tamoxifenem má pankratistatin synergický účinek v indukci apoptózy u buněk nádorů prsu.<sup>[48]</sup> Působí také na nádorové buňky v kolon a snižuje jejich životaschopnost. (Tab. 6).<sup>[49]</sup>

**Tab. 6:** Hodnoty IC<sub>50</sub> pankratistatinu proti nádorovým buněčným liniím kolon a nenádorové buněčné linii CDD-18Co<sup>[49]</sup>

| Buněčná linie | IC <sub>50</sub> (μM) |
|---------------|-----------------------|
| HT-29         | 25                    |
| HCT-15        | 15                    |
| SW948         | 20                    |
| DLD-1         | 25                    |
| CDD-18Co      | >100                  |

#### 3.4.4. Narciklasin



Alkaloid narciklasin byl poprvé izolován z rostlin rodu *Narcissus*, ale je také obsažen v rostlinách rodů *Galanthus*, *Haemanthus* nebo *Leucojum*.<sup>[50]</sup> Narciklasin má antimitotické a proti rakovinové účinky. Zasahuje buněčné dělení ve stádiu metafáze a inhibuje proteosyntézu v ribozomech eukaryotických buněk tím, že interaguje s 60S podjednotkou a inhibuje vznik peptidové vazby. Působí proti celé řadě nádorových buněk (karcinom hrtanu, děložního čípku, Erlichovy nádorové buňky, lidská a myší lymfocytární leukemie). Působí také proti bakterii *Corynebacterium fascians* a kvasince *Cryptococcus neoformans*.<sup>[14]</sup> Narciklasin vykazuje i antivirovou aktivitu, kde působí na flavivirus (žlutá zimnice), bunavirus, alphavirus, lentivirus a vaccinia virus.<sup>[51]</sup> Je schopen inhibice růstu a stabilizace HeLa buněk *in vivo*.<sup>[52]</sup> Inhibuje také kalprotekinem indukovanou cytotoxicitu v 10krát nižší koncentraci (IC<sub>50</sub>= 0,001-0,01 μg/m) než lykorin, mohl by tak být používán jako látka snižující aktivitu zánětu.<sup>[53]</sup>

### **3.5. Alzheimerova choroba**

#### **3.5.1. Definice a příznaky**

Alzheimerova choroba je vážné, chronické, nevratné onemocnění charakterizované progresivní degenerací mozku. Můžeme ji zařadit pod souhrnný pojem demence, jedná se o jeden z jejích nejčastějších typů (až 2/3 případů). S prodlužující se délkou života populace přibývá počet pacientů trpících touto chorobou.<sup>[54]</sup> Nejčastěji se projeví kolem 60. roku života. Během průběhu tohoto onemocnění můžeme pozorovat změny na úrovni orgánové, buněčné i biochemické. Z orgánového pohledu jde o postupný úbytek mozkové tkáně, díky němuž se rozvíjí příznaky AD. Nervové buňky neboli neurony produkují za normálních okolností neuromediátory jako jsou acetylcholin (ACh), dopamin, serotonin, noradrenalin nebo kyselina  $\gamma$ -aminomáselná. Jejich ztráta, a z toho plynoucí nedostatek neuromediátorů, se projeví poruchou mozkových funkcí. Další změnou v mozku pacientů je tvorba lézí, která je pravděpodobně důsledkem patologického působení některých enzymových systémů. Tyto léze dále poškozují neurony a způsobují jejich smrt. Dochází k uvolnění různých mediátorů zánětu na jejichž základě vzniká sterilní zánět, který poškodí další neurony. Odumírání nervových buněk pozorujeme především v oblasti mozkové kůry a hippocampu.<sup>[15]</sup>

AD začíná postupným zhoršováním krátkodobé paměti, která z počátku nemusí být snadno rozpoznána, později však ovlivní běžný život nemocného. Následně se přidávají problémy s prováděním běžných denních činností, problémy s vyjadřováním, hledání správných slov, časová a místní dezorientace, ztráta logického myšlení, střídání nálad a změny chování. V pokročilých stádiích dochází až ke změně osobnosti, kdy se člověk stává nedůvěřivým, zmateným a někdy útočným. Konečným stádiem je deteriorace osobnosti.<sup>[55][56]</sup>

#### **3.5.2. Hypotézy patogeneze**

Přesná příčina vzniku AD není dodnes plně objasněna, existuje však celá řada hypotéz. Mezi nejznámější patří cholinergní hypotéza, hypotéza amyloidní kaskády a hypotéza mikrotubulové nestability. V literatuře jsou dále zmiňovány: teorie glutamátové neurotoxicity, hypotéza oxidativního stresu a oxidativní nerovnováhy, teorie oxidu dusnatého, koncepce regulace a ovlivňování původních molekul a koncepce mírných kognitivních poruch.<sup>[57]</sup>

##### **3.5.2.1. Cholinergní hypotéza**

Cholinergní hypotéza byla poprvé vyslovena v roce 1981. Bylo dokázáno, že při AD je snižená hladina acetylcholinu v mozku. ACh působí jako neurotransmitter, který ovlivňuje



kognitivní funkce jako jsou paměť nebo učení. ACh je syntetizován enzymem cholinacetyltransferazou z aminokyseliny cholinu a acetyl-CoA. Porušením neuronů dochází ke snížení tohoto enzymu, a naopak ke zvýšení enzymů AChE a BuChE, které ACh rozkládají.<sup>[15]</sup> Za fyziologických podmínek je ACh většinou rozkládán AChE, BuChE má jen minoritní zastoupení. U pacientů s AD je v místě senilních plaků více tvořena BuChE a tím stoupá její význam při odbourávání ACh. AChE existuje ve třech izoformách, které podle počtu katalytických podjednotek je označujeme G1, G2 a G4. Isoforma G4 se vyskytuje jako volná i vázaná v membráně a u zdravého člověka převládá nad G1. Isoforma G1 existuje pouze ve volné formě. BuChE má také více molekulárních izoform, ve zralém mozku ale převládá izoforma G4. Během AD dochází ke změnám v podílovém zastoupení jednotlivých izoform, podíl G4 AChE i BuChE klesá a podíl izoformy G1 roste. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny  $\beta$ -amyloidem.<sup>[58][59]</sup>

Na základě této hypotézy byly do výzkumu zařazeny látky, které by mohly zvýšit hladiny ACh v mozku. Patří sem inhibitory AChE, agonisté cholinergních neuronů, látky uvolňující ACh a látky stimuluji proliferaci cholinergních neuronů. První látkou zařazenou do terapie AD byl inhibitor cholinesteráz takrin. Bohužel díky jeho hepatotoxicitě se dnes již nepoužívá.<sup>[57]</sup>

### 3.5.2.2. Hypotéza amyloidní kaskády

Histopatologické léze, především senilní plaky a neuronální klubka, jsou dalším znakem AD. Důležitým patogenetickým faktorem je přítomnost  $\beta$ -amyloidu. Ten vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP) štěpením především  $\alpha$ -sekretázou, dále pak  $\beta$ -sekretázou (BACE1) a  $\gamma$ -sekretázou.<sup>[60]</sup> Za normálních podmínek vzniká rozpustný  $\beta$ -amyloid, který je fyziologický a hraje roli například při tvorbě nových synapsí. Za patologických podmínek AD štěpí většinu APP  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy a postupně vznikají nerozpustné neurotoxické oligomery  $\beta$ -amyloidu. Ty poté polymerují a spolu s dalšími částmi, jako jsou poškozené axony neuronů, gliové buňky a buněčné části, vytvářejí v mezibuněčných prostorech mozkové kůry útvary, tzv. alzheimerovské (senilní) plaky. Okolo plaků dochází k projevům zánětu, jsou vylučovány volné radikály a interleukiny, a to vede k dalšímu poškození mozkových buněk.<sup>[15][61]</sup> Abnormální akumulace  $\beta$ -amyloidu je výsledkem nerovnováhy mezi jeho produkcí, agregací a odbouráváním.<sup>[62]</sup>

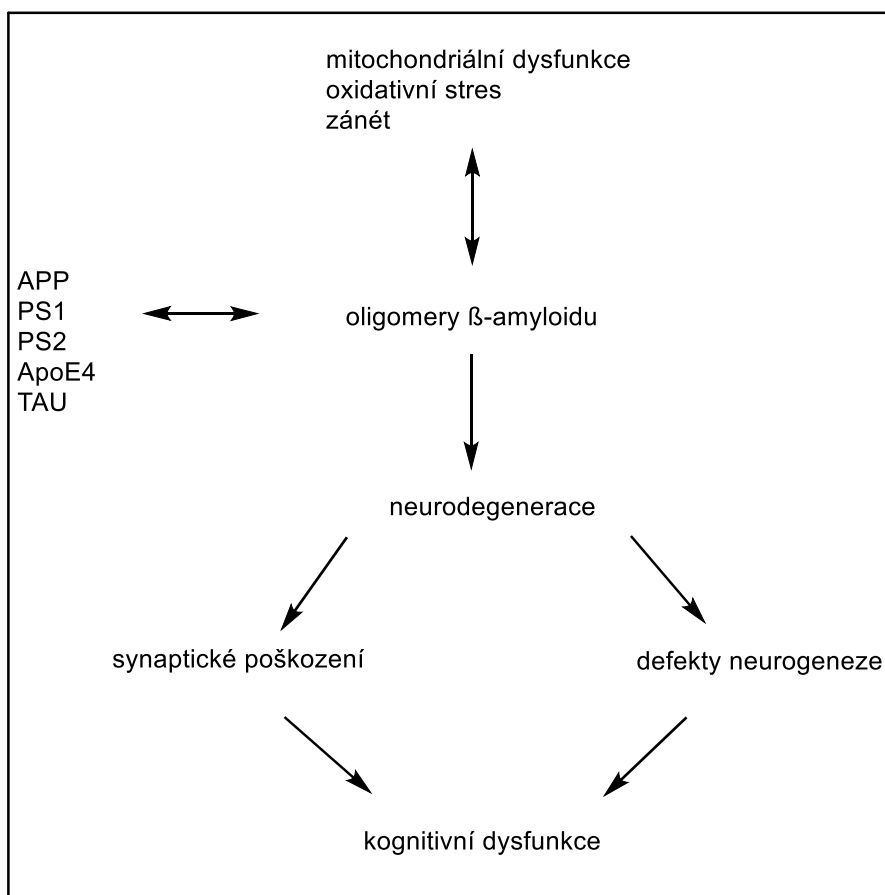
### 3.5.2.3. Hypotéza mikrotubulární nestability

Neuronální klubka tvoří ubikvitin a hyperfosforylovaný protein tau ( $\tau$ -protein). Funkcí  $\tau$ -proteinu je stabilizace buněčných neurotubulů. Za normálních podmínek se váže na tubulin, kde je následně defosforylován. Tato hypotéza je založena na akumulaci abnormálně hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu, čímž se naruší jeho transportní funkce a způsobí jeho agregaci do neurofibrilárních uzlíčků (NFT's). Poškozené neurony následně odumírají. Hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu zapříčiňuje aktivovaný enzym GSK-3 $\beta$  a enzym cyklin dependentní kináza 5 (CDK 5). Celý proces je pravděpodobně spouštěn oligomery  $\beta$ -amyloidu.<sup>[61][63]</sup>

### 3.5.2.4. Genetické faktory

V současnosti je studována také spojitost mezi genetickými faktory a vznikem onemocnění. U familiární AD bývá zjištěna mutace na dlouhém raménku chromozomu 21, kde se nachází gen pro APP. Dále na chromozomu 14, kde se nachází gen pro presenilin 1 (PS1) a chromozomu 1, kde je gen pro presenilin 2 (PS2). PS1 a PS2 jsou součástí  $\gamma$ -sekretáz. Rizikovým faktorem je také přítomnost apolipoproteinu E izoformy 4 (APOE4) jehož přítomnost může, ale také nemusí vést k AD. V současné době je věnována pozornost i souvislostem mezi metabolickými onemocněními a AD. U pacientů bývá zjištěna přítomnost inzulinové resistance, která má patrně vliv na produkci  $\beta$ -amyloidu.<sup>[61][62][63]</sup>

Zjednodušené schéma mechanismu neurodegenerace ukazuje obrázek (Obr.5), kde můžeme vidět, jak vadné buněčné procesy mohou vést k akumulaci  $\beta$ -amyloidu, a tím přispět k defektům neurogeneze a synaptickému poškození.<sup>[62]</sup>



**Obr. 5:** Mechanismus neurodegenerace u Alzheimerovy choroby (převzato a upraveno <sup>[62]</sup>)

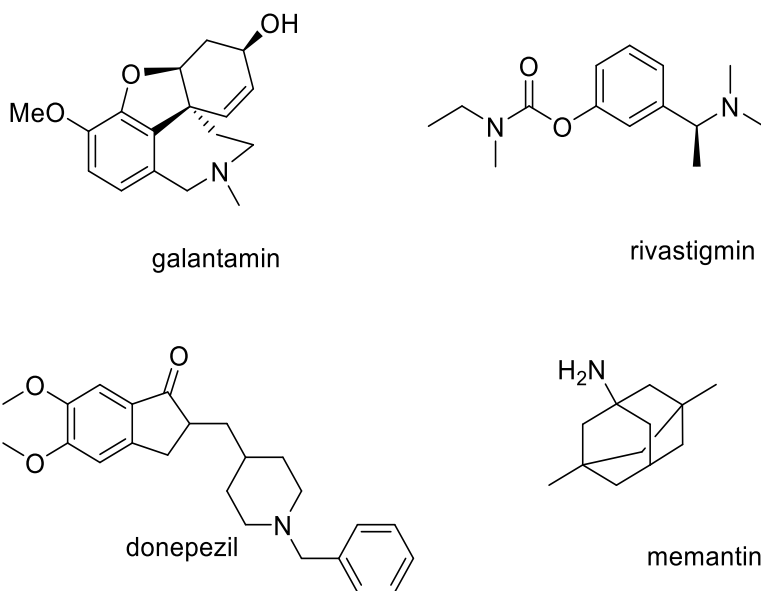
### 3.5.3. Současná léčba

Současná terapie AD je pouze symptomatická, zaměřená na zlepšení kognitivního a behaviorálního stavu pacienta a zpomalení progresu nemoci, především zvýšením hladin ACh v mozku.<sup>[60]</sup> V dnešní době používané látky, které mají prokázanou účinnost a vedou k určitému zlepšení nebo zastavení progresu onemocnění u pacientů s AD, jsou inhibitory AChE a inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů (Obr.6).<sup>[64]</sup>

Jak již bylo zmíněno výše, už na začátku onemocnění je porušen cholinergní systém, je snížena tvorba a uvolnění acetylcholinu z presynaptických zakončení a zároveň jeho zvýšené odbourávání, díky vyšším hladinám enzymů cholinesteráz. Zástupci skupiny v současné době používaných inhibitorů AChE jsou galantamin, rivastigmin a donepezil. Používají se pro mírná až středně těžká stádia AD.<sup>[7][61][64]</sup> Donepezil je syntetický, selektivní, reverzibilní, nekompetitivní inhibitor AChE. Jeho výhodou je také schopnost podporovat správné štěpení APP, snížení koncentrace glutamátu a antioxidační působení.<sup>[15][20]</sup> Rivastigmin je polosyntetický derivát alkaloidu fysostigminu. Působí jako pseudo-irreversibilní inhibitor AChE i BuChE, díky tomu má také delší biologický poločas. V praxi u něj využíváme, jako u

jediného, dvě cesty podání, orální a transdermální. Transdermální forma se vyznačuje lepší snášenlivostí a jednoduchou aplikací.<sup>[65]</sup> Galantamin je selektivním reverzibilním inhibitorem AChE a zároveň zesiluje vlastní účinek acetylcholinu na nikotinové receptory. Díky jeho alosterickému efektu na nikotinové receptory, zasahuje i do jiných neurotransmitterových systémů jako jsou monoaminový, glutamátový nebo GABA systém. Po perorálním podání se snadno vstřebává.<sup>[5][21]</sup> Nevýhodou inhibitorů AChE jsou jejich gastrointestinální (GIT) nežádoucí účinky, které jsou výsledkem jejich působení na periferní nervový systém.<sup>[7]</sup>

S progresí AD dochází k poškození glutamatergního systému, který je významný pro učení a paměť. Dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu a jiných excitačních kyselin, a to má za následek nadměrnou stimulaci NMDA receptorů. NMDA receptory otevírají iontové kanály pro  $\text{Ca}^{2+}$ , což je, mimo jiné, důležité pro učení a paměť. Při nadměrném stimulaci receptorů dochází ke zvýšenému průniku  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky, dochází k aktivaci různých enzymů a procesů v buňce, a to má poté za následek její apoptózu. V praxi se pro léčbu střední až těžké demence používá memantin, který řadíme mezi nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů. Memantin je zároveň agonistou dopaminu, tato vlastnost je využitelná např. u Parkinsonovy nemoci.<sup>[7][15][66]</sup>



**Obr. 6:** Látky v terapii Alzheimerovy choroby<sup>[20]</sup>

Mezi podpůrnou léčbu, kterou využíváme především v prvotních stádiích onemocnění, můžeme zařadit např. neuroprotektivní strategie zahrnující použití cerebrolysinu, což je hydrolyzát vepřové mozkové tkáně. Skládá se z aminokyselin a krátkých peptidů, které jsou prekurzory nervových růstových faktorů. Vitamín E se používá pro svoji schopnost vychytávat volné kyslíkové radikály, které jsou u neurodegenerativních chorob nadměrně produkovány a vedou k poškození mozkové tkáně.<sup>[7][62]</sup> Dále se také používají nootropika, extrakty z rostliny *Ginkgo biloba* L. a psychofarmaka, nejčastěji antidepressiva. Antidepressiva jsou v terapii využívány zejména kvůli poruchám chování, depresím, úzkostným poruchám, agitovanosti či apatii. V dnešní době se od této strategie již upouští, protože nežádoucí účinky převyšují jejich výhody. Nesmíme také zapomínat na nefarmakologická opatření, jako je psychoterapie a fyzické cvičení.<sup>[15][54]</sup>

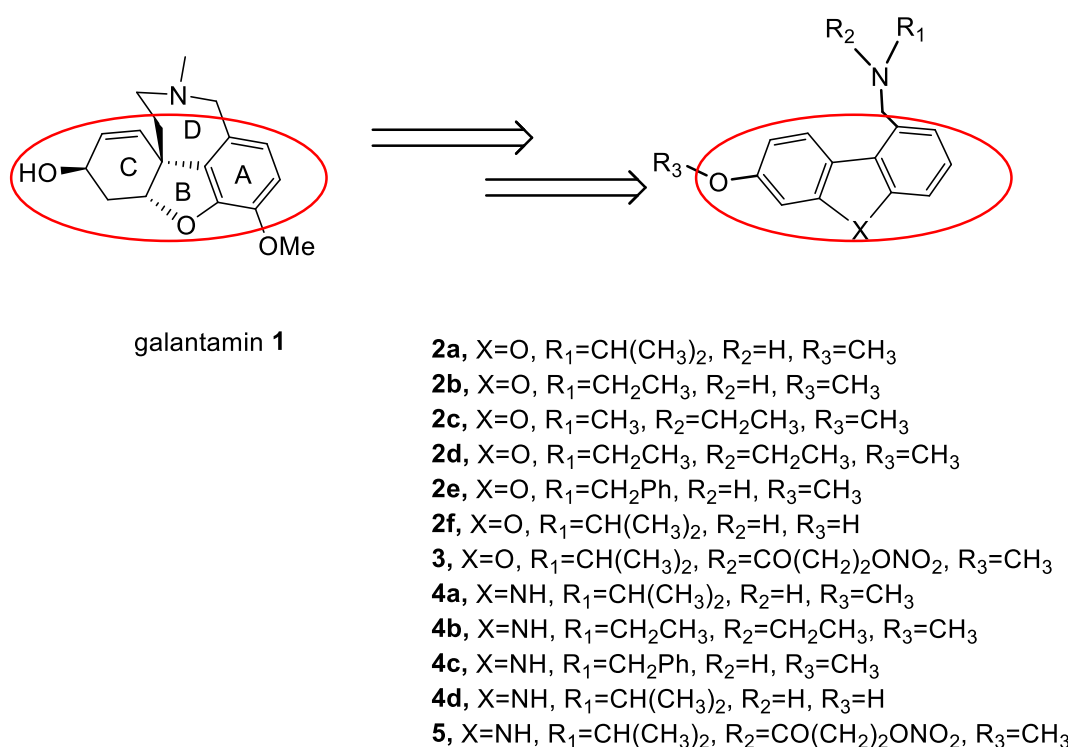
### **3.6. Galantamin a jeho polosyntetické deriváty jako inhibitory cholinesteráz použitelné v terapii Alzheimerovy choroby**

Jak již bylo řečeno výše, galantamin je v současné době používán jako zlatý standard léčby AD. Podle některých zdrojů je nejlépe tolerovaným inhibitorem AChE.<sup>[67]</sup> Prvním léčivým přípravkem na trhu obsahujícím galantamin byl přípravek s názvem Nivalin vyrobený vědcem Paskovem v bulharské firmě Sopharma.<sup>[68]</sup> Používal se k léčbě myastenia gravis, myopatie, a dále sensorických a motorických poruch centrálního nervového systému. Díky své schopnosti přestupovat přes hematoencefalickou bariéru (blood-brain barrier, BBB) a zasáhnout centrální cholinergní systém byl v roce 1980 zařazen do výzkumu a v roce 2000 byl schválen k léčbě AD v Evropě, USA a Asii.<sup>[67]</sup> V dnešní době je u nás registrováno mnoho léčivých přípravků různých sil s obsahem donepezil-hydrochloridu, memantin-hydrochloridu, galantamin-hydrobromidu a rivastigmin-hydrogen-tartarátu ve formě tobolek a rivastigminu ve formě náplastí.<sup>[69]</sup>

Vzhledem k účinkům a využití galantaminu byla věnována pozornost obměnám jeho molekuly, které by poté mohly vykazovat v některých ohledech lepší vlastnosti. Na základě vztahu struktury a účinku byla syntetizována celá řada derivátů. Části galantaminu, které jsou nositeli účinku inhibice AChE jsou methoxy skupina benzenového jádra, hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, dvojná vazba cyklohexenového kruhu a atom dusíku (*N*) terciární aminoskupiny.<sup>[70]</sup>

V roce 2014 v rámci studie Fang a kolektiv byla totální syntézou připravena série derivátů galantaminu s otevřeným D-kruhem, která byla inspirována vlastní strukturou galantaminu. Podrobné schéma přípravy s reakčními podmínkami je možno nalézt v zmíněné literatuře.

Podle struktury jsou to deriváty dibenzofuranu a karbazolu. Strategií bylo zachovat aromatickou část a atom *N*, zachovat nebo vylepšit schopnost inhibice AChE, zjednodušit syntézu molekuly, a především představit NO-donorovou část, která je schopna uvolnit molekulu oxidu dusnatého (NO) a zvýšit tak aktivitu proti AD. NO je signální molekula, která ovlivňuje řadu fyziologických procesů, mimo jiné i učení a paměť. Z výsledků studie vyplývá (Tab. 7), že nejaktivnější látkou této studie je derivát č.3 (Obr.7), který má v porovnání s galantaminem vyšší aktivitu proti AD, kombinující inhibici AChE, inhibici agregace  $\beta$ -amyloidu, uvolnění malého množství NO *in vitro* a pravděpodobný neuroprotektivní efekt. *In vivo* bylo také dokázáno zlepšení prostorové paměti.<sup>[71]</sup>

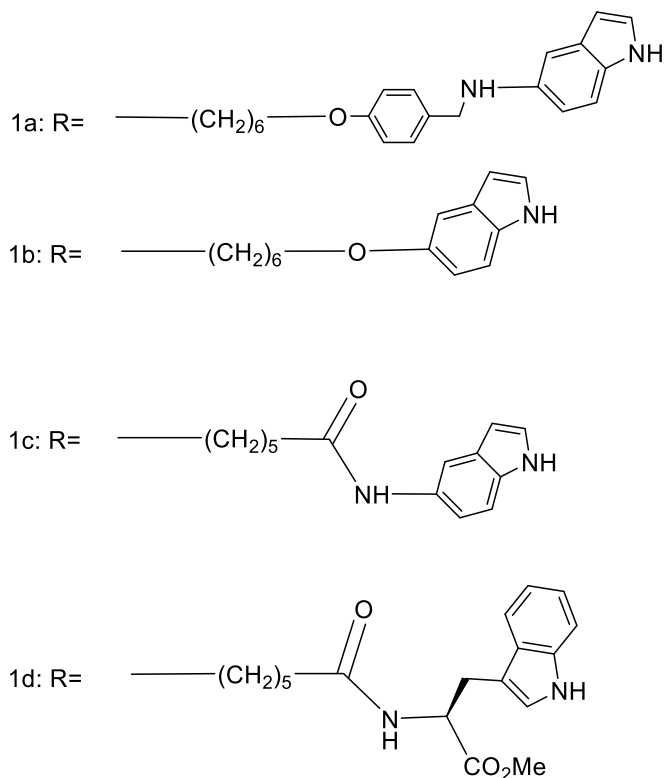
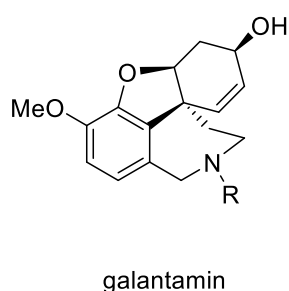


**Obr. 7:** Příprava derivátů galantaminu s otevřeným D-kruhem inspirována vlastní strukturou galantaminu (převzato a upraveno <sup>[71]</sup>)

**Tabulka 7:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE syntetizovaných derivátů galantaminu<sup>[71]</sup>

| sloučenina | IC <sub>50</sub> AChE (μM) | IC <sub>50</sub> BuChE (μM) |
|------------|----------------------------|-----------------------------|
| 2a         | 11,60 ± 3,41               | 13,5 ± 3,1                  |
| 2b         | 18,92 ± 4,08               | 22,18 ± 7,12                |
| 2c         | >>50                       | netestováno                 |
| 2d         | 39,11 ± 8,80               | 27,39 ± 7,76                |
| 2e         | >>50                       | 18,1 ± 9,4                  |
| 2f         | 22,6 ± 7,4                 | 18,36 ± 3,1                 |
| 3          | 0,18 ± 0,04                | 14,3 ± 3,2                  |
| 4a         | 50,83 ± 12,13              | 10,08 ± 7,7                 |
| 4b         | 37,91 ± 8,44               | 14,88 ± 2,08                |
| 4c         | >>50                       | 29,9 ± 1,79                 |
| 4d         | 43,49 ± 5,02               | 17,27 ± 1,16                |
| 5          | 2,21 ± 0,51                | 2,50 ± 0,90                 |
| galantamin | 10,53 ± 3,11               | 39,03 ± 12,11               |

Studie z roku 2015 se zaměřila na deriváty galantaminu s navázanou částí indolového skeletu na *N*-atom galantaminu. Indolový zbytek byl vybrán z důvodu optimální stavby k navázání se na aromatické zbytky v periferní anionické straně (PAS) AChE. PAS se pravděpodobně podílí na vzniku amyloidních depozitů. β-Amyloid se váže blízko PAS a jeho blokáce brání AChE-indukované agregaci β-amyloidu. Byly připraveny 4 deriváty a všechny vykazovaly vyšší inhibici než galantamin. I přesto, že deriváty vykazovaly podobnou aktivitu v inhibici AChE (Tab.8), se derivát 1a (Obr.8) ukazuje jako nejslibnější v terapii AD zaměřené na více cílů. Má vysokou inhibici AChE i schopnost blokovat ukládání β-amyloidu.<sup>[67]</sup>



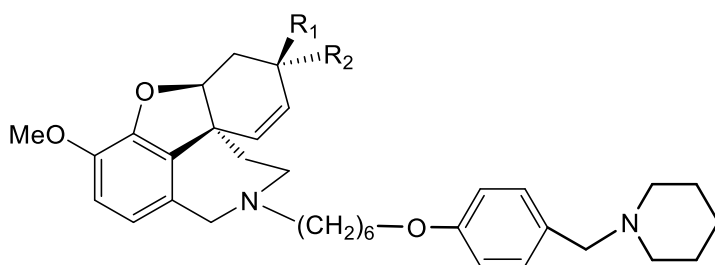
**Obr.8:** Deriváty galantaminu s navázaným indolovým zbytkem (převzato a upraveno <sup>[67]</sup>)

**Tabulka 8:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE syntetizovaných derivátů galantaminu <sup>[67]</sup>

| sloučenina | IC <sub>50</sub> AChE (μM) |
|------------|----------------------------|
| 1a         | 0,011 ± 0,0004             |
| 1b         | 0,012 ± 0,0021             |
| 1c         | 0,015 ± 0,0003             |
| 1d         | 0,094 ± 0,0118             |
| galantamin | 1,070 ± 0,1559             |

Studie z roku 2009 se zaměřila na nové deriváty, které jsou schopny interakce s aktivním i periferním (PAS) místem AChE. Byly připraveny *N*-substituované deriváty galantaminu, které měly navázané benzylamino skupiny a jejich modifikace, jako je například amidická skupina, a různou délkou methylenových skupin jako spojovacího můstku. Na základě výsledků byly definovány vztahy mezi strukturou a účinkem. Bylo zjištěno, že fenylový kruh mezi spojovacím můstkem a *N* koncovou skupinou zvyšuje afinitu derivátu, a že benzyl piperidinový zbytek by mohl být účinný k zachycení na periferním místě AChE. Jako nejúčinnější se ukázal derivát 10-*N*-demethyl-10-*N*-(6-(4-(piperidin-1-ylmethyl)fenoxy)hexan-1-yl)-galantamin (Obr. 10), jehož hodnoty můžeme vidět v tabulce (Tab.10).<sup>[74]</sup>





**Obr. 10:** Struktura derivátu 10-*N*-demethyl-10-*N*-(6-(4-(piperidin-1-ylmethyl)fenoxy)hexan-1-yl)-galantaminu <sup>[74]</sup>

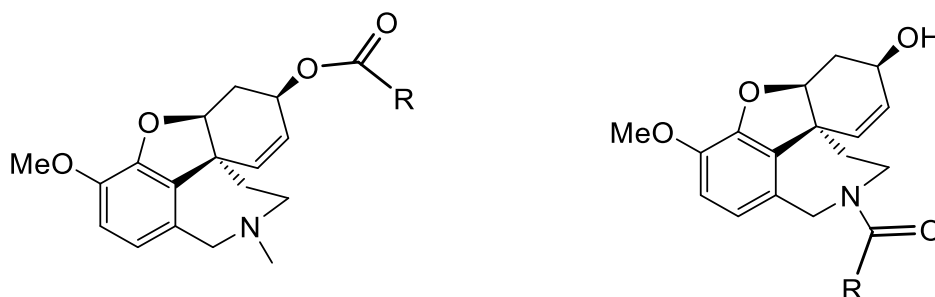
**Tabulka 10:** Hodnoty IC<sub>50</sub> neúčinnějšího derivátu studie a jeho srovnání s galantaminem v inhibici AChE a BuChE <sup>[74]</sup>

| sloučenina   | IC <sub>50</sub> AChE (μM) | IC <sub>50</sub> BuChE (μM) |
|--|----------------------------|-----------------------------|
| 10- <i>N</i> -demethyl-10- <i>N</i> -(6-(4-(piperidin-1-ylmethyl)fenoxy)hexan-1-yl)-galantamin | 0,00562                    | 33,0                        |
| galantamin   | 1,165                      | 5,90                        |

Další studie z roku 2019 se snažila vytvořit deriváty se sníženou toxicitou oproti galantaminu a zachovalou schopností inhibice AChE a β-sekretázy. V rámci obměn molekuly galantaminu se zaměřila na polohy 6 a 11, kde se nachází methoxy a hydroxy skupina. Na tyto skupiny byla navázána část peptidu s předpokládanou inhibicí β-sekretázy (inhibitor OM 99-2) a zbytek kyseliny nikotinové nebo isonikotinové. Oba zbytky byly spojené aspartátovým můstkem. Bylo dokázáno, že molekuly obsahující zbytek kyseliny nikotinové snáz přejdou BBB. Pozitivním efektem zbytku kyseliny nikotinové je také vliv na zvýšení hladin HDL a neuroprotektivní efekt. Přispívá k angiogenezi a tím zlepšuje stav u pacientů s AD. Očekávaným efektem byla inhibice AChE a BuChE, β-sekretázy, antiagregační aktivita a zvýšení hladin HDL. Výsledky akutní toxicity ukazují, že zkoumané deriváty, obsahující zbytek kys. nikotinové nebo isonikotinové a peptidový zbytek v poloze 11 mají nižší toxicitu než galantamin. Výsledky cytotoxicity korelují s výsledky akutní toxicity, z toho vyplývá, že použité peptidové fragmenty snižují *in vivo* toxicitu na myších a sledovaných buněčných liniích až 100krát, což by mohlo mít využití pro aplikaci v medicíně. <sup>[72]</sup>

Patent publikovaný v roce 2011 byl zaměřený na deriváty galantaminu, které jsou schopny inhibice AChE a BuChE díky peptidovému zbytku. Tento patent představil deriváty ve formě esterů a amidů s navázaným di a tripeptidovým fragmentem, jak je vidět na obrázku (Obr.11), kde R představuje dipeptid nebo tripeptid obsahující v postranním řetězci aminokyseliny,

především:  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  a na *N*-konci fenyl, alkylfenyl, alkoxyfenyl nebo halogenfenyl, kde jeden nebo více halogenových prvků je chlor, fluor a brom. Mohou také obsahovat jejich diastereoizomery nebo jejich adiční soli s kyselinami. Získané hodnoty  $\text{IC}_{50}$  jsou shrnuty v tabulce (Tab. 11).<sup>[75]</sup>



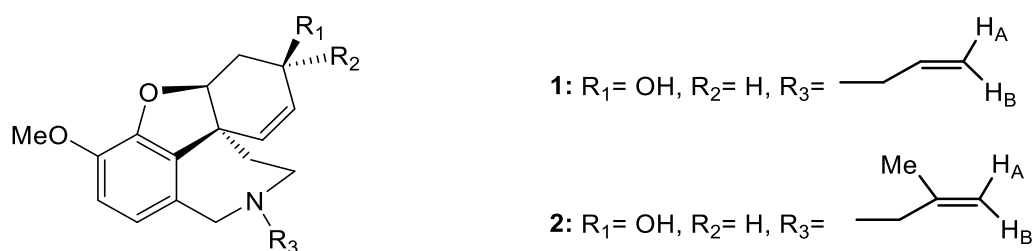
**Obr. 11:** Deriváty galantaminu ve formě esterů a amidů <sup>[75]</sup>

**Tabulka 11:** Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  proti AChE a BuChE vybraných derivátů vykazujících inhibiční aktivitu <sup>[75]</sup>

| sloučenina   | $\text{IC}_{50}$ AChE ( $\mu\text{M}$ ) | $\text{IC}_{50}$ BuChE ( $\mu\text{M}$ ) |
|--|---|--|
| 6- <i>O-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]-glycyl galantamin  | 3,981                                   | 23,71                                    |
| 6- <i>O-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]- <i>L</i> -fenylalanyl-glycyl galantamin                 | 3,758                                   | 10,0                                     |
| 6- <i>O-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]- <i>L</i> -leucyl-glycyl galantamin                      | 3,35                                    | 0,612                                    |
| 6- <i>O-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]- <i>L</i> -valyl-glycyl galantamin                       | 8,33                                    | 0,335                                    |
| 11- <i>N</i> -demethyl-11- <i>N-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]- <i>L</i> -fenylalanylgalantamin | 12,5                                    | 0,447                                    |
| 11- <i>N</i> -demethyl-11- <i>N-N</i> -[ <i>N</i> -(3,4-dichlorofenyl)- <i>D,L</i> -alanyl]- <i>L</i> -valylgalantamin       | 31,25                                   | 0,603                                    |
| galantamin   | 5,0                                     | 59,2                                     |

Studie z roku 2008 se věnovala přírodním derivátům alkaloidů galantaminového strukturního typu izolovaným z matečného louhu, získaného při průmyslové produkci galantaminu z listů rostliny *Leucojum aestivum*. Bylo izolováno 6 alkaloidů, z nichž jeden byl nově objeven, a to *N*-(14-methylallyl)norgalantamin. Dva deriváty *N*-(14-

methylallyl)norgalantamin a *N*-allylnorgalantamin vykazovaly vyšší schopnost inhibice AChE než galantamin (Tab.9). Jak je vidět na obrázku (Obr.9), oba deriváty obsahují methoxy skupinu v poloze 9 a alkyl navázaný na *N* atom. Díky tomu, mají vyšší lipofilitu v porovnání s galantaminem, a tak snáz přejdou přes hematoencefalickou bariéru. Bohužel, izolace přírodních *N*-alkyl derivátů galantaminu je vzácná, díky jejich extrémně nízké koncentraci v rostlinách.<sup>[73]</sup>



**Obr. 9:** *N*-(14-methylallyl)norgalantamin (2) a *N*-allylnorgalantamin (1) (převzato a upraveno<sup>[73]</sup>)

**Tabulka 9:** Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  proti AChE a BuChE neaktivnějších derivátů galantaminu <sup>[73]</sup>

| sloučenina                              | $\text{IC}_{50}$ AChE ( $\mu\text{M}$ ) |
|---|---|
| <i>N</i> -(14-methylallyl)norgalantamin | 0,18                                    |
| <i>N</i> -allylnorgalantamin            | 0,16                                    |
| galantamin                              | 1,82                                    |

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Chlidantin

Část chlidantinu pro přípravu derivátů byla získána v čisté formě v rámci předchozích fytochemických studií na katedře farmaceutické botaniky farmacie v Hradci Králové z cibulí rostliny *Chlidanthus fragrans* Herb.<sup>[34]</sup> Přibližně 50 mg chlidantinu bylo doizolováno v rámci této práce za použití TLC z matečného louhu pocházejícího ze stejné rostliny.

#### 4.1.2. Rozpouštědla a chemikálie použité pro přípravu derivátů

- DMAP- 4 -dimethylaminopyridin
- chloroform, p.a. (Penta)
- ethanol, p.a. (Penta)
- pyridin, p.a. (Penta)
- ethylacetát, p.a. (Penta)
- diethylamin, p.a. (Penta)
- toluen, p.a. (Penta)
- benzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- p-toluylochlord,  $\geq 99\%$  (Across)
- 3-nitrobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- o-toluylochlord,  $\geq 99\%$  (Across)
- m-toluylochlord,  $\geq 99\%$  (Across)
- 2-methoxybenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- 3-methoxybenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- 3,5-dimethylbenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- 1-naftoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- 2-naftoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Across)
- Dragendorffovo činidlo (připravené v laboratoři)
- kyselina vinná, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)
- dusičnan bismutitý zásaditý, p.a. (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)
- jodid draselný, p.a. (Penta)

#### 4.1.3. Vytváření soustavy TLC

- Toluén: Diethylamin 9:1
- Toluén: Diethylamin 95:5

#### 4.1.4. Adsorbenty TLC

Kieselgel SiO<sub>2</sub> 60 F254, Merck, 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC; hloubka vrstvy 0,2 mm. Silikagel 60 GF254, Merck; pro přípravu litých desek. (izolace chlidanthinu)

#### 4.1.5. Chemikálie pro přípravu hydrochloridů

- diethylether
- dichlormethan
- kyselina sírová 96%
- chlorid sodný

#### 4.2. Příprava hydrochloridů

Přesná navážka derivátu se rozpustí v suchém diethyletheru v zabroušené zkumavce, aby koncentrace vzorku byla 1 M. Pokud se vzorek nerozpustí, odpaří se část diethyletheru a přidá se nejmenší možné množství suchého dichlormethanu tak, aby se vzorek zcela rozpustil. Po úplném rozpuštění vzorku se přidá nadbytek 1 M etherového roztoku chlorovodíku, krátce se sonikuje. Pomocí pH papírku se ověří, zda bylo přidáno dostatečné množství chlorovodíku. Pokud pH papírek indikuje kyselou reakci, není potřeba přidávat další etherový roztok chlorovodíku, zkumavka se nechá 15 minut stát. V opačném případě je nutné přidat další množství etherového roztoku chlorovodíku a znovu ověřit pH pomocí pH papírku. Vzniklý hydrochlorid sedimentuje na dně zkumavky. Následně se hydrochlorid v diethyletheru provětrává na vodní lázni (40 °C) proudem vzduchu do úplného odpaření rozpouštědla. Poté se přidá několik mililitrů suchého diethyletheru a suspenze se opět odpaří dosucha. Proces je nutné opakovat ještě dvakrát. Nadbytečný plynný chlorovodík se tímto způsobem zcela odstraní. Vzniklý hydrochlorid se suší ve vakuovém exikátoru nad perlami silikagelu při tlaku 2-8 mbar po dobu 12 hodin.

##### Příprava etherového roztoku chlorovodíku

Roztok suchého chlorovodíku v diethyletheru o koncentraci 1 M se připravuje v příslušné aparatuře. Do reakční baňky se nasype 3,1 g chloridu sodného a do připouštěcího tubusu se vlije 15-20 ml 96% kyseliny sírové (nesmí dýmat). Náplň plynového filtru je tvořena promytou (nebazickou) skelnou vatou. Do promývačky, která je umístěna za filtrem, se vlije 50 ml diethyletheru. Po sestavení aparatury se velmi pomalu přikapává 96% koncentrovaná kyselina sírová na chlorid sodný. Pokud se reakce nenastartuje, reakční baňka aparatury se krátce přihřeje fěnem. Vývoj chlorovodíku nesmí být překotný, aby se stačil všechn plyn, vysušený koncentrovanou kyselinou sírovou, absorbovat v diethyletheru. Kyseliny sírové se přikapne do

reakční směsi mírný nadbytek. Po ukončení reakce se diethyletherový roztok chlorovodíku vylije z promývačky do uzavřené baňky, z níž se dávkuje pro přípravu chloridů. Takto připravený roztok má koncentraci přibližně 1 M, je možné jej používat 2 dny pro přípravu chloridů alkaloidů.

### 4.3. Strukturní analýza derivátů

#### 4.3.1. NMR spektroskopie

Spektra NMR byla měřena v roztocích deuterovaného chloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) nebo deuterovaného methanolu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Teplota měření byla 25 °C. Měření proběhlo na přístroji Varian Inova 500 pracujícím při 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . K ozařování a detekci byla použita One NMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty  $\delta$  pars per milion (ppm) a byly nepřímě vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro  $\text{CDCl}_3$  jsou u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm, pro  $\text{CD}_3\text{OD}$  jsou u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 3,30$  ppm a u  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0$  ppm. Získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

#### 4.3.2. ESI-MS

Vzorky (0,2 - 0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml methanolu čistoty LC-MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Přístroj sestává z modulů Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Na separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a methanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml / min. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v / v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: kapilární napětí - 0,8 kV; Teplota próby - 600 ° C; Kuželové napětí – 15V. LC / MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200 - 800 m/z. Pro detekci PDA byl rozsah detektoru nastaven od 190 do 700 nm. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním

iontovém režimu. Eluce sloučenin nastává v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční silou mobilní fáze. V průběhu chromatografické analýzy zůstává koncentrace kyseliny mravenčí konstantní.

### 4.3.3. Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů za teploty 26°C. Měřilo se na automatickém polarimetru ADP 220 BS v prostředí methanolu nebo ethanolu. Poté byla dopočítána specifická otáčivost podle vzorce:  $[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$

t-teplota měření

D-linie sodíkového světla (589,3 nm)

$\alpha$ -otáčivost (°C)

c-koncentrace měřeného derivátu (g/100 ml)

l-délka kyvety (dm)

## 4.4. Biologická aktivita připravených derivátů

### 4.4.1. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů chlidantinu proti AChE a BuChE

Měření inhibiční aktivity derivátů bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pomocí Ellmanovy metody. Měření provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a PharmDr. Daniela Hulcová, PhD. Podrobný popis metody je v následující literatuře.<sup>[76]</sup>

### 4.4.2. Stanovení protinádorové aktivity připravených derivátů chlidantinu

Stanovení cytotoxické aktivity derivátů bylo provedeno na liniích Jurkat, MOLT, A-549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2, MRC-5. Měření proběhlo ve spolupráci s Katedrou lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové. Byl použit systém xCELLigence. Stanovení provedl RNDr. Radim Havelek, PhD. Podrobný popis metody je v následující literatuře.<sup>[40]</sup>

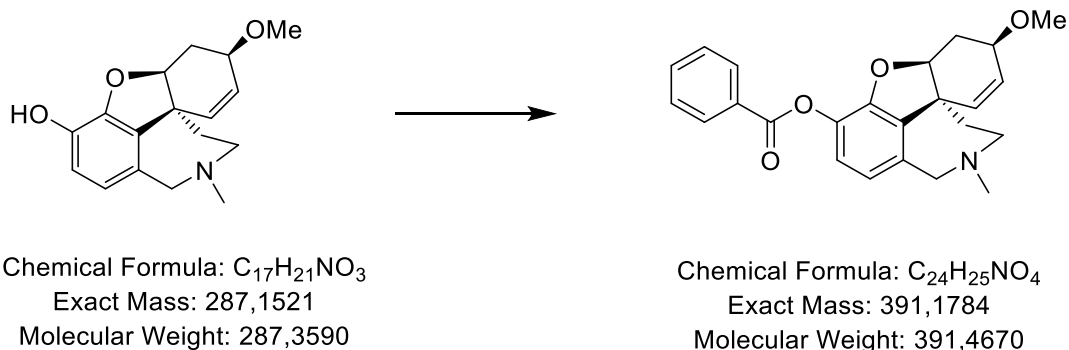
**Tabulka 12:** Buněčné linie používané ke stanovení protinádorové aktivity

|        |   |
|--------|---|
| A2780  | karcinom vaječníků                            |
| A549   | adenokarcinom plic                            |
| HeLa   | karcinom děložního čípku                      |
| MCF-7  | adenokarcinom prsu                            |
| MOLT   | akutní lymfoblastická leukémie                |
| PANC-1 | karcinom slinivky                             |
| SAOS-2 | osteosarkom                                   |
| HT-29  | kolorektální adenokarcinom                    |
| Jurkat | akutní T-buněčná leukémie                     |
| MRC-5  | nenádorová buněčná linie plicních fibroblastů |



## 4.5. Syntéza derivátů chlidantinu

### 4.5.1. 3-*O*-(Benzoyl)chlidantin (LC-145)



#### Obr. 12: Syntéza 3-*O*-(benzoyl)chlidantinu

30 mg (0,104 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu$ l (0,43 mmol) benzoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 100 °C 3 hodiny. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla To:Et<sub>2</sub>NH v poměru 9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí EtOH:EtOAc 1:1 a vysušena. Bylo získáno 38 mg (0,097 mmol) 3-*O*-(benzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 93 %.

ESI-MS  $m/z$  (%): 391, 790 (100%) [M + H]<sup>+</sup>

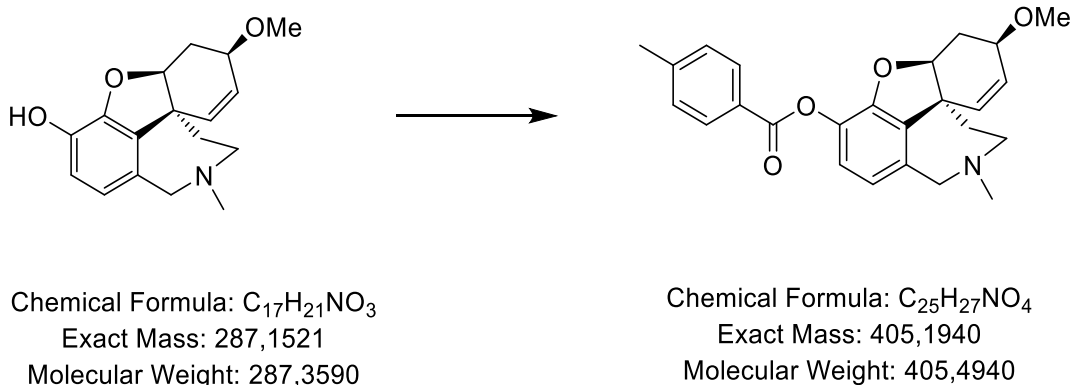
#### NMR analýza:

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.21–8.18 (2H, m), 7.64–7.59 (1H, m), 7.52–7.47 (2H, m), 6.92 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 6.64 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 6.25–6.21 (1H, m), 6.00 (1H, dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 4.5$  Hz), 4.61–4.59 (1H, m), 4.22 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.86–3.82 (1H, m), 3.73 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.40–3.32 (1H, m, overlapped), 3.34 (3H, s, overlapped), 3.11–3.04 (1H, m), 2.57–2.51 (1H, m), 2.43 (3H, s), 2.18 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 1.99 (1H, ddd,  $J = 15.7$  Hz,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.59–1.52 (1H, m)

<sup>13</sup>C NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 164.3, 149.5, 134.4, 134.0, 133.6, 133.3, 130.3, 129.5, 128.8, 128.4, 125.6, 121.9, 121.2, 87.0, 69.4, 60.2, 55.9, 53.7, 48.2, 41.6, 34.4, 27.7

Optická otáčivost:  $[\alpha]_D^{26} = -77,7$  ( $c = 0,263$ ; CHCl<sub>3</sub>)

#### 4.5.2. 3-*O*-(4-Methylbenzoyl)chlidantin (LC-160)



#### Obr. 13: Syntéza 3-*O*-(4-methylbenzoyl)chlidantinu

30 mg (0,104 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 40 μl (0,304 mmol) *p*-toluoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 100 °C 3 hodiny. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla To:Et<sub>2</sub>NH 9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí EtOH:EtOAc 1:1 a vysušena. Bylo získáno 25 mg (0,062 mmol) 3-*O*-(4-methylbenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 59 %.

**ESI-MS *m/z* (%):** 406,105 (100%) [M + H]<sup>+</sup>

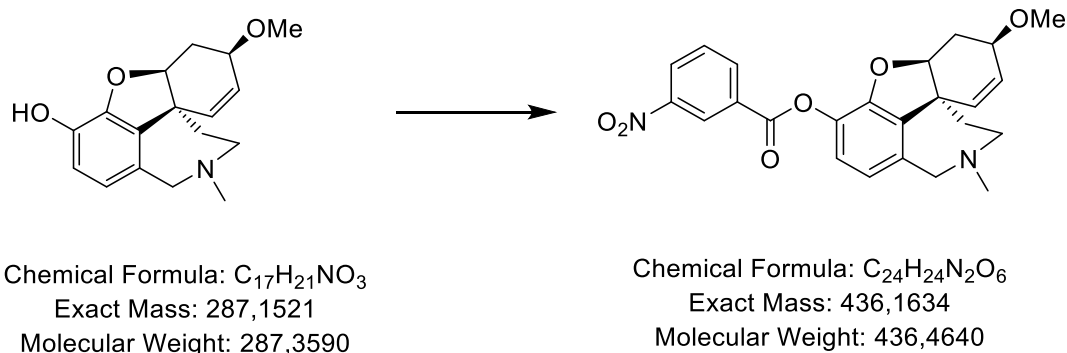
#### NMR analýza:

**<sup>1</sup>H NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.10–8.06 (2H, m, AA'BB'), 7.30–7.27 (2H, m, AA'BB'), 6.91 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.63 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.23 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 5.99 (1H, dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 4.4 Hz), 4.60–4.58 (1H, m), 4.21 (1H, d, *J* = 15.2 Hz), 3.87–3.82 (1H, m), 3.72 (1H, d, *J* = 15.2 Hz), 3.40–3.31 (1H, m, overlapped), 3.34 (3H, s, overlapped), 3.11–3.03 (1H, m), 2.57–2.50 (1H, m), 2.44 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.17 (1H, td, *J* = 13.3 Hz, *J* = 2.9 Hz), 1.99 (1H, ddd, *J* = 15.9 Hz, *J* = 5.9 Hz, *J* = 3.9 Hz), 1.58–1.52 (1H, m)

**<sup>13</sup>C NMR** (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.4, 149.5, 144.1, 134.4, 134.1, 133.5, 130.3, 129.1, 128.9, 126.7, 125.6, 121.9, 121.2, 86.9, 69.5, 60.2, 55.8, 53.7, 48.2, 41.6, 34.4, 27.7, 21.7

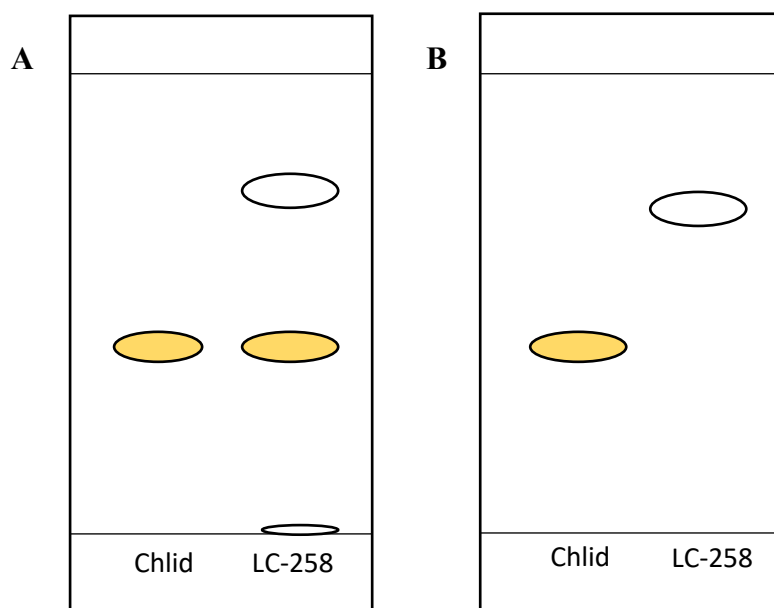
**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = - 83,4 (c = 0,235; CHCl<sub>3</sub>)

### 4.5.3. 3-*O*-(3-Nitrobenzoyl)chlidantin (LC-258)



#### Obr. 14: Syntéza 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)chlidantinu

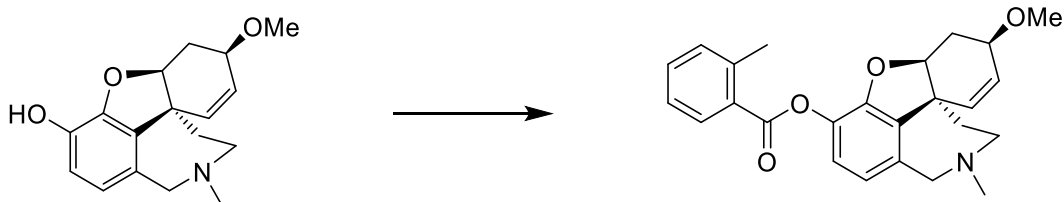
31,3 mg (0,109 mmol) chlidaninu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 31,4 mg (0,169 mmol) 3-nitrobenzoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 50 °C 3 hodiny. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla  $To:Et_2NH$  9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $EtOH:CHCl_3$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 43 mg (0,096 mmol) 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 90 %. Po analýze na ESI a NMR bylo zjištěno, že látka není v čisté formě. Po 3 cyklech separací pomocí  $EtOH:EtOAc$  bylo zjištěno, že derivát není při uchovávání stabilní a rozkládá se na výchozí látky. Z tohoto důvodu nebyl k dalšímu testování použit.



Obr. 15: **A**-analytická TLC derivátu LC-258 po uchovávání, **B**-analytická TLC derivátu LC-258 po preparativní TLC

ESI-MS  $m/z$  (%): 436,868 (100%)  $[M + H]^+$

#### 4.5.4. 3-*O*-(2-Methylbenzoyl)chlidantin (LC-259)



Chemical Formula:  $C_{17}H_{21}NO_3$   
Exact Mass: 287,1521  
Molecular Weight: 287,3590

Chemical Formula:  $C_{25}H_{27}NO_4$   
Exact Mass: 405,1940  
Molecular Weight: 405,4940

#### Obr. 16: Syntéza 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidantinu

33,7 mg (0,117 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu$ l (0,379 mmol) *o*-toluoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při pokojové teplotě 2 dny, třetí den bylo přidáno ještě 10  $\mu$ l (0,076 mmol) a zahřáto na 50 °C. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla To:Et<sub>2</sub>NH 9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí EtOH:CHCl<sub>3</sub> 1:1 a vysušena. Bylo získáno 30 mg (0,074 mmol) 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 63 %.

ESI-MS  $m/z$  (%): 406,193 (100%)  $[M + H]^+$

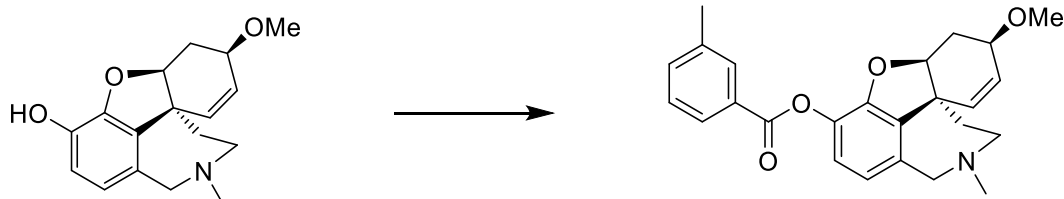
#### NMR analýza:

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.13 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 7.45 (1H, td,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 7.33–7.27 (2H, m), 6.92 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.63 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.24 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz), 6.00 (1H, dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.62–4.58 (1H, m), 4.23 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.88–3.84 (1H, m), 3.73 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.42–3.33 (1H, m, overlapped), 3.35 (3H, s, overlapped), 3.11–3.05 (1H, m), 2.67 (3H, s), 2.59–2.53 (1H, m), 2.42 (3H, s), 2.18 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 1.98 (1H, ddd,  $J = 15.6$  Hz,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.58–1.52 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.1, 149.5, 141.1, 134.4, 134.0, 133.5, 132.4, 131.7, 131.3, 128.9, 128.7, 125.7, 125.6, 121.9, 121.2, 86.9, 69.4, 60.2, 55.8, 53.6, 48.3, 41.4, 34.2, 27.6, 21.8

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -78,7$  ( $c = 0,239$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.5. 3-*O*-(3-Methylbenzoyl)chlidantin (LC-255)



Chemical Formula:  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$   
Exact Mass: 287,1521  
Molecular Weight: 287,3590

Chemical Formula:  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 405,1940  
Molecular Weight: 405,4940

#### Obr. 17: Syntéza 3-*O*-(3-methylbenzoyl)chlidantinu

30,3 mg (0,105 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu\text{l}$  (0,379 mmol) *m*-toluoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při pokojové teplotě 2 dny. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla  $\text{To}:\text{Et}_2\text{NH}$  9:1. Desky byly vyvinuty dvakrát. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $\text{EtOH}:\text{CHCl}_3$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 35 mg (0,086 mmol) 3-*O*-(3-methylbenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek byl 82 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 406,016 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

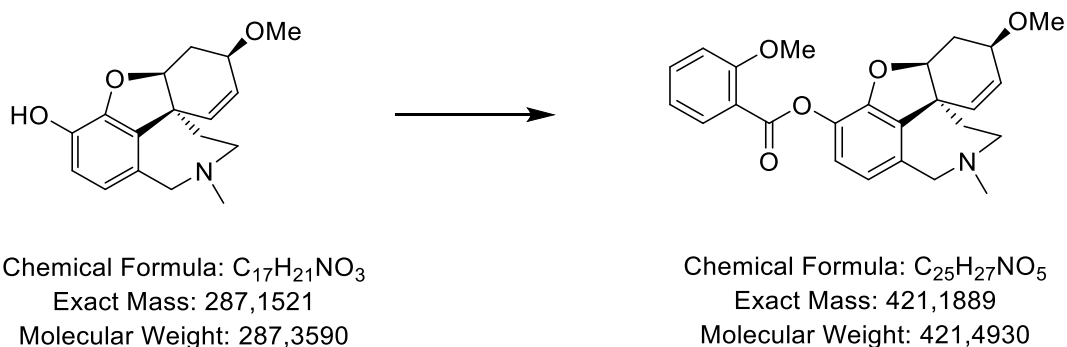
#### NMR analýza:

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.00 (1H, bs), 7.99 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.42 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 7.37 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz), 6.90 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.63 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.25–6.21 (1H, m), 5.99 (1H, dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.61–4.58 (1H, m), 4.21 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.86–3.82 (1H, m), 3.72 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.39–3.31 (1H, m, overlapped), 3.34 (3H, s, overlapped), 3.10–3.04 (1H, m), 2.57–2.50 (1H, m), 2.44–2.41 (6H, m), 2.18 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 1.99 (1H, ddd,  $J = 15.9$  Hz,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.58–1.52 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.5, 149.5, 138.1, 134.5, 134.1, 134.0, 133.5, 130.8, 129.4, 128.9, 128.3, 127.4, 125.6, 121.8, 121.2, 86.9, 69.4, 60.2, 55.8, 53.7, 48.2, 41.7, 34.4, 27.7, 21.2

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -68,5$  ( $c = 0,199$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.6. 3-*O*-(2-Methoxybenzoyl)chlidantin (LC-254)



#### Obr. 18: Syntéza 3-*O*-(2-methoxybenzoyl)chlidantinu

29,4 mg (0,102 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu\text{l}$  (0,336 mmol) 2-methoxybenzoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 60  $^\circ\text{C}$  jeden den. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla  $\text{To}:\text{Et}_2\text{NH}$  9:1. Desky byly vyvinuty dvakrát. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $\text{EtOH}:\text{EtOAc}$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 28 mg (0,066 mmol) 3-*O*-(2-methoxybenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 65 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 421,931 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

#### NMR analýza:

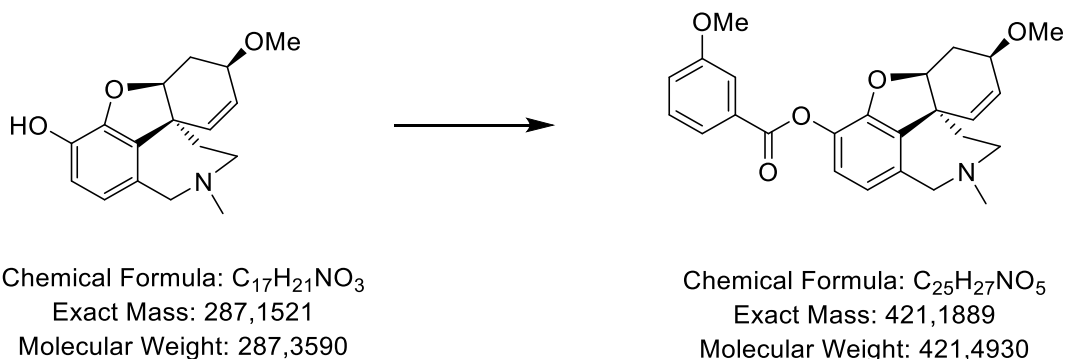
$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.04 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.8$  Hz), 7.52 (1H, td,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.8$  Hz), 7.02 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, overlapped), 7.01 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, overlapped), 6.93 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.61 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.23 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 5.98 (1H, dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.61–4.57 (1H, m), 4.20 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.92 (3H, s), 3.87–3.83 (1H, m), 3.71 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.39–3.31 (1H, m, overlapped), 3.35 (3H, s, overlapped),

3.09–3.03 (1H, m), 2.57–2.51 (1H, m), 2.41 (3H, s), 2.16 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 3.0$  Hz), 2.00 (1H, ddd,  $J = 15.6$  Hz,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.56–1.50 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 163.3, 159.9, 149.5, 134.4, 134.1, 133.4, 132.5, 129.1, 125.5, 122.0, 121.1, 120.1, 119.1, 112.2, 86.8, 69.5, 60.3, 56.0, 55.8, 53.7, 48.2, 41.5, 34.4, 27.8

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -53,6$  ( $c = 0,232$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.7. 3-*O*-(3-Methoxybenzoyl)chlidantin (LC-253)



#### **Obr. 19:** Syntéza 3-*O*-(3-methoxybenzoyl)chlidantinu

29 mg (0,101 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu\text{l}$  (0,336 mmol) 3-methoxybenzoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 60 °C jeden den. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla To:  $\text{Et}_2\text{NH}$  9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $\text{EtOH}:\text{EtOAc}$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 39 mg (0,093 mmol) 3-*O*-(3-methoxybenzoyl)chlidantinu jako světle žluté krystalické látky. Výtěžek reakce byl 91 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 422,019 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

#### **NMR analýza:**

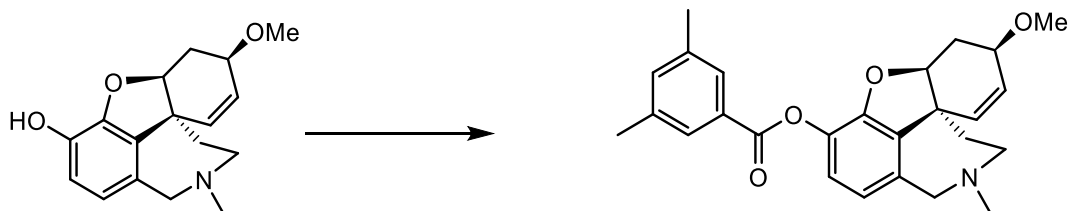
$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.79 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.70–7.69 (1H, m), 7.39 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz), 7.16 (1H, dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 6.91 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.63 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 6.23 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 5.99 (1H, dd,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.61–4.58 (1H, m), 4.20 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.87 (3H, s), 3.86–3.82 (1H, m), 3.72 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.38–3.31 (1H, m, overlapped), 3.34 (3H, s, overlapped), 3.10–3.03 (1H, m), 2.57–2.51 (1H, m), 2.42

(3H, s), 2.17 (1H, td,  $J = 13.1$  Hz,  $J = 3.0$  Hz), 1.98 (1H, ddd,  $J = 15.8$  Hz,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.58–1.52 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.2, 159.5, 149.5, 134.6, 134.0, 133.6, 130.7, 129.4, 128.9, 125.5, 122.8, 121.8, 121.2, 120.1, 114.2, 87.0, 69.5, 60.3, 55.9, 55.4, 53.7, 48.2, 41.7, 34.4, 27.6

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -87,8$  ( $c = 0,251$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.8. 3-*O*-(3,5-Dimethylbenzoyl)chlidantin (LC-256)



Chemical Formula:  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$   
Exact Mass: 287,1521  
Molecular Weight: 287,3590

Chemical Formula:  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 419,21  
Molecular Weight: 419,52

#### **Obr. 20:** Syntéza 3-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)chlidantinu

40 mg (0,139 mmol) chlidaninu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu\text{l}$  (0,338 mmol) 3,5-dimethylbenzoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 75 °C jeden den. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla  $\text{To}:\text{Et}_2\text{NH}$  9:1. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $\text{EtOH}:\text{CHCl}_3$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 57 mg (0,136 mmol) 3-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 97 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 420,063 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

#### **NMR analýza:**

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.81 (2H, s), 7.23 (1H, s), 6.89 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 6.62 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 6.22 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz), 5.98 (1H, dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 4.3$  Hz), 4.60–4.56 (1H,

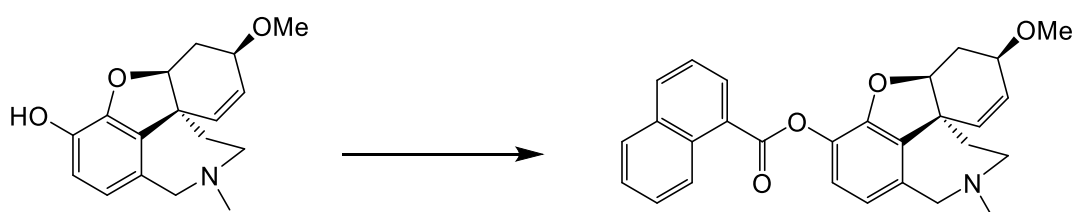


m), 4.19 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.86–3.81 (1H, m), 3.71 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.37–3.30 (1H, m, overlapped), 3.34 (3H, s, overlapped), 3.09–3.02 (1H, m), 2.56–2.49 (1H, m), 2.42 (3H, s), 2.38 (6H, s), 2.16 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 1.98 (1H, ddd,  $J = 15.8$  Hz,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 4.0$  Hz), 1.57–1.51 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.6, 149.4, 138.0, 134.9, 134.5, 134.0, 133.5, 129.2, 128.9, 127.9, 125.5, 121.8, 121.1, 86.9, 69.4, 60.2, 55.8, 53.7, 48.1, 41.7, 34.4, 27.7, 21.0

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -83,5$  ( $c = 0,278$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.9. 3-*O*-(1-Naftoyl)chlidantin (LC-214)



Chemical Formula:  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$   
Exact Mass: 287,1521  
Molecular Weight: 287,3590

Chemical Formula:  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 441,19  
Molecular Weight: 441,53

#### **Obr. 21:** Syntéza 3-*O*-(1-naftoyl)chlidantinu

30 mg (0,104 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkušavky 50  $\mu\text{l}$  (0,332 mmol) 1-naftoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 75  $^\circ\text{C}$  jeden den. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla  $\text{To}:\text{Et}_2\text{NH}$  95:5. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí  $\text{EtOH}:\text{EtOAc}$  1:1 a vysušena. Bylo získáno 27 mg (0,0612 mmol) 3-*O*-(1-naftoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 59 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 442,226 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

#### **NMR analýza:**

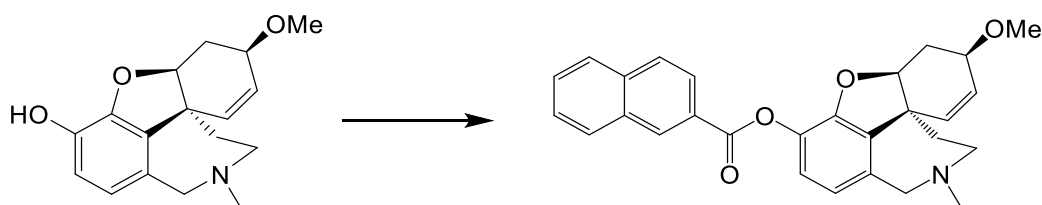
$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.03 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 8.44 (1H, dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 8.09 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.92 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 7.65–7.61 (1H, m), 7.58–7.54 (2H, m), 7.00 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.67 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.27 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz), 6.02 (1H, dd,

$J = 10.2$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.65–4.62 (1H, m), 4.25 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.89–3.85 (1H, m), 3.76 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 3.43–3.35 (1H, m, overlapped), 3.37 (3H, s, overlapped), 3.13–3.07 (1H, m), 2.61–2.54 (1H, m), 2.45 (3H, s), 2.21 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 1.99 (1H, ddd,  $J = 15.7$  Hz,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.60–1.54 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.1, 149.6, 134.5, 134.1, 133.9, 133.8, 133.6, 131.7, 131.3, 129.0, 128.5, 127.9, 126.3, 126.2, 126.0, 125.7, 124.5, 122.0, 121.3, 87.1, 69.5, 60.2, 55.9, 53.7, 48.3, 41.5, 34.3, 29.7, 27.6

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -21,5$  ( $c = 0,130$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.5.10. 3-*O*-(2-Naftoyl)chlidantin (LC-215)



Chemical Formula:  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$   
Exact Mass: 287,1521  
Molecular Weight: 287,3590

Chemical Formula:  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 441,19  
Molecular Weight: 441,53

#### Obr. 22: Syntéza 3-*O*-(2-naftoyl)chlidantinu

30 mg (0,104 mmol) chlidantinu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Poté bylo přidáno do reakční zkumavky 50  $\mu\text{l}$  (0,332 mmol) 2-naftoylchloridu a 1 mg DMAP jako katalyzátoru. Reakce probíhala při 75 °C jeden den. Po skončení reakce byl odpařen pyridin a reakční směs rozdělena pomocí preparativní TLC. Mobilní fáze byla To:Et<sub>2</sub>NH 95:5. Zóna s připraveným derivátem byla separována z desky, promyta směsí EtOH:EtOAc 1:1 a vysušena. Bylo získáno 28 mg (0,063 mmol) 3-*O*-(2-naftoyl)chlidantinu jako bílé krystalické látky. Výtěžek reakce byl 61 %.

**ESI-MS  $m/z$  (%):** 442,226 (100%)  $[\text{M} + \text{H}]^+$

#### NMR analýza:

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.79 (1H, bs), 8.19 (1H, dd,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 1.5$  Hz), 7.99 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 7.92 (2H, t,  $J = 8.3$  Hz), 7.65–7.61 (1H, m), 7.59–7.55 (1H, m), 6.97 (1H, d,

$J = 8.3$  Hz), 6.66 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 6.25 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz), 6.01 (1H, dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 4.64–4.61 (1H, m), 4.23 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.87–3.83 (1H, m), 3.75 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 3.41–3.33 (1H, m, overlapped), 3.35 (3H, s, overlapped), 3.12–3.05 (1H, m), 2.58–2.52 (1H, m), 2.44 (3H, s), 2.20 (1H, td,  $J = 13.2$  Hz,  $J = 3.0$  Hz), 2.00 (1H, ddd,  $J = 15.7$  Hz,  $J = 5.6$  Hz,  $J = 3.9$  Hz), 1.60–1.54 (1H, m)

$^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.5, 149.6, 135.7, 134.6, 134.1, 133.7, 132.5, 132.1, 129.5, 129.0, 128.5, 128.2, 127.8, 126.71, 126.68, 125.7, 125.6, 121.9, 121.3, 87.1, 69.5, 60.3, 55.9, 53.8, 48.3, 41.7, 34.4, 27.7

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{26} = -92,1$  ( $c = 0,096$ ;  $\text{CHCl}_3$ )

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Příprava polosyntetických derivátů

Připravené deriváty chlidantinu jsou i se svými výtěžky uvedeny v následující tabulce (Tab.13).

**Tabulka 13:** Připravené deriváty a jejich procentuální výtěžek

| Číslo derivátu | Výtěžek (%) |
|----------------|-------------|
| LC-145         | 93          |
| LC-160         | 59          |
| LC-258         | 0           |
| LC-259         | 63          |
| LC-255         | 82          |
| LC-254         | 65          |
| LC-253         | 91          |
| LC-256         | 97          |
| LC-214         | 59          |
| LC-215         | 61          |

### 5.2. Screening biologických aktivit

#### 5.2.1. Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE a jejich přestup přes BBB

Katedra farmaceutické botaniky se dlouhodobě zabývá testováním látek různého původu na inhibici erytrocytární AChE a sérové BuChE. V následující tabulce (Tab.14) jsou shrnuty výsledky inhibiční aktivity připravených derivátů chlidantinu. Nejzajímavějšími se ukázaly deriváty LC-145, LC-254 a LC-259, které vykazaly zajímavou inhibiční aktivitu proti BuChE. Proti AChE žádné připravené deriváty nevykazují zajímavou aktivitu. Dále byla vypočtena hodnota logBB popisující permeabilitu přes hematoencefalickou bariéru.

LogBB je definován jako logaritmický poměr mezi koncentrací sloučeniny v mozku a krvi. Sloučeniny s  $\log BB > 0,3$  snadno procházejí BBB, naopak ty s  $\log BB < -1,0$  procházejí špatně.<sup>[77]</sup>

**Tabulka 14:** Hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných derivátů chlidantinu v porovnání se standardem galantaminem

|                   | <b>AChE při<br/>100 μM (%)</b> | <b>AChE IC<sub>50</sub><br/>(μM)</b> | <b>BuChE při<br/>100 μM (%)</b> | <b>BuChE IC<sub>50</sub><br/>(μM)</b> | <b>logBB<sup>a</sup></b> |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| <b>galantamin</b> |                                | 1,7 ± 0,1 <sup>[15]</sup>            |                                 | 42,3 ± 1,3 <sup>[15]</sup>            | 0,047                    |
| <b>chlidantin</b> |                                | 147 ± 6 <sup>[34]</sup>              |                                 | 422 ± 15 <sup>[34]</sup>              | -0,087                   |
| <b>LC-145</b>     | 14,92 ± 1,94                   | >100                                 | 63,4 ± 1,76                     | 40,70 ± 0,44                          | 0,045                    |
| <b>LC-160</b>     | 19,91 ± 1,27                   | >100                                 | 8,36 ± 0,73                     | >100                                  | 0,054                    |
| <b>LC-259</b>     | 19,32 ± 5,14                   | >100                                 | 83,45 ± 1,91                    | 13,28 ± 0,36                          | 0,090                    |
| <b>LC-255</b>     | 38,90 ± 0,65                   | >100                                 | 35,56 ± 0,42                    | >100                                  | 0,054                    |
| <b>LC-254</b>     | 23,67 ± 0,70                   | >100                                 | 58,87 ± 0,52                    | 56,75 ± 2,03                          | 0,163                    |
| <b>LC-253</b>     | 42,18 ± 0,65                   | >100                                 | 12,83 ± 0,49                    | >100                                  | 0,171                    |
| <b>LC-256</b>     | 45,75 ± 0,30                   | >100                                 | 19,85 ± 0,60                    | >100                                  | 0,054                    |
| <b>LC-214</b>     | 30,37 ± 0,97                   | >100                                 | 53,14 ± 1,36                    | n.                                    | 0,186                    |
| <b>LC-215</b>     | 27,84 ± 2,93                   | >100                                 | 18,07 ± 0,78                    | >100                                  | 0,102                    |

<sup>a</sup> vypočteno přes <http://www.way2drug.com/geb/>, n.=zatím netestováno

### 5.2.2. Protinádorová aktivita derivátů

V následujících tabulkách (Tab.15 a Tab.16) jsou shrnuty výsledky cytotoxické aktivity připravených derivátů chlidantinu vůči nádorovým buněčným liniím Jurkat, MOLT, A-549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a nenádorové linii MRC-5. Deriváty LC-259 a LC-214 budou testovány v nejbližší době.

**Tabulka 15:** Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM, koncentrace doxorubicinu 1 μM)

|               | <b>LC-145</b> | <b>LC-160</b> | <b>LC-255</b> | <b>LC-254</b> | <b>doxorubicin</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| <b>Jurkat</b> | 103 ± 3       | 97 ± 1        | 92 ± 4        | 89 ± 3        | 1 ± 0              |
| <b>Molt-4</b> | 96 ± 7        | 96 ± 12       | 91 ± 17       | 93 ± 14       | 1 ± 2              |
| <b>A549</b>   | 103 ± 2       | 105 ± 5       | 83 ± 5        | 84 ± 2        | 17 ± 6             |
| <b>HT-29</b>  | 98 ± 4        | 93 ± 3        | 89 ± 3        | 88 ± 6        | 57 ± 4             |
| <b>PANC-1</b> | 102 ± 2       | 98 ± 4        | 87 ± 9        | 90 ± 10       | 67 ± 7             |
| <b>A2780</b>  | 100 ± 1       | 102 ± 2       | 107 ± 13      | 109 ± 8       | 11 ± 2             |
| <b>HeLa</b>   | 106 ± 5       | 107 ± 4       | 93 ± 2        | 92 ± 3        | 25 ± 11            |
| <b>MCF-7</b>  | 111 ± 6       | 108 ± 2       | 109 ± 4       | 106 ± 3       | 36 ± 3             |
| <b>SAOS-2</b> | 102 ± 5       | 96 ± 7        | 94 ± 1        | 94 ± 3        | 27 ± 5             |

**Tabulka 15:** Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10  $\mu$ M, koncentrace doxorubicinu 1  $\mu$ M) (pokračování)

|              | <b>LC-145</b> | <b>LC-160</b> | <b>LC-255</b> | <b>LC-254</b> | <b>doxorubicin</b> |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| <b>MRC-5</b> | 107 $\pm$ 5   | 101 $\pm$ 3   | 102 $\pm$ 8   | 103 $\pm$ 5   | 52 $\pm$ 7         |

**Tabulka 16:** Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10  $\mu$ M, koncentrace doxorubicinu 1  $\mu$ M)

|               | <b>LC-253</b> | <b>LC-256</b> | <b>LC-215</b> | <b>doxorubicin</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| <b>Jurkat</b> | 93 $\pm$ 4    | 91 $\pm$ 6    | 96 $\pm$ 6    | 1 $\pm$ 0          |
| <b>Molt-4</b> | 97 $\pm$ 21   | 94 $\pm$ 16   | 92 $\pm$ 10   | 1 $\pm$ 2          |
| <b>A549</b>   | 92 $\pm$ 7    | 94 $\pm$ 7    | 102 $\pm$ 9   | 17 $\pm$ 6         |
| <b>HT-29</b>  | 90 $\pm$ 4    | 89 $\pm$ 3    | 92 $\pm$ 2    | 57 $\pm$ 4         |
| <b>PANC-1</b> | 89 $\pm$ 9    | 90 $\pm$ 9    | 104 $\pm$ 3   | 67 $\pm$ 7         |
| <b>A2780</b>  | 109 $\pm$ 6   | 109 $\pm$ 7   | 102 $\pm$ 3   | 11 $\pm$ 2         |
| <b>HeLa</b>   | 104 $\pm$ 10  | 100 $\pm$ 1   | 107 $\pm$ 8   | 25 $\pm$ 11        |
| <b>MCF-7</b>  | 111 $\pm$ 4   | 108 $\pm$ 3   | 105 $\pm$ 2   | 36 $\pm$ 3         |
| <b>SAOS-2</b> | 96 $\pm$ 2    | 103 $\pm$ 11  | 95 $\pm$ 6    | 27 $\pm$ 5         |
| <b>MRC-5</b>  | 100 $\pm$ 5   | 102 $\pm$ 6   | 102 $\pm$ 2   | 52 $\pm$ 7         |

## 6. DISKUZE A ZÁVĚR

Katedra farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové se dlouhodobě věnuje výzkumu AA a jejich polosyntetických derivátů jako látek použitelných v terapii neurodegenerativních, nádorových a dalších onemocnění.<sup>[6][15][21][34][36][39][40][42][43][76][77]</sup> Tato diplomová práce navazuje na předchozí práce vypracované na katedře, které se zabývaly přípravou derivátů alkaloidů haemantaminu, ambellinu a lykorinu. Předmětem této práce byl alkaloid chlidantin, který je polohovým izomerem galantaminu, který se využívá v terapii AD a působí jako selektivní reversibilní inhibitor AChE a zároveň zesiluje vlastní účinek acetylcholinu na nikotinové receptory.<sup>[20]</sup> Tento alkaloid byl na pracovišti izolován v rámci předchozích fytochemických studií z *Chlidanthus fragrans*.<sup>[34]</sup>

V rámci předložené diplomové práce bylo syntetizováno deset aromatických derivátů alkaloidu chlidantinu. Výběr substitučních činidel byl proveden na základě výsledků předchozích studií, kdy byly připravovány estery výše zmíněných alkaloidů. Z těchto studií vyplynul poznatek, že alifatické estery nevykazují inhibiční účinek vůči cholinesterázám, zatímco aromatické ano.<sup>[77]</sup> Všechny syntézy probíhaly v prostředí bezvodého pyridinu za přítomnosti dimethylaminopyridinu jako katalyzátoru. Pro přípravu derivátů byly použity různé substituované benzoylchloridy, toluoylchloridy a naftoylchloridy. Pro získání a přečištění připravených derivátů byla použita metoda preparační TLC. Připravené látky byly identifikovány pomocí NMR, MS a optické otáčivosti. Deriváty byly získány ve formě bílých a světle žlutých krystalických látek. Pro screening biologických aktivit byly připraveny hydrochloridy derivátů za účelem zlepšení rozpustnosti v průběhu biologických studií. Všechny připravené deriváty byly na katedře syntetizovány poprvé.

U všech látek bylo získáno dostatečné množství derivátů, umožňující testování na protinádorovou a inhibiční aktivitu proti AChE a BuChE. Bohužel nitroderivát LC-258 byl při uchování nestabilní, kdy docházelo k rozkladu na výchozí látky, a proto ho nebylo možné zařadit do studií biologických aktivit.

Jak již bylo řečeno výše, látky schopné inhibice cholinesteráz jsou potenciálně využitelné v terapii AD. Všechny připravené deriváty byly nejprve testovány v rámci screeningové studie při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , a u látek, které vykazovaly inhibici minimálně ve výši 45% proti AChE a 50% proti BuChE, byla dále stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$ . Jako standard byl použit galantamin, který je součástí již zavedené terapie AD. Bohužel žádný z připravených derivátů nedisponoval výraznou inhibiční aktivitou vůči AChE (Tab. 14), na druhou stranu čtyři deriváty inhibovaly BuChE při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  více jak z 50%. Jedná se o deriváty 3-*O*-(benzoyl)chlidantin

(LC-145), 3-*O*-(1-naftoyl)chlidantin (LC-214), 3-*O*-(2-methoxybenzoyl)chlidantin (LC-254) a 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidantin (LC-259). Tři z nich byly vybrány pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$ . (Tab. 14) Nejzajímavější aktivitu proti BuChE vykazala látka 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidantin (LC-259) s hodnotou  $IC_{50} = 13,28 \pm 0,36$ . Zároveň tato látka vykazala selektivní inhibici vůči BuChE s indexem selektivity  $>8,3$ . Jak již bylo výše uvedeno selektivní inhibice BuChE by mohla být potenciálním cílem v terapii pokročilé AD, vzhledem k faktu, že u pacientů s AD je v místě senilních plaků více tvořena BuChE, a tím stoupá její význam při odbourávání ACh.<sup>[58][59]</sup>

Důležitou součástí účinku je i schopnost dosažení cílového místa, což v případě inhibitorů cholinesteráz je přestup látky do mozku.<sup>[77]</sup> U všech připravených derivátů byla vypočtena hodnota  $\log BB$ , která popisuje permeabilitu přes hematoencefalickou bariéru. Na základě získaných hodnot  $\log BB$  ( $\log BB = 0,045-0,186$ ) je možné konstatovat, že všechny připravené deriváty jsou schopny přestupu přes BBB.

Získané látky byly také podrobeny biologickému testování ke stanovení cytotoxického působení vůči nádorovým buněčným liniím Jurkat, MOLT-4, A-549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a nenádorové buněčné linie MRC-5. Bohužel žádný z připravených a testovaných derivátů nevykazoval zajímavou aktivitu, kdy viability všech buněčných linií po 48 hodinách ovlivnění deriváty v koncentraci 10  $\mu M$  byly nad 80% (Tab. 15, Tab. 16). Jako standard byl použit doxorubicin. Deriváty LC-259 a LC-214 budou testovány v nejbližší době.

Závěrem lze říci, že se podařilo připravit pouze jeden derivát s výraznou inhibiční aktivitou (BuChE). Tato látka by mohla být použita jako tzv. „lead-structure“, ale vzhledem k nízké dostupnosti chlidantinu z biologického materiálu a získaným hodnotám  $IC_{50}$  je tato představa spíše nereálná. V porovnání se stejnými deriváty připravenými od haemantaminu, ambellinu a vittatinu v rámci přechozích studií, derivát chlidantinu vykázal nejnižší inhibiční potenciál. Nejaktivnější látkou ze zmíněných derivátů byl 11-*O*-(2-methylbenzoyl)ambellin, který disponuje silným, navíc selektivním inhibičním potenciálem vůči BuChE s hodnotou  $IC_{50} 0,28 \pm 0,02 \mu M$ .<sup>[78]</sup>



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Dohnal F.: Studijní texty k dějinám farmacie, Karolinum, 2014
2. Martínez M.A., Ballesteros S.: Opium poisoning in modern times. An overview, *Forensic Sci Int*, 302, 109848, 2019
3. Opletal L. Prolegomenon české farmakognozie: 21. století, *Ceska slov farm*, 62, 99-102, 2013
4. Jahodář L.: Rostliny způsobující otravy, Karolinum, 2018
5. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: Farmakognozie, Univerzita Karlova – Nakladatelství Karolinum, 193-257, 2016
6. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění, *Chem listy* 107, 701-708, 2013
7. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin Farmakol Farm*, 18, 212-214, 2004
8. The angiosperm phylogeny group: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III, *Bot Journal Linn Soc*, 161, 105-121, 2009
9. Nair J. J., van Staden J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae, *Food Chem Toxicol*, 62, 262-275, 2013
10. Jahodář L.: Farmakobotanika – Semenné rostliny, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, str. 181., 2012
11. Opletal L.: Daidalea-Univerzita Karlova [online]. 2019 [cit. 28. 10. 2019]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>
12. Bastida J., Lavilla R., Viladomat F.: Chapter 3: Chemical a biological aspects of *Narcissus* alkaloids, v knize *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 63, 87-179, 2006
13. Torras Claveria L., Tallini L., Viladomat Meya F., Bastida Armengol J., Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds, v knize *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 7, 69-82, 2017
14. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni L. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids, v knize *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2, 65-100, 2011
15. Hulcová D.: Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae), Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018

16. Jin Z., Xu X.H.: Amaryllidaceae alkaloids, Nat Prod, 479-522; Springer, Berlin, Heidelberg; 2013
17. Ji YB., Wei C., Xin GS.: The study of chemical composition and pharmacological action of the alkaloid from plants of *Lycoris* Herb; IOP Conf Ser: Earth Environ Sci, 100, 2017
18. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts, Life Sci J, 71, 2521-2529, 2002
19. Reyes-Chilpa R., Berkov S., Hernández-Ortega S., Jankowski Ch.K., Arseneau S., Clotet-Codina I., Esté J.A., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*, Molecules, 16, 9520-9533, 2011
20. Doležal M., Kučerová M., Miletín M., Musílek K., Opletalová V., Zimčík P.: Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2013, str 91-93
21. 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, 11, 1587-1594, 2016
22. Torras-Claveria L., Berkov S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity, Ind Crop Prod, 43, 237-244, 2013
23. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby, Prakt lékáren, 7, 39-41, 2011
24. Roy M., Liang L., Xiao X., Feng P., Ye M., Liu J.: Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery, Biomed Pharmacother, 107, 615-624, 2018
25. Lamoral-Theys D., Andolfi A., Van Goietsenoven G., Cimmino A., Le Calvé B., Wauthoz N., Mégalizzi V., Gras T., Bruyère C., Dubois J., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight, J Med Chem, 52, 6244-6256, 2009
26. Cao ZF., Yang P., Zhou QS.: Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine; Sci China Chem; 56, 1382-1391, 2013

27. Ji Y., Yu M., Qi Z., Cui D., Xin G., Wang B., Jia W., Chang L.: Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway, *Saudi Pharm J*, 25, 633-637, 2017
28. Chongshan W., Qiongren W., Xiezhao L., Zhong J., Peng X., Naijin X., Abai X., Yawen X., Shaobo Z., Junxia Z., Chunxiao L.: Lycorine induces apoptosis of bladder cancer T24 cells by inhibiting phospho-Akt and activating the intrinsic apoptotic cascade, *Biochem Bioph Res Co*, 483, 197-202, 2017
29. Szlávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J.: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids, *Planta Med*, 70, 871–873, 2004
30. Liu R., Cao Z., Tu J., Pan Y., Shang B., Zhang G., Bao M., Zhang S., Yang P., Zhou Q.: Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry, *Pigm Cell Melanoma R*, 25, 630-638, 2012
31. Liu XS., Jiang J., Jiao XY., Wu YE., Lin JH., Cai YM.: Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells, *Cancer Lett*, 274, 16-24, 2009
32. Dneg L., Dai P., Ciro A., Smee D.F., Djaballah H., Shuman S.: Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. *J Virol*, 81, 13392-13402, 2007
33. Shen J-W., Ruan Y., Ren W., Ma B-J., Wang X-L., Zheng C-F.: Lycorine: A potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi, *J Microbiol Biotechn*, 24, 354-358, 2014
34. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities, *Nat Prod Commun*, 8, 1541-1544, 2013
35. Cedron J.C., Gutierrez D., Flores N., Ravelo A.G., Estevez-Braun A.: Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorg Med Chem*, 18, 4694-4701, 2010
36. Vaněčková N.: Study of the inhibitory (toxic) effect of the alkaloids from chosen plants of Amaryllidaceae family on some human enzymatic systems (*in vitro* study) II, *Disertační práce*, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018
37. Pellegrino S., Meyer M., Zorbas C., Bouchta S. A., Saraf K., Pelly S. C., Kornienko A., Yusupov M.: The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth, *Structure*, 26, 416-425, 2018

38. Cedrón J.C., Ravelo Á.G., León L.G., Padrón J.M., Estévez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids, *Molecules*, 20, 13854-1386, 2015
39. Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., Hulcová D., Opletal L., Cahlíková L.: Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity, *Nat Prod Commun*, 13, 419-422, 2018
40. 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*, 13, 394-398, 2015
41. 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*, 22, 6195–6199, 2012
42. 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 $\beta$  inhibitors, *Molecules*, 23, 719, 2018
43. Ločárek M., Nováková J., Klouček P., Hošťálková A., Kokoška L., Gábrlová L., Šafratová M., Opletal L., Cahlíková L.: Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species, *Nat Prod Commun*, 10, 1537-1540, 2015
44. Reyes-Chilpa R., Berkov S., Hernández-Ortega S., Jankowski Ch. K., Arseneau S., ClotetClodina I., Este J. A., Codina C, Viladomat F., Bastida J.: Acetylcholinesterase inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*, *Molecules*, 16, 9520-9533, 2011
45. O'Brien S. F., Ward S., Gallian P., Fabra C., Pillonel J., Kitchen A. D., Davison K., Seed C. R., Delage G., Steele W. R., Leiby D. A.: Malaria blood safety policy in five non-endemic countries: a retrospective comparison through the lens of the ABO risk-based decision-making framework, *Blood Transfus*, 17, 94-102, 2019
46. Pettit GR., Gaddamidi V., Cragg GM., Herald DL., Sagawa Y.: Isolation and structure of pancratistatin, *J Chem Soc Chem Comm*, 24, 1693-1694, 1984
47. Pettit GR., Pettit GR.3rd, Groszek G., Backhaus RA., Doubek DL., Barr RJ., Meerow AW: Antineoplastic agents, 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis*, *J Nat Prod*, 58, 756-759, 1995

48. Siedlakowski P., McLachlan-Burgess A., Griffin C., Tirumalai S.S., McNulty J., Pandey S.: Synergy of Pancreatistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Canc Biol Ther*, 7, 376-384, 2008
49. Yong Xiong, Yi-Jia Xiong, Dong-Yang Liu, Rong-Rong Shen: Pancreatistatin inhibits the growth of colorectal cancer cells by inducing apoptosis, autophagy, and G2/M cell cycle arrest; *Med Sci Monitor*; 25, 6015–6022, 2019
50. Piozzi F., Marino M.L., Fuganti C., Di Martino A.: Occurrence of non-basic metabolites in Amaryllidaceae. *Phytochemistry*, 8, 1745-1748, 1969
51. Wong Chi-Fai: The biological activities of narciclasine; A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of master of philosophy in biology; The Chinese University of Hong Kong; August 2002
52. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells, *Biochim biophys acta*, 425, 342-348, 1976
53. Mikami M., Kitahara M., Kitano M., Ariki Y., Mimaki Y., Sashida Y., Mimaki Y., Yui S.: Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model, *Biol Pharm Bull*, 22, 674-678, 1999
54. Holmerová I., Baumanová M., Jurašková B., Vaňková H., Jiráček R.: Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí, *Remedia.*, 6, 474-478, 2014
55. Alzheimerova choroba-Alzheimercentrum – [online] – dostupné z: <https://www.alzheimercentrum.cz/stranka/alzheimerova-choroba.html>, citováno 10.11.2019
56. Alzheimer's disease fact sheet, National institute on Aging, [online] dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>, citováno 10.11.2019
57. An Y., Zhang C., He S., Yao C., Zhang L., Zhang Q. Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Sci J*, 5, 1-5, 2008
58. Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby, *Neurol pro praxi*, 2, 112-117, 2007
59. Jiráček R.: Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby, *Psychiat. pro praxi*, 1, 8-11, 2006
60. Sneham Tiwari, Venkata Atluri, Ajeet Kaushik, Adriana Yndart, Madhavan Nair: Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics, *Int J Nanomed*, 14, 5541-5554, 2019

61. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*; 19, 342-345, 2009
62. Leslie Crews, Eliezer Masliah: Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Hum Mol Genet*, 19, R12–R20, 2010
63. LW Chu: Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment, *Hong Kong Med J*, 18, 228-37, 2012
64. Vlček J., Fialová D. a kolektiv: *Klinická farmacie I*, Grada Publishing, a.s., 283-286, 2010
65. Khoury R., Rajamanickam J., Grossberg G. T. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther Adv Drug Saf*, 9, 171-178, 2018
66. Weller J., Budson A.: Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment, *F1000Res*, 7, 2018
67. Atanasova M., Stavrakov G., Philipova I., Zheleva D., Yordanov N., Doytchinova I.: Galanthamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity, *Bioorg Med Chem*, 23, 5382-5389, 2015
68. D.S. Paskov: *Nivalin: Pharmacology and Clinical Application*, Medicina i Fizkultura, Sofia, Bulgaria, 1959
69. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> databáze registrovaných léků, použito 1.2.2020
70. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy, *Mil Med Sci Lett*, 72, 37-44, 2003
71. L. Fang, X. Fang, S. Gou, A. Lupp, I. Lenhardt, Y. Sun, Z. Huang, Y. Chen, Y. Zhang, C. Fleck: Design, synthesis and biological evaluation of D-ring opened galanthamine analogs as multifunctional anti-Alzheimer agents, *Eur J Med Chem*, 76, 376-386, 2014
72. Vezenkov L.T., Tsekova D.S., Kostadinova I., Mihaylova R., Vassilev N.G., Danchev N.D.: Synthesis of new galanthamine-peptide derivatives design for prevention and treatment of Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res*, 16, 183-192, 2019
73. Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J: *N*-alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*, *Bioorg Med Chem Lett*, 18, 2263-2266, 2008
74. P. Jia, R. Sheng, J. Zhang, L. Fang, Q. He, B. Yang, Y. Hu: Design, synthesis and evaluation of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors, *Eur J Med Chem*, 44, 772-784, 2009

75. European patent office EP2123328B1, Sopharma AD, Vezenkov L., Goergieva M., Danalev D., Ivanov C., Bakalova A., Hristov K., Mitev V., Sevalle J.: Galanthamine derivatives, methods for their obtaining and use, 2011
76. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity, *Nat Prod Commun*, 6, 603-606, 2011
77. Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečny J., Hulcová D., Kučera T., Martinez-Gonzalez L., Maříková J., Hrabínová M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L.: Derivatives of the  $\beta$ -crinine Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease, *Molecules*, 24, 1307, 2019
78. Maříková J., Ritomská A., Korábečný J., Peřinová R., Al Mamun A., Kučera T., Kohelová E., Hulcová D., Koblrová T., Kuneš J., Nováková L., Cahlíková L.: Aromatic esters of the crinine Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase, *J Nat Prod*, přijatý k publikování, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00561

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

**Obr. 1:** Zjednodušené schéma biosyntézy 4'- *O*-methylnorbelladinu

**Obr. 2:** Schéma biosyntézy Amaryllidaceae alkaloidů

**Obr. 3:** Struktura základních typů Amaryllidaceae alkaloidů

**Obr. 4:** Vzorce vybraných alkaloidů galantaminového typu

**Obr. 5:** Mechanismus neurodegenerace u Alzheimerovy choroby

**Obr. 6:** Látky v terapii Alzheimerovy choroby

**Obr. 7:** Otevřené analogy galantaminu

**Obr. 8:** Deriváty galantaminu s navázaným indolovým zbytkem

**Obr. 9:** *N*-(14-methylallyl)norgalantamin (2) a *N*-allylnorgalantamin (1)

**Obr. 10:** Struktura derivátu 10-*N*-demethyl-10-*N*-(6-(4-(piperidin-1-ylmethylfenoxy)hexan-1-yl)-galantaminu

**Obr. 11:** Deriváty galantaminu ve formě esterů a amidů

**Obr. 12:** Syntéza 3-*O*-(Benzoyl)chlidantinu

**Obr. 13:** Syntéza 3-*O*-(4-methylbenzoyl)chlidantinu

**Obr. 14:** Syntéza 3-*O*-(3-nitrobenzoyl)chlidantinu

**Obr. 15:** TLC derivátu LC-258

**Obr. 16:** Syntéza 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidantinu

**Obr. 17:** Syntéza 3-*O*-(3-methylbenzoyl)chlidantinu

**Obr. 18:** Syntéza 3-*O*-(2-methoxybenzoyl)chlidantinu

**Obr. 19:** Syntéza 3-*O*-(3-methoxybenzoyl)chlidantinu

**Obr. 20:** Syntéza 3-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)chlidantinu

**Obr. 21:** Syntéza 3-*O*-(1-naftoyl)chlidantinu

**Obr. 22:** Syntéza 3-*O*-(2-naftoyl)chlidantinu



- Tab. 1:** Inhibiční aktivita proti AChE alkaloidů galantaminového typu vyjádřené jako IC<sub>50</sub>
- Tab. 2:** Hodnoty IC<sub>50</sub> lykorinu na nádorových buněčných liniích
- Tab. 3:** Míra inhibice lykorinu proti 24 patogenním houbám *in vitro*
- Tab. 4:** Hodnoty IC<sub>50</sub> haemantaminu proti vybraným nádorovým buněčným liniím
- Tab. 5:** Amaryllidaceae alkaloidy haemantaminového typu a jejich vliv na inhibici GSK-3β v porovnání s alkaloidem masoninem
- Tab. 6:** Hodnoty IC<sub>50</sub> pankratistatinu proti nádorovým buněčným liniím kolon a nenádorové buněčné linii CDD-18Co
- Tab. 7:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE syntetizovaných derivátů galantaminu
- Tab. 8:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE syntetizovaných derivátů galantaminu
- Tab. 9:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE nejaktivnějších derivátů galantaminu
- Tab. 10:** Hodnoty IC<sub>50</sub> nejúčinnějšího derivátu studie a jeho srovnání s galantaminem v inhibici AChE a BuChE
- Tab. 11:** Hodnoty IC<sub>50</sub> proti AChE a BuChE vybraných derivátů vykazujících inhibiční aktivitu
- Tab. 12:** Buněčné linie používané ke stanovení protinádorové aktivity
- Tab. 13:** Připravené deriváty a jejich procentuální výtěžky
- Tab. 14:** Hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných derivátů chlidantinu v porovnání se standardem galantaminem
- Tab. 15:** Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM)
- Tab. 16:** Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM)

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Adéla Potůčková

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

Název diplomové práce: Deriváty Amaryllidaceae alkaloidů a jejich biologická aktivita

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou zdrojem velkého množství biologicky aktivních látek označovaných jako Amaryllidaceae alkaloidy. Jejich účinky zahrnují cytotoxickou, antifungální, antivirovou, antibakteriální nebo antimalarickou aktivitu, a v neposlední řadě také inhibici cholinesteráz. Mezi Amaryllidaceae alkaloidy galantaminového typu můžeme zařadit také alkaloid chlidantin, který je polohovým izomerem v klinické praxi používaného galantaminu. Zdrojem chlidantinu jsou rostliny *Chlidanthus fragrans*, *Haemanthus multilflorus* a *Hippeastrum aulicum*.

Předmětem této diplomové práce byla příprava derivátů alkaloidu chlidantinu a studium jejich biologické aktivity v souvislosti s terapií Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění. Bylo připraveno deset aromatických esterových derivátů chlidantinu. Připravené látky byly identifikovány pomocí NMR, MS a optické otáčivosti. Většina derivátů byla screeningově testována na jejich inhibiční potenciál vůči AChE a BuChE a na jejich cytotoxický potenciál vůči panelu nádorových a nenádorových buněčných linií.

Nejzajímavější aktivita byla zjištěna u derivátu 3-O-(2-methylbenzoyl)chlidantinu (LC-259), který vykazoval selektivní inhibici vůči BuChE a byl schopný přestupu přes BBB. Toxicita bude testována v nejbližší době. Látka by mohla být použita jako „lead structure“ pro další vývoj.

Klíčová slova: chlidantin, Amaryllidaceae, alkaloidy, Alzheimerova choroba, protinádorová aktivita

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Adéla Potůčková

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

Title of diploma thesis: Derivatives of Amaryllidaceae alkaloids and their biological activity

The plants of Amaryllidaceae family are source of a large amount of biologically active substances called Amaryllidaceae alkaloids. Their effects include cytotoxic, antifungal, antiviral, antibacterial or antimalaric activity and, last but not least, the inhibition of cholinesterases. The Amaryllidaceae alkaloids, galanthamine type also includes alkaloid chlidanthine, which is a positional isomer of the clinically practice used alkaloid galanthamine. The sources of chidanthine are *Chlidanthus fragrans*, *Haemanthus multiflorus* and *Hippeastrum aulicum*.

The object of this thesis was the preparation of chlidanthine derivatives, and the study of their biological activity connected to the therapy of Alzheimer's disease and cancer. Ten aromatic ester derivatives of chlidanthine were prepared. The chemical structures were elucidated by NMR, MS experiments and optical rotation. Most derivatives were screened for their AChE and BuChE inhibitory potential and their cytotoxic potential against a panel of tumor and non-tumor cell lines.

The most interesting activity was found with the 3-*O*-(2-methylbenzoyl)chlidanthine derivative, which showed selective inhibition against BuChE and was able to cross the BBB. Toxicity will be tested shortly. The substance could be used as a lead structure for further development.

Keywords: chlidanthine, Amaryllidaceae family, alkaloids, Alzheimer's disease, antitumor activity