

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmaceutickej botaniky**

---



**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Deriváty Amaryllidaceae alkaloidov a ich biologická aktivita: Deriváty tazettínu II**

**Derivates of Amaryllidaceae alkaloids and their biological activity:  
Derivates of tazettine II**

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

Vedúca diplomovej práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, máj 2020

Dušan Zelina

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, máj 2020

.....  
podpis

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektu Špecifického vysokoškolského výskumu SVV 260 295 a projektu OPVVV 02\_16\_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002682: Modernizácia laboratória bunecných interakcií s látkami prírodného pôvodu, MŠMT ČR/ Univerzita Karlova v Praze.

Týmto by som rád poďakoval doc. Ing. Lucii Cahlíkovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, poskytnuté materiály, ústretový prístup a pomoc pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Ďakujem Mgr. Daniele Hulcovej za poskytnutie alkaloidu tazettínu pre prípravu derivátov. Ďalej by som chcel poďakovať doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, PhD. za zmeranie štruktúrnych charakteristík pripravených látok, prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. a RNDr. Radimovi Havelkovi, PhD. za zmeranie biologických aktivít pripravených derivátov. V neposlednej rade ďakujem kolegom z laboratória a ostatným pracovníkom Katedry farmaceutickej botaniky za vytvorenie skvelých podmienok pri práci v laboratóriu.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>2. CIEĽ PRÁCE</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>- 9 -</b>
3.1 CHARAKTERISTIKA ČELADE AMARYLLIDACEAE .....	- 9 -
3.2 BIOSYNTÉZA AMARYLLIDACEAE ALKALOIDOV .....	- 10 -
3.3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ALKALOIDOV ČELADE AMARYLLIDACEAE.....	- 13 -
3.3.1 <i>Alkaloidy čelade Amaryllidaceae ako látky využiteľné v terapii Alzheimerovej choroby...</i>	- 13 -
3.3.2 <i>Alkaloidy čelade Amaryllidaceae ako látky využiteľné v terapii nádorových ochorení.....</i>	- 16 -
3.4 ŠTRUKTÚRNE TYPY ALKALOIDOV ČELADE AMARYLLIDACEAE – ROZDELENIE .....	- 17 -
3.4.1 <i>Alkaloidy galanthamínového štruktúrneho typu .....</i>	- 17 -
3.4.2 <i>Alkaloidy lykorínového štruktúrneho typu .....</i>	- 19 -
3.4.3 <i>Alkaloidy heamanthamínového a krinínového štruktúrneho typu .....</i>	- 22 -
3.4.4 <i>Alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu .....</i>	- 24 -
3.4.5 <i>Alkaloidy tazettínového štruktúrneho typu.....</i>	- 26 -
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>- 29 -</b>
4.1 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A METÓDY .....	- 29 -
4.1.1 <i>Amaryllidaceae alkaloidy .....</i>	- 29 -
4.1.3 <i>Vývíjacie sústavy pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu .....</i>	- 30 -
4.1.5 <i>Metódy pre screening biologických aktivít pripravených zlúčenín .....</i>	- 32 -
4.1.6 <i>Priprava hydrochloridov.....</i>	- 32 -
4.2 PRÍPRAVA POLOSYNTETICKÝCH DERIVÁTOV TAZETTÍNU A ICH ŠTRUKTÚRNA IDENTIFIKÁCIA ...	- 33 -
4.2.1 <i>Priprava 6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-173) .....</i>	- 33 -
4.2.2 <i>Priprava 6-O-(3-bromobenzoyl)tazettínu (LC-209).....</i>	- 35 -
4.2.3 <i>Priprava 6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-213).....</i>	- 37 -
4.2.4 <i>Priprava 6-O-(2,4-difluorobenzoyl)tazettínu (LC-200) .....</i>	- 39 -
4.2.5 <i>Priprava 6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-199).....</i>	- 41 -
4.2.6 <i>Priprava 6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-198) .....</i>	- 43 -
4.2.7 <i>Priprava 6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu (LC-201).....</i>	- 45 -
4.2.8 <i>Priprava 6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettínu (DZ-1) .....</i>	- 47 -
4.2.9 <i>Priprava 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu (LC-203) .....</i>	- 49 -
4.2.10 <i>Priprava 6-O-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettínu (LC-205) .....</i>	- 51 -
<b>5.VÝSLEDKY</b> .....	<b>- 53 -</b>
5.1. PRÍPRAVA POLOSYNTETICKÝCH DERIVÁTOV .....	- 53 -
5.2. SCREENING BIOLOGICKÝCH AKTIVÍT .....	- 54 -
5.2.1. <i>Inhibičná aktivita derivátov proti AChE a BuChE a ich prestup cez HEB .....</i>	- 54 -
5.2.2. <i>Protinádorová aktivita derivátov .....</i>	- 55 -

5.3. OPTICKÁ OTÁČAVOSŤ .....	- 56 -
<b>6. DISKUSIA A ZÁVER .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>7. LITERATÚRA.....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>9. ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>10. ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>- 70 -</b>

# 1. ÚVOD

Rastliny sa využívali v ľudovom liečiteľstve už odpradáva. Ľudia s postupom času pochopili, že rastliny je možné využívať nielen ako potravu, ale aj na liečenie. Takisto zistili, že niektoré druhy rastlín sú pre nich nebezpečné. Empirickou formou šťastných náhod, ale žiaľ mnohokrát aj tragických omylov, sa takto vytvorila skupina liečivých rastlín. Tieto rastliny sa v prvotnej spoločnosti používali nespracované.<sup>1</sup>

Množstvo farmaceuticky významných látok bolo izolovaných z rastlín, živočíchov, húb, morských organizmov a mikroorganizmov. Potreba vývoja nových biologicky účinných látok je nevyhnutnou súčasťou farmaceutického výskumu. Inovácie sú nutné v dôsledku množstva nežiadúcich účinkov, nešpecifického mechanizmu účinku, rezistencie baktérií na antibiotiká či nádorového tkaniva na cytostatikum. Dnes, aj napriek pokročilým technológiám umožňujúcim syntézu nových látok, sa výskum stále viac orientuje na prírodné zdroje, ako napríklad rastliny, ktoré sú zdrojom nespočetného množstva látok s rôznymi chemickými štruktúrami a širokým spektrom biologických aktivít. Príkladom takýchto látok môžu byť sekundárne metabolity rastlín, ktoré sa nazývajú alkaloidy. Rastliny však obsahujú aj primárne metabolity. Sú výsledkom základných fyziologických procesov prebiehajúcich v rastlinách nazývaných aj ako primárny metabolizmus. Sekundárne metabolity na rozdiel od primárnych metabolitov nie sú nevyhnutné pre rast a vývoj rastlín. Nie sú však prítomné vo všetkých rastlinách. Niektoré zo sekundárnych metabolitov boli izolované a našli svoje uplatnenie v terapii bakteriálnych či mykotických infekcií, kardiovaskulárnych a nádorových ochorení.<sup>2</sup>

Alkaloidy sú prírodné organické látky obsahujúce dusík v heterocyklickom kruhu, ktoré majú výrazné, spravidla veľmi špecifické účinky.<sup>3</sup> Významnou a biologicky veľmi aktívnou skupinou alkaloidov sú alkaloidy amarylkovitých rastlín. Sú produkované výhradne rastlinami čeľade Amaryllidaceae a vyznačujú sa rozmanitosťou štruktúr a účinku. Radíme ich medzi isochinolínové deriváty z dôvodu ich rovnakého prekursoru, tyrozínu. Tieto látky sú známe hlavne kvôli galanthamínu, ktorý sa ako selektívny reverzibilný inhibítor acetylcholinesterázy využíva v liečbe Alzheimerovej choroby (AD).

AD je progresívne neurodegeneratívne ochorenie, ktoré je najčastejšou príčinou demencie a taktiež jedna z primárnych príčin úmrtí. K jej prejavom patrí strata pamäti, porucha kognitívnych funkcií, zmeny chovania a neschopnosť sebakontroly.<sup>4</sup> V dnešnej

dobe sa tak stáva veľkým sociálnym problémom. Toto ochorenie v roku 2010 postihovalo 36 miliónov ľudí. Nárast pacientov trpiacich touto chorobou sa do roku 2050 odhaduje až na 144 miliónov.<sup>5</sup> V súčasnosti nevieme kauzálne liečiť AD, pretože nie je známa príčina jej vzniku. Sú známe však niektoré patologické faktory, veľmi významným je produkcia a ukladanie proteínu  $\beta$ -amyloidu. Podávaním farmakoterapie však môžeme spomaliť progresiu choroby a oddialiť nástup ťažkých štádií demencie.

Vznik nového liečiva je možný viacerými cestami. Popri izolácii nových látok, potenciálne využiteľných v liečbe rôznych ochorení, tu rozhodujúcu úlohu zohráva chémia. V laboratóriách je možné pripraviť nové látky, ktorých štruktúra je len minimálne odlišná od známych a používaných liečiv. Už malá zmena v štruktúre látky môže výrazne zmeniť jej biologický účinok. Preto je dôležité štúdium vzťahu štruktúra-účinok pri vývoji novej látky. Žiadna nová látka sa nestane liečivom len tým, že bola izolovaná alebo syntetizovaná. Tým sa stane až po dlhodobom preklinickom a klinickom testovaní. Väčšina novoobjavených látok bohužiaľ vykazuje závažné nežiadúce účinky a tak nie je možné pokračovať v ďalšom testovaní.

Predmetom tejto diplomovej práce bola príprava polosyntetických derivátov alkaloidu tazettínu, presnejšie halogenovaných derivátov, ich štruktúrna analýza a testovanie spektra biologických aktivít. Jedná sa o pokračovanie výskumu katedry farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej. Práca vychádza z činnosti pracovnej skupiny ADINACO, ktorá sa zaoberá izoláciou obsahových látok rastlín (sekundárnych metabolitov) a sledovaním ich biologickej aktivity. Tazettín bol pre túto diplomovú prácu vybraný práve z tohoto dôvodu. Zámerom prípravy týchto látok bolo ich možné využitie v terapii AD, prípadne ich využitie v terapii nádorových ochorení.

## 2. CIEĽ PRÁCE

Katedra farmaceutickej botaniky sa venuje skúmaniu alkaloidov čeľade Amaryllidaceae a prípravou polosyntetických derivátov vybraných alkaloidov. Tieto deriváty vykazujú priaznivú aktivitu v protinádorovej, antimalarickej liečbe a hlavne v liečbe AD.

Hlavné ciele diplomovej práce:

- 1) spracovanie rešerše k problematike využitia alkaloidov čeľade Amaryllidaceae a ich syntetických derivátov v terapii Alzheimerovej choroby,
- 2) príprava polosyntetických derivátov alkaloidu tazettínu čeľade Amaryllidaceae pre biologické testovanie podľa literárnej rešerše,
- 3) stanovenie základných fyzikálne-chemických charakteristík pripravených derivátov,
- 4) biologické testovanie pripravených derivátov ako na domácom pracovisku, tak v spolupráci s ďalšími vedeckými inštitúciami,
- 5) vyhodnotenie výsledkov a spísanie diplomovej práce.



### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1 Charakteristika čeľade Amaryllidaceae

Rastliny čeľade Amaryllidaceae sú známe hlavne kvôli produkcii veľkej skupiny alkaloidov nazývaných Amaryllidaceae alkaloidy, ktoré sa dajú potencionálne využiť k terapii rôznych závažných ochorení. Jedná sa o vytrvalé rastliny s podzemnými cibuľami, podzemkami alebo cibuľovými hl'uzami. Doposiaľ poznáme zhruba 65 rodov a 850 druhov, ktoré sú rozšírené hlavne v miernych a subtropických oblastiach.<sup>6</sup> Rastú voľne alebo bývajú pestované pre okrasu. Plodom je bobuľa alebo toboľka.<sup>6,7</sup> Vybraní zástupcovia čeľade Amaryllidaceae, ktoré sa bežne vyskytujú na našom území, sú zobrazené na Obr. 1.<sup>8</sup>



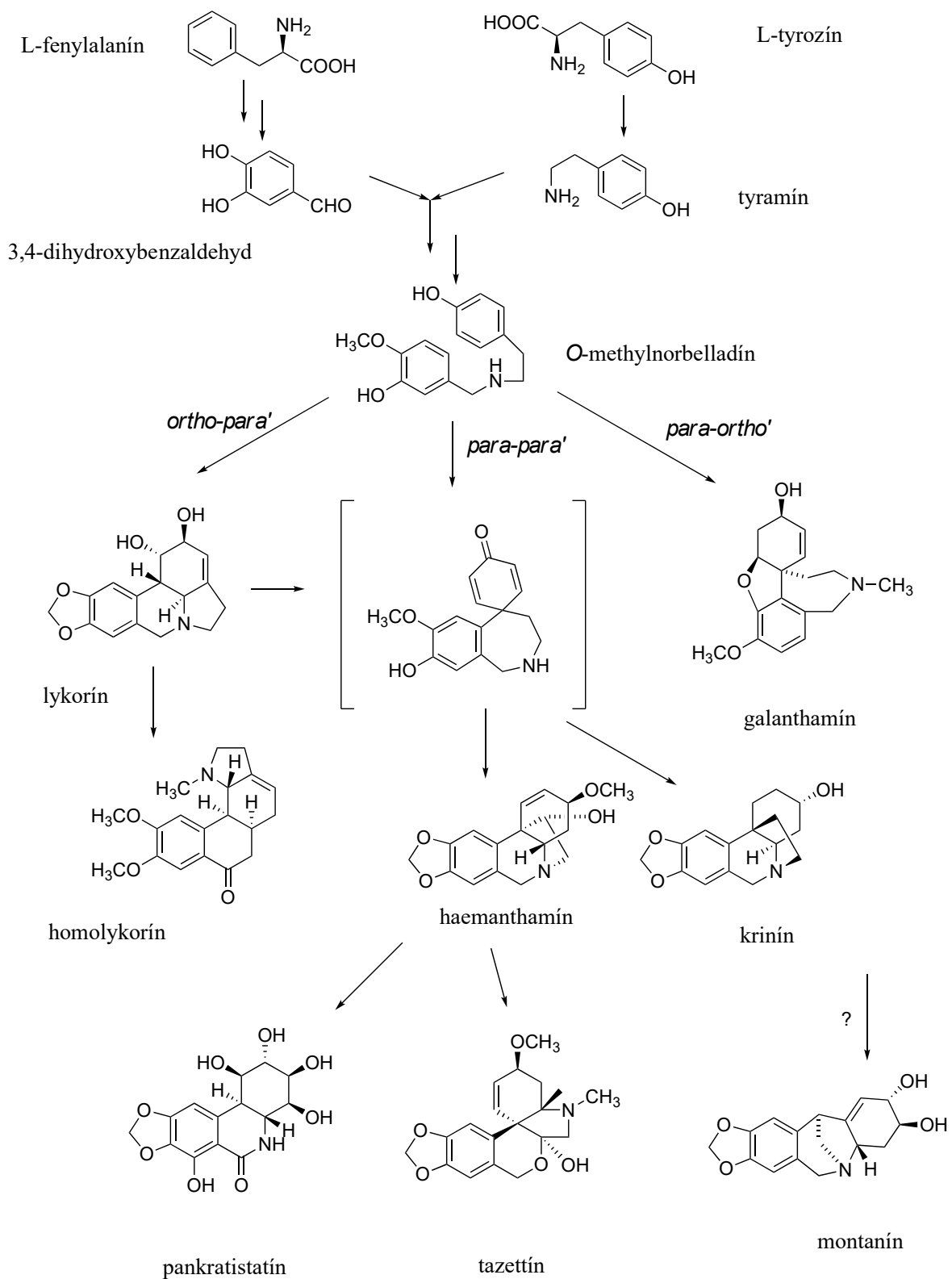
**Obr.1:** *Galanthus nivalis*,<sup>8a</sup> *Narcissus pseudonarcissus*,<sup>8b</sup> *Leucojum vernum*<sup>8c</sup>

Liečebné vlastnosti týchto rastlín boli známe už v 4. storočí pred našim letopočtom.<sup>9</sup> Amaryllidaceae alkaloidy delíme na 9 hlavných štruktúrnych typov. Na základe tejto klasifikácie má každá skupina svojho zástupcu, ktorými sú: krinín, galanthamín, haemanthamín, homolykorín, lykorín, montanín, pankratistatín, norbelladín a tazettín.<sup>10</sup> Prehľad štruktúrnych typov Amaryllidaceae alkaloidov (AA) spolu s ich základnými zástupcami a rodmi, z ktorých boli izolované uvádzam v tabuľke 1. Mnohé z nich, ako napríklad lykorín, narciklasín, pankratistatín a haemanthamín vykazujú sľubnú protinádorovú aktivitu už v mikromolárnych koncentráciách.<sup>11</sup> Faktom naďalej ostáva, že väčšina látok s významnou biologickou aktivitou je stále v štádiu preklinického vývoja. To platí aj pre najpreskúmanejšie zlúčeniny s uplatnením v liečbe nádorových ochorení ako

napríklad lykorín alebo pankratistatín. Výhodou týchto látok je selektivita pôsobenia proti nádorovým bunkám. Nevýhodou je pomerne nízky obsah niektorých biologicky zaujímavých alkaloidov v rastlinách. Práve preto v dnešnej dobe pretrváva snaha o prípravu syntetických analógov s terapeuticky lepšími vlastnosťami.

### 3.2 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov

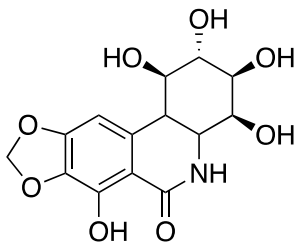
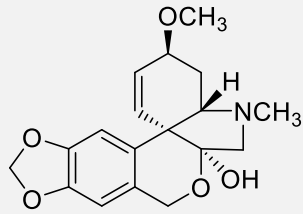
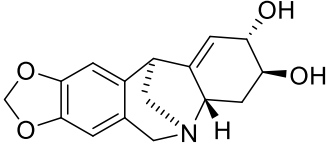
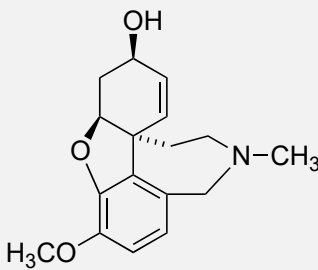
Špecifickou biosyntetickou cestou AA je tzv. norbelladinová cesta, ktorá je schematicky znázornená na Obr. 2. Počiatočné látky pre syntézu alkaloidov tvoria dve aromatické aminokyseliny – L-fenylalanín a L-tyrozín. L-Fenylalanín sa premieňa na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a L-tyrozín na tyramín. Spojením týchto látok po niekoľkých reakciách vzniká *O*-methylnorbelladín.<sup>12</sup> Následným oxidatívnym spojením kruhov v polohách *para-ortho* vzniká galanthamínový typ, v polohách *para-para* dochádza ku vzniku heamanthamínového, krinínového, tazettínového a pankrastatínového typu a v polohách *ortho-para* vzniká lykorínový a homolykorínového typ. Biosyntetická cesta vedúca k vzniku montanínového štruktúrneho typu nebola doposiaľ spoľahlivo vysvetlená.<sup>13</sup>



**Obr. 2:** Biosyntéza hlavných štruktúrnych typov Amaryllidaceae alkaloidov (prevzaté)<sup>9</sup>

**Tabuľka 1:** Štruktúrne typy alkaloidov *Amaryllidaceae*, hlavní zástupcovia a príklady rodov, z ktorých boli izolované (prevzaté a skrátené z literatúry)<sup>13</sup>

Štruktúrny typ	Hlavný zástupca	Rod
Norbelladínový	Norbelladín	<i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <i>Nerine</i> <i>Chlidanthus</i>
Lykorínový	Lykorín	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
Homolykorínový	Homolykorín	<i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i>
Krinínový	Krinín	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Haemanthamínový	Haemanthamín	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>

Pankratistatínový	Pankratistatín		<i>Boophane</i> <i>Haemanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratinum</i> <i>Zephyranthes</i>
Tazettínový	Tazettín		<i>Clivia</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Zephyranthes</i>
Montanínový	Montanín		<i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i> <i>Panocratinum</i> <i>Scadoxus</i>
Galanthamínový	Galanthamín		<i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>

### 3.3 Biologická aktivita alkaloidov čeľade Amaryllidaceae

Ako som už v úvode tejto práce načrtol, alkaloidy amarylkovitých rastlín sa vyznačujú naozaj širokou biologickou aktivitou, čo potvrdzuje aj množstvo vykonaných štúdií, ktoré priniesli zaujímavé výsledky. K ich najznámejšej aktivite patrí inhibičná aktivita voči acetylcholinesteráze (AChE) a protinádorová aktivita.<sup>14,15,16,17</sup>

#### 3.3.1 Alkaloidy čeľade Amaryllidaceae ako látky využiteľné v terapii Alzheimerovej choroby

AD je degeneratívne ochorenie mozgu a najbežnejšia príčina demencie.<sup>18,19</sup> Demencia sa vyznačuje znížením pamäti, jazyka, riešenia problémov a ďalšími kognitívnymi schopnosťami, ktoré ovplyvňujú schopnosť človeka vykonávať každodenné

činnosti. K tomuto poklesu dochádza, pretože nervové bunky v častiach mozgu zapojených do kognitívnych funkcií boli poškodené alebo zničené. Pri AD poškodenie a zničenie neurónov nakoniec ovplyvní ďalšie časti mozgu, vrátane tých, ktoré umožňujú osobe vykonávať základné telesné funkcie, ako je chôdza a prehĺtanie. Ľudia v konečných štádiách choroby sú viazaní na lôžko a vyžadujú nepretržitú starostlivosť. Postupná progresia tohto ochorenia nakoniec vyústí smrťou pacienta.<sup>20</sup>

AD sa prvýkrát zistila pred viac ako 100 rokmi, ale uplynulo 70 rokov, kým sa uznala za najbežnejšiu príčinu demencie a za jednu z hlavných príčin smrti.<sup>21</sup> Až potom sa AD stala významnou oblasťou výskumu. Aj keď výskum ktorý nasledoval, odhalil mnoho o AD, ešte stále treba objaviť veľa o presných biologických zmenách, ktoré spôsobujú AD, prečo postupuje rýchlejšie u niektorých ako u iných a o tom, ako možno chorobe zabrániť, spomaliť alebo ju zastaviť.

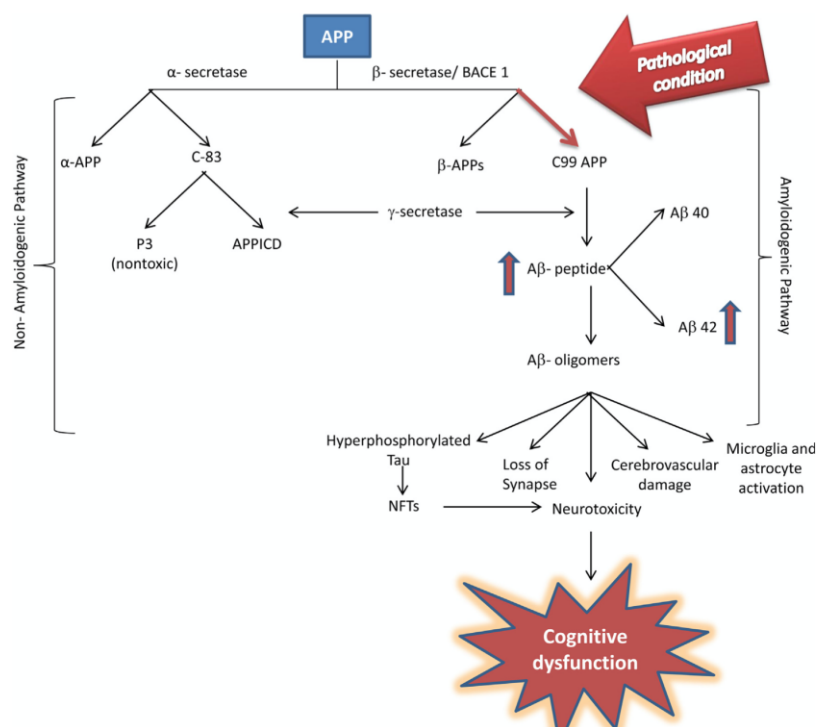
Rozlišujeme dve formy AD, včasnú a neskorú formu. Samotné ochorenie má niekoľko štádií podľa úrovne straty pamäti. Počiatočné štádium je badateľné, keď pacient začne hľadať odložené predmety a zabúda vykonávať bežné činnosti. Pacient je však stále samostatný a sebestačný. V ďalšom štádiu dochádza k zhoršeniu pamäti, pacient zabúda mená, vybavuje si len hlboko vštepené informácie. Nastupuje dezorientácia, kedy si pacienti nevybavujú miesto svojho trvalého bydliska. Finálne štádium sa vyznačuje úplnou stratou pamäti, neschopnosťou sa naučiť žiadne nové veci, dochádza k tomu, že pacient nespoznáva svojich blízkych a stáva sa nesebestačný.<sup>22</sup>

Detailnejšie preskúmanie jednotlivých procesov v patogenéze AD na subcelulárnej úrovni poskytuje množstvo hypotéz o tom, čo je dominantným pri spustení kaskády zmien vedúcich k typickým morfológickým zmenám mozgu a v konečnom dôsledku k vzniku demencie. V súčasnosti existuje niekoľko teórií o vzniku a vývoji AD: okrem cholinergnej hypotézy a hypotézy amyloidovej kaskády existuje koncepcia mierneho zhoršenia kognitívnych funkcií, hypotéza oxidačného stresu a oxidačnej nerovnováhy, teória oxidu dusnatého, teória glutamátovej neurotoxicity / hypotéza vápnika, hypotéza nestability mikrotubúl, hypotéza nestability mikrotubúl, koncepcia regulácie a interferencie pôvodných molekúl,<sup>23</sup> teória kovu,<sup>24</sup> hypotéza replikácie stresu DNA,<sup>25</sup> teória noradrenergie<sup>26</sup> a hypotéza bunkového cyklu.<sup>27</sup> Hlavnými teóriami však ostáva cholinergná a amyloidová hypotéza.

Cholinergná teória uvádza deficit cholinergnej neurotransmisie ako najdôležitejšie nálezy a predpokladá, že kognitívne poruchy súvisia s nedostatkom centrálnych cholinergných funkcií. Tvorba a výdaj neurotransmiteru acetylcholínu (ACh) je patologicky

znižená. Mediátor je zapojený do procesov, ako sú učenie, pamäť, pozornosť a motorické zručnosti. Jeho syntéza prebieha v cholinergných neurónoch cholinacetyltransferázou (ChAT). Rozkladá sa na cholín a acetát cholinesterázami (ChE). Cholinesteráza je zastúpená AChE a tiež butyrylcholinesterázou (BuChE) v neurónoch a blízko k synapsiám. Straty ACh je možné kompenzovať pomocou inhibítorov AChE. AChE je u chorých pacientov zodpovedná za metabolizmus amyloidového prekursorového proteínu (APP), ktorý sa bežne vyskytuje v neurónoch. U zdravého človeka je APP štiepený na fragmenty o veľkosti 40 aminokyselín (AMK) pomocou  $\alpha$ -sekretázy. Avšak za patologických podmienok dochádza ku štiepeniu APP pomocou  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy za vzniku fragmentov väčších ako 40 AMK. Tieto fragmenty následne koagulujú a dochádza ku vzniku  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) vo forme fibríl, ktoré nazývame amyloidové plaky. V mieste vzniknutých amyloidových plakov následne dochádza k apoptóze.<sup>28</sup> Schematické znázornenie ciest možného spracovania APP je uvedené na Obr. 3.

Základom amyloidovej teórie je vysvetlenie, že dôvodom vytvárania amyloidových plakov je porucha metabolizmu APP a zároveň dochádza aj k poruche metabolizmu  $\tau$ -proteínu. Funkciou  $\tau$ -proteínu u zdravých ľudí je spevnenie a stabilizácia mikrotubulov a ovplyvnenie axonálneho transportu. U pacienta trpiaceho AD dochádza ku tvorbe helikálnych filamentov, ktoré sa zhlukujú do neurofibrinálnych klobiek, dôsledkom čoho dochádza k zániku neurónov.<sup>29</sup>



**Obr. 3:** Schematické znázornenie ciest možného spracovania APP (prevzaté)<sup>30</sup>

Vedci sa domnievajú, že včasné odhalenie Alzheimerovej choroby bude kľúčom k prevencii, spomaleniu a zastaveniu choroby. V posledných desiatich rokoch sa zaznamenal obrovský nárast vo výskume včasného odhalenia.<sup>20</sup>

V terapii sa dnes využívajú dva postupy, podávanie inhibítorov AChE a inhibítorov glutamátových NMDA receptorov.<sup>31</sup> V ľahších až stredných štádiách sú indikované inhibítory AChE, ktoré reverzibilne inhibujú AChE, čím zvýšia obsah neuromediátoru acetylcholínu v synapsiách. Následne dochádza k zlepšeniu prenosov v centrálnej nervovej sústave (CNS). Do tejto skupiny patrí donepezil, rivastigmín a vyššie spomenutý galanthamín. V ťažkých štádiách ochorenia sú indikované inhibítory glutamátových NMDA receptorov, ktoré zabraňujú nadmernej excitácii neurónov.<sup>32</sup>

### 3.3.2 Alkaloidy čeľade Amaryllidaceae ako látky využiteľné v terapii nádorových ochorení

Podľa odhadov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2011 onkologické ochorenia spôsobia viac úmrtí ako kardiovaskulárne ochorenia. Celkovo bolo v roku 2012 zaznamenaných 14,1 milióna nových prípadov a 8,2 milióna úmrtí. Najčastejšie diagnostikovanou rakovinou bola rakovina pľúc (1,82 milióna), prs (1,67 milióna) a kolorektálny karcinóm (1,36 milióna). Najbežnejšou príčinou úmrtia bola rakovina pľúc (1,6 milióna úmrtí), rakovina pečene (745 000 úmrtí) a rakovina žalúdka (723 000 úmrtí).<sup>33</sup>

Rezistencia na liečivá je jednou z hlavných príčin zlyhania chemoterapie. Mnoho typov rakovín vykazuje vnútornú rezistenciu na chemoterapeutiká, ktoré sú zvyčajne dôsledkom ich zlyhania pri začatí apoptózy. Apoptóza je bežný spôsob účinku väčšiny protirakovinových liekov.<sup>34</sup> Medzi také druhy rakoviny patria nádory pľúc, pečene, žalúdka, pažeráka a pankreasu, ako aj melanómy a gliómy, ktoré sú všetky spájané s nelichotivými prognózami.<sup>35</sup> Odolnosť proti apoptóze, a tým aj proti konvenčnej chemoterapii, je tiež vnútornou vlastnosťou nádorových metastáz, ktorá zostáva dôležitou klinickou výzvou, pretože 90 % pacientov s rakovinou zomiera na rakovinu metastázami.<sup>36</sup> Dôležitým riešením rezistencie na chemoterapiu je komplementácia cytotoxických terapeutických režimov s cytostatikami,<sup>37</sup> ktoré môžu často senzibilizovať rakovinové bunky na apoptózu, a tak prejavíť synergické účinky. Hľadanie takýchto látok sa tak stáva dôležitým cieľom.<sup>38</sup>

Nádory často nereagujú na chemoterapiu, a nakoniec sa stanú odolnými na pokračujúcu liečbu. Takáto rezistencia sa označuje ako „získaná“ a zvyčajne zahŕňa vývoj fenotypu rezistentného voči viacerým liekom (MDR), ktorý ovplyvňuje široké spektrum štrukturálne a mechanicky odlišných protinádorových látok.<sup>39</sup> Fenomén MDR trápil



konvenčné chemoterapie, napríklad široko aplikované vinka alkaloidy<sup>40</sup> a taxány.<sup>41</sup> Hľadanie látok schopných obísť mechanizmy MDR je preto ďalšou dôležitou oblasťou výskumu zameraného na boj proti rakovinám rezistentným na lieky.

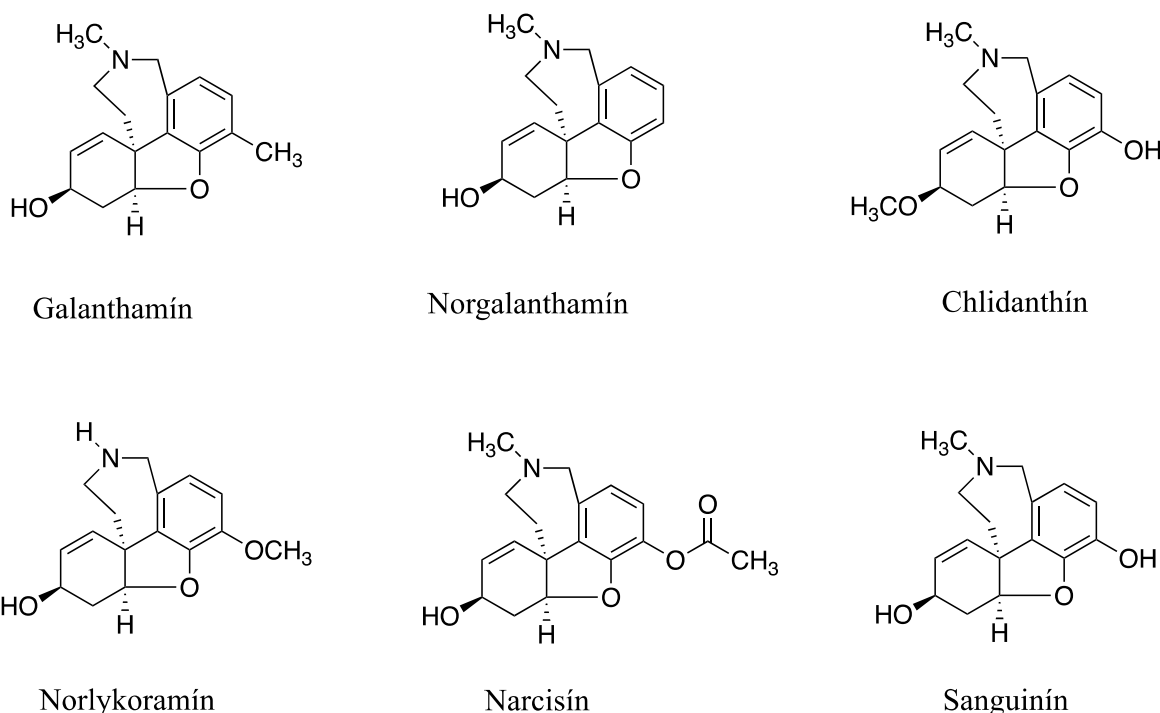
Izolácia a hodnotenie nových prírodných produktov na protirakovinovú aktivitu je hlavnou metódou objavovania protirakovinových liekov. Podľa analýzy Newmana a Cragga, bolo 85 zo 175 protinádorových liekov s malými molekulami objavených od 40. rokov 20. storočia skutočne prírodnými produktmi alebo ich priamymi derivátmi.<sup>42</sup> Z rôznych prírodných zdrojov, ktoré sa skúmali pri hľadaní zložiek s malou molekulou s protirakovinovou aktivitou, boli obzvlášť užitočné rastliny čeľade Amaryllidaceae.<sup>12</sup> Tieto okrasné rastliny s vysokou komerčnou hodnotou kvôli svojim krásnym kvetom sa v ľudovej medicíne používajú už od staroveku. Terapeutické účinky týchto rastlín už boli známe gréckemu lekárovi Hippokratovi vo štvrtom storočí pred našim letopočtom, ktorý použil olej z *Narcissus poeticus* L. na liečbu nádorov maternice.<sup>12</sup> V nedávnej dobe boli z druhov Amaryllidaceae izolované stovky štruktúrne rozmanitých alkaloidov, ktoré majú široké spektrum biologických aktivít, vrátane mnohých sľubných protirakovinových aktivít.<sup>12</sup> Niektoré z najsľubnejších produktov čeľade Amaryllidaceae zahŕňajú alkaloidy, ako je napríklad lykorín, haemanthamín a narciklasín. Tieto látky pritiahli značnú pozornosť, najvýraznejšie z dôvodu ich cytostatickej, neapoptotickej a antiproliferatívnej aktivity proti rakovinám rezistentným na liečivá s progresívnymi prognózami.<sup>37</sup> Okrem iných možných účinkov prispievajúcich k cytostaticite, zohráva inhibícia syntézy eukaryotických proteínov týmito prírodnými produktmi zjavne dôležitú úlohu pri protirakovinovom pôsobení.<sup>12</sup>

### **3.4 Štruktúrne typy alkaloidov čeľade Amaryllidaceae – rozdelenie**

#### **3.4.1 Alkaloidy galanthamínového štruktúrneho typu**

Štruktúrny základ alkaloidov galanthamínového typu tvorí dibenzofuran, ktorý vznikol z 4-O-methylnorbellađínu po oxidatívnej cyklizácii typu *para-ortho*.<sup>13</sup> Hlavným a zároveň najdôležitejším zástupcom tejto podskupiny je galanthamín, ktorý bol po prvýkrát izolovaný v roku 1952 z cibule *Galanthus woronowii*.<sup>43</sup> Z čeľade Amaryllidaceae bola prítomnosť galanthamínu potvrdená v rodoch *Amaryllis*, *Chlidanthus*, *Cooperia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Eustephia*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Nerine*, *Pancreatium*, *Sternbergia*, *Ungernia*, *Vallota* a *Zephyrantes*.<sup>44</sup> Do tejto štruktúrnej podskupiny radíme aj ďalšie alkaloidy, ako napríklad narcisín,

narwedín, norgalanthamín, sanguinín, norlykoramín a chlidantín.<sup>13</sup> Na nasledujúcom obrázku (Obr. 4) sú zobrazené štruktúry vybraných alkaloidov tohto štruktúrneho typu.



**Obr. 4:** Štruktúry vybraných alkaloidov galanthamínového typu (prevzaté)<sup>13</sup>

Významná aktivita galanthamínu bola náhodne objavená na začiatku päťdesiatych rokov minulého storočia skupinou bulharských farmakológov.<sup>45</sup> Neskôr začal byť využívaný hlavne vo východnej Európe v terapii detskej obrny, myasthenia gravis, rôznych typov demencie a paralytickej poliomyelitídy.<sup>9</sup> Galanthamín pôsobí ako reverzibilný kompetitívny inhibítor AChE, čo sa využíva v liečbe AD.<sup>46</sup> Okrem toho je aj inhibítorom nikotínových receptorov a antagonistom dychového útlmu navodeného opioidmi. Jeho výhodou je dobrá vstrebateľnosť a schopnosť vytvárať depo v tukovom tkanive po perorálnom podaní.<sup>4</sup> Vykazuje až 53x väčšiu selektivitu k AChE než k BuChE. Je preukázané, že podávanie galanthamínu vedie k spomaleniu a oddialeniu nástupu ťažkých štádií AD. V jednej štúdií bola testovaná účinnosť galanthamínu u pacientov so slabým a stredným štádiom AD. Na základe testu kognitívnych funkcií a metodiky založenej na ústnych rozhovoroch s pacientami a ošetrovateľmi bolo dokázané, že v porovnaní s placebo galanthamín signifikantne zlepšil kognitívne funkcie pacientov.<sup>47</sup> Ďalšie štúdie rovnako potvrdili zlepšenie kognitívnych a behaviorálnych symptómov.<sup>48</sup>

Z hľadiska štruktúry sa jedná o terciárny alkaloid, ktorý je rezistentný voči hydrolýze. Pre jeho biologickú aktivitu sú v molekule dôležité 4 miesta: hydroxylová

skupina cyklohexénového kruhu, cyklohexénový kruh, methoxyskupina a terciárna aminoskupina. Rôznymi modifikáciami jeho štruktúry vznikli deriváty, ktoré mali odlišné vlastnosti. Napríklad prípravou kvartérnych amóniových solí boli pripravené deriváty, ktoré boli polárnejšie než galanthamín a vykazovali väčšiu aktivitu voči AChE. Žiaľ, ich vysoká polarita bránila prestupu cez hematoencefalickú bariéru (HEB) a tak výrazne limituje ich použitie. Sľubné výsledky však ponúkajú estery galanthamínu. Acyláciou hydroxy skupiny v polohe 6 vznikol *N*-butylkarbamát galanthamínu. Jeho výhodou je nižšia toxicita a nižšia polarita, ktorá umožňuje lepší prienik do CNS. Inhibícia AChE dosiahla *in vitro* 85 % inhibičnej aktivity samotného galanthamínu.<sup>49</sup>

Zaujímavé výsledky priniesla aj štúdia, kde bolo testovaných 23 AA patriacich do lykorínového, homolykorínového, heamanthamínového, galanthamínového a tazettínového štruktúrneho typu. Testovaný bol ich potenciál inhibovať AChE *in vitro*, kde bol ako štandard použitý galanthamín. Výsledky naznačujú, že pozorovaná inhibičná aktivita súvisí s niektorými štruktúrnymi charakteristikami, pretože takúto aktivitu vykazovali iba alkaloidy patriace do galanthamínového a lykorínového štruktúrneho typu. Najvýznamnejšiu aktivitu preukázal sanguinín ( $IC_{50} = 0,10 \pm 0,01 \mu M$ ), o ktorom sa zistilo že je až desaťkrát účinnejší ako samotný galanthamín ( $IC_{50} = 1,07 \pm 0,18 \mu M$ ) a 11-hydroxygalanthamín ( $IC_{50} = 1,61 \pm 0,21 \mu M$ ), ktorého aktivita je podobná galanthamínu.<sup>50</sup>

### 3.4.2 Alkaloidy lykorínového štruktúrneho typu

Lykorínový typ štruktúrne vychádza z pyrrolo[de]fenantridínu, ktorý vznikol z 4-*O*-methylnorbelladínu po oxidatívnej cyklizácii typu *ortho-para*.<sup>13</sup> Hlavným zástupcom tejto skupiny je lykorín, ktorý bol izolovaný v roku 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* a stal sa tak prvým izolovaným alkaloidom čeľade Amaryllidaceae.<sup>51</sup> Lykorín bol doposiaľ izolovaný z týchto rodov: *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Chlidanthus*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Zephyranthes*, a ďalšie.<sup>13</sup> Alkaloidy tohto štruktúrneho typu patria medzi najznámejšie a z pohľadu cytotoxicity pravdepodobne k najúčinnejším.<sup>9</sup>

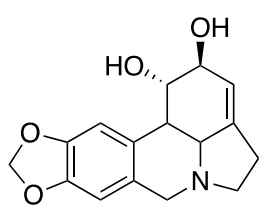
Extrakcia alkaloidov z rastlín prebieha v kyslom prostredí prevedením bázy na soľ, ktorá bude rozpustná vo vodnej fáze. Následne sa odstráni organická fáza spolu s ďalšími organickými nečistotami. K vodnej fáze sa pridá zásaditá látka, pomocou ktorej sa zvýši pH prostredia aspoň na 9-10, čím vzniká z alkaloidu opäť voľná báza a alkaloidy opäť môžu prejsť do organickej fázy. Vodná fáza sa spolu s nečistotami rozpustenými vo vode odstráni.

Takto získame organickú fázu, ktorá obsahuje len alkaloidy. Následne sa z tohto alkaloidného extraktu za použitia chromatografických metód izolujú jednotlivé alkaloidy. Uvedený popis je však zjednodušený a celý proces je samozrejme zložitejší.<sup>52</sup> Príklady rastlín, z ktorých boli izolovaní niektorí zástupcovia lykorínového typu sú: *Galanthus nivalis* L., *Galanthus elwesii* L., *Leucojum aestivum* L., *Lycoris guangxiensis* L., *Pancratium maritimum* L., *Crinum giganteum* L., a *Narcissus tazetta* L.<sup>53</sup>

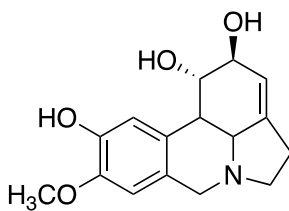
Štruktúru lykorínu prvýkrát popísal v roku 1956 Nagakawa a spol.<sup>54</sup> Lykorín má širokú biologickú aktivitu. U rastlín má schopnosť inhibovať syntézu kyseliny askorbovej potlačením aktivity terminálneho enzýmu galaktodehydrogenázy. Tento enzým premieňa L-galaktono- $\gamma$ -lakton na kyselinu askorbovú.<sup>55</sup> Je účinný proti rade vírusov ako je enterovírus, poliovírus,<sup>56</sup> vaccinia vírus ovčích kiahní (pravé neštovice)<sup>57</sup> či SARS asociovaný coronavirus.<sup>58</sup> Vykazuje antimykotickú aktivitu proti *Saccharomyces cerevisiae* a antiprotozoálnu aktivitu voči *Trypanosoma brucei*.

Najdôležitejšou vlastnosťou však ostáva jeho protinádorová aktivita, ktorá bola preukázaná ako *in vitro* na HeLa (cervikálny adenokarcinóm) bunkách, CEM (akútna lymfoblastická leukémia), K562 (chronická myeloidná leukémia), MCF-7 (adenokarcinóm prsníka), G-361 (maligný melanóm) a BJ (normálny ľudský fibroblast), tak aj *in vivo* u myšieho melanómu BL6 a Lewisovho pľúcneho karcinómu.<sup>59</sup> Jeho výhodou je selektívne pôsobenie na rakovinové bunky a minimálny efekt na zdravé bunky.<sup>60</sup> Mechanizmus pôsobenia lykorínu spočíva v indukcii apoptózy vnútornou mitochondriálnou cestou, dochádza k down regulácii proteínu Mcl-1 u nádorových buniek K562, U937, a HL-60.<sup>61</sup> Práve Mcl-1 u ľudí indukuje diferenciáciu nádorových buniek pri myeloidnej leukémii. Odolnosť nádorových buniek voči apoptóze vyvolanej bežnými chemoterapeutikami je vyvolaná zvýšenou expresiou Mcl-1.<sup>62</sup> Pôsobením lykorínu v rôznych koncentráciách na bunečnú líniu HL-60 došlo k dávkovo závislému zvýšeniu expresie inhibítora cyklín-dependentnej kinázy p21 a TNF- $\alpha$ . Zároveň došlo k down regulácii molekulárnych cieľov p21 regulujúcich bunkový cyklus, komplexu proteínu Cdk1 a cyklínu B, Cdk2 a cyklínu E. Následná bunečná smrť vyvolaná lykorínom viedla k masívnemu uvoľneniu cytochrómu C, čím sa potvrdila programovaná bunková smrť mitochondriálnou cestou.<sup>63</sup>

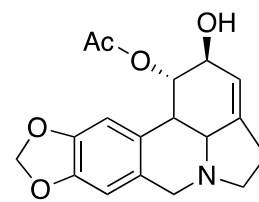
Do tejto skupiny patria aj ďalšie alkaloidy ako napríklad 1-O-acetyllykorín, pseudolykorín, norpluviin, pluviin, lykorín-2-on, amarbellisín, 1,2-epoxylykorín a galanthín (Obr. 5).<sup>13</sup>



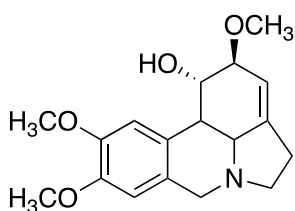
Lykorín



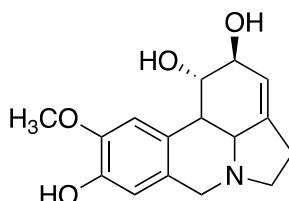
Pseudolykorín



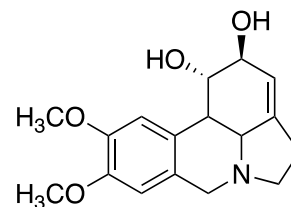
1-O-Acetyllykorín



Galanthín



Norpluviin



Pluviin

**Obr. 5:** Vybrané štruktúry lykorínového typu<sup>13</sup>

**Tabuľka 2:** Hodnoty  $IC_{50}$  lykorínu na vybraných nádorových liniách<sup>65,66</sup>

Bunečná línia	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
SKMEL-28	8,50 $\pm$ 0,30
A549	4,30 $\pm$ 0,30
HT-29	1,02 $\pm$ 0,01
Caco-2	0,99 $\pm$ 0,08
U373	7,60 $\pm$ 0,20
HL-60	1,00
KM3	1,25
Hs683	6,70 $\pm$ 0,30
OE21	5,10 $\pm$ 0,40
B16F10	6,30 $\pm$ 0,40

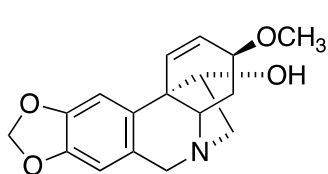
*Caco-2* – nádorová línia buniek hrubého čreva, *HT-29* – nádorová línia buniek hrubého čreva, *U373* – ľudský glioblastóm, *A549* – adenokarcinóm pľúc, *OE21* – rakovina pažeráku, *SKMEL-28* – melanóm, *Hs683* – anaplastický melanóm, *B16F10* – myši melanóm, *KM3* – ľudský mnohopočetný myelóm, *HL-60* – bunky ľudskej promyelocytárnej leukémie

Lykorín vykazuje významnú antiplazmodiálnu aktivitu *in vitro* proti kmeňom *Plasmodium falciparum* citlivým na chlorochin a rezistentným voči chlorochínu s hodnotami  $IC_{50}$  = 0,60 respektíve 0,70  $\mu$ g/ml.<sup>64</sup>

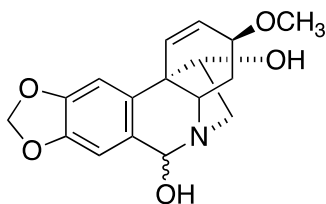
### 3.4.3 Alkaloidy heamanthamínového a krinínového štruktúrneho typu

Haemanthamínový a krinínový typ štruktúrne vychádza z 5,10b-ethanofenantridínu, ktorý vznikol z 4-*O*-methylnorbellađínu po oxidatívnej cyklizácii typu *para-para*.<sup>13</sup> Pre ich štruktúru je typické premostenie etylovým mostíkom z atómu dusíka na uhlík C-10b.<sup>67</sup> Dochádza k vzniku dvoch stereoizomérov  $\alpha$  a  $\beta$ . Niektoré zdroje ich označujú spoločne ako krinanový typ alebo bývajú pomenované ako  $\alpha$ -krinínový (haemanthamínový) a  $\beta$ -krinínový (krinínový) typ.<sup>67</sup> Haemanthamínový typ spolu s lykorínovým typom predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce štruktúrne typy AA (Obr. 6).<sup>68</sup> Medzi zástupcov tejto skupiny patrí haemanthamín, haemathidín, krinamín, maritidín a papyramín. Niektorí zástupcovia tohoto štruktúrneho typu boli izolovaní napríklad z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master,<sup>5</sup> *Zephyranthes robusta* či *Chlidanthus fragnans*.<sup>65</sup>

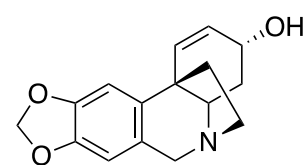
Haemanthamín sa vyskytuje v niekoľkých rodoch *Haemanthus*, *Crinum*, *Zephyranthes*, či *Narcissus*.<sup>9</sup> Vykazuje významnú aktivitu voči rôznym rakovinovým líniam buniek ako napríklad MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, G-361, SKMEL.<sup>64</sup> Za zmienku určite stojí aj antivírusová a antimalarická aktivita.<sup>69</sup> O protinádorovej aktivite haemanthidínu je známe menej. Prvé štúdie opisujúce jeho biologické vlastnosti odhalili, že haemanthidín má sľubné cytotoxické vlastnosti proti bunkám A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL, B16F10 a rezistentným myším lymfómovým bunkám L5178.<sup>70</sup> Samotný haemanthidín nesie nespočetné množstvo biologických vlastností ako napríklad antiparazitické, protizápalové a analgetické účinky s vyššou aktivitou než kyselina acetylsalicylová.<sup>71</sup> Bolo dokázané, že premena haemanthamínu na haemanthidín prebieha v rastlinách nezvratne.<sup>72</sup> Mechanizmus vedúci k indukcii apoptózy u haemanthidínu a haemanthamínu bol však preštudovaný len minimálne. Pravdepodobný mechanizmus účinku haemanthamínu spočíva v inhibícii proteosyntézy tým, že blokuje vznik peptidovej väzby, keď sa peptidyltransferáza viaže na 60S podjednotku ribozómu.<sup>73</sup>



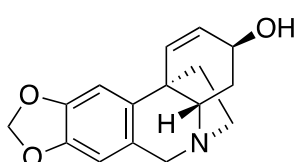
Haemanthamín



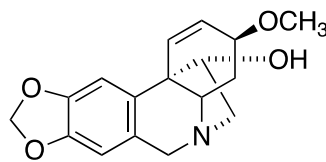
Haemanthidín



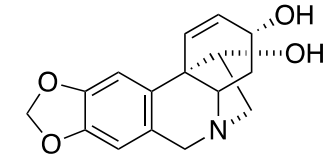
Krinín



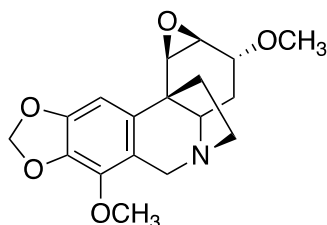
Vittatín



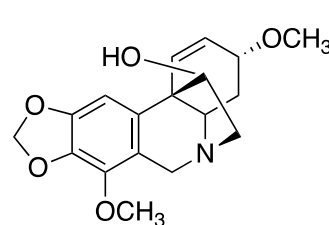
Krinamín



Hamayn



Undulatín



Ambellín

**Obr. 6:** Vybrané štruktúry heamanthamínového a krinínového typu<sup>13</sup>

V štúdiu z roku 2014 sa preukázalo, že pri koncentráciách od 5  $\mu\text{M}$  do 20  $\mu\text{M}$  haemanthamín a haemanthidín znížili životaschopnosť Jurkatových buniek do 24 hodín po liečbe. Navyše, zníženie životaschopnosti buniek bolo výraznejšie 48 hodín po aplikácii haemanthidínu na rozdiel od haemanthamínu. Haemanthidín v dávkach 15  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$  spôsobil nižšiu životaschopnosť buniek 48 hodín po ošetrení (77 % a 50 %), zatiaľ čo životaschopnosť buniek po expozícii haemanthamínu bola vyššia pri rovnakých koncentráciách (82 % a 67 %).<sup>74</sup> Závery tejto štúdie sú v súlade s výsledkami publikovanými Evidente a spolupracovníkmi, ktorí študovali cytotoxickú aktivitu haemanthamínu na bunkových líniiach HeLa a Vero pomocou testu MTT.<sup>75</sup>

V roku 2015 bola na vybraných zástupcoch AA testovaná protinádorová aktivita na gastrointestinálnych rakovinových líniiach buniek. Spomedzi trinástich testovaných AA

preukázali haemanthamín, haemanthidín a taktiež lykorín najsilnejší cytotoxický potenciál proti obidvom testovaným líniam. Zaujímavosťou je, že haemanthamín spolu s lykorínom vykazovali dvadsaťkrát nižšiu toxicitu proti normálnym bunkám tenkého čreva FHs 74 Int. Hodnoty IC<sub>50</sub> stanovené pomocou testu MTT sú uvedené v tabuľke 3. Ako štandard sa použil polosyntetický vinka alkaloid vinorelbín.<sup>65</sup>

**Tabuľka 3:** Cytotoxicita haemanthamínu a haemanthidínu proti dvom rakovinovým bunkovým líniam a jednej nekanceróznej gastrointestinálnej bunkovej línii.<sup>65</sup>

Bunečná línia	Rakovinové bunky		Normálne bunky
	Caco-2 IC <sub>50</sub> (μM)	HT-29 IC <sub>50</sub> (μM)	FHs 74 Int IC <sub>50</sub> (μM)
Haemanthamín	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,90
Haemanthidín	3,30 ± 0,90	1,70 ± 0,10	11,60 ± 0,90
Vinorelbín	0,03 ± 0,00	netestované	4,00 ± 0,30

*Caco-2* – nádorová línia buniek hrubého čreva, *HT-29* – nádorová línia buniek hrubého čreva, *FHs 74 Int* – zdravá línia buniek tenkého čreva

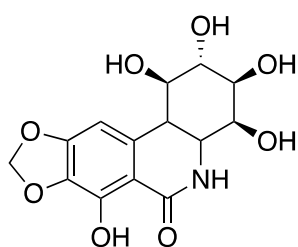
#### 3.4.4 Alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu

Hlavným zástupcom pankratistatínového štruktúrneho typu je pankratistatín, ďalšími významnými zástupcami sú narciklasín, bikolorín a lykoricidín. Ich molekula je odvodená od fenantridínu. Tieto alkaloidy vznikajú oxidatívnou cyklizáciou typu *para-para'* z 4-*O*-methylnorbellađínu (Obr. 7).<sup>13</sup> Vyskytujú sa najmä v rodoch *Narcissus*, *Panocratinum*, *Zephyranthes*, *Haemanthus* a *Hymenocallis*.<sup>13</sup>

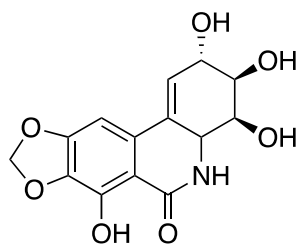
Pankratistatín bol prvýkrát izolovaný z cibule *Hymenocallis littoralis*.<sup>76</sup> Vykazuje silnú apoptotickú aktivitu proti veľkému množstvu rakovinových bunkových línii a má zanedbateľný účinok na nerakovinové bunkové línie. Mnoho súčasných chemoterapeutík indukuje apoptózu prostredníctvom genotoxických mechanizmov, a preto majú nízku selektivitu. Selektivita pankratistatínu na rakovinové bunky podporila hypotézu, že tento alkaloid sa zameriava skôr na mitochondrie rakovinových buniek než na DNA alebo jej replikačné mechanizmy. Štúdia ukázala, že pankratistatín (IC<sub>50</sub> približne 100 nmol/L) znížil mitochondriálny membránový potenciál a vyvolal apoptickú jadrovú morfológiu v bunkových líniiach kolorektálneho karcinómu p53 (HT-29) a divokého typu p53 (HCT116), ale nie v nekanceróznych fibroblastoch hrubého čreva (CCD-18Co) buniek.



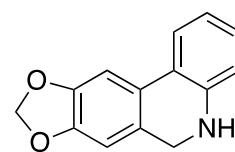
Intratumorové podávanie pankratistatínu (3 mg / kg) spôsobilo signifikantné zníženie rastu subkutánnych nádorov HT-29 u myší.<sup>15</sup>



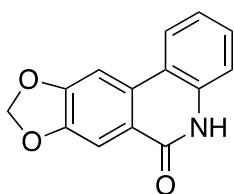
Pankratistatín



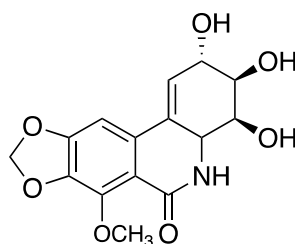
Narciklasín



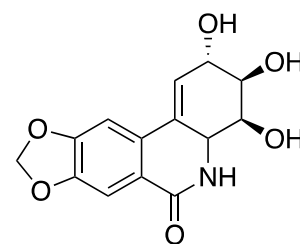
Trisferidín



Bikolorín



Lykoricidín



Krinasiadín

**Obr. 7:** Vybrané štruktúry pankratistatínového typu<sup>13</sup>

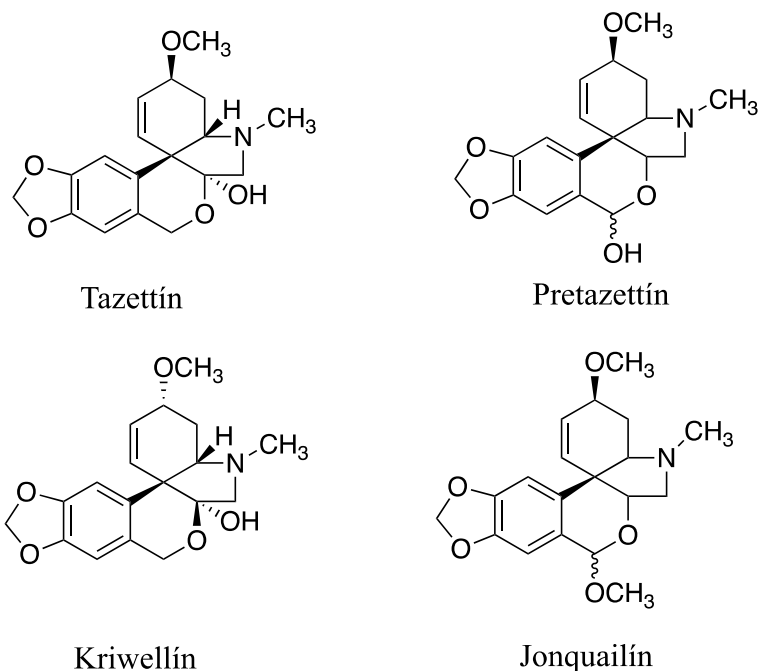
Významným alkaloidom tejto skupiny je aj narciklasín, ktorý bol prvýkrát izolovaný v roku 1967 z cibulí rodu *Narcissus*.<sup>77</sup> Mechanizmus účinku narciklasínu spočíva v jeho väzbe na ribozomálnu podjednotku 60S a následnej inhibícii peptidyltransferázy, čím zabráni vzniku peptidovej väzby v novo vznikajúcom proteine.<sup>78</sup> Predpokladá sa, že narciklasín, podobne ako niektoré bežne používané cytostatiká, tvorí komplexy s molekulou DNA živočíšnych buniek.<sup>79</sup> Narciklasín a pankratistatín sa tiež objavili ako zaujímavé protinádorové lieky v databáze National Cancer Institute s presvedčivými *in vivo* údajmi získanými z niekoľkých bunčných modelov myší.<sup>80</sup>

Štúdia z roku 2007 potvrdzuje, že rakovinové bunky sú výrazne citlivejšie na cytotoxické účinky narciklasínu ako normálne bunky. Celkové cytotoxické účinky narciklasínu na šiestich ľudských rakovinových a troch normálnych ľudských fibroblastových bunkových líniiach sa hodnotili kolorimetrickým testom MTT. Priemerná hodnota IC<sub>50</sub> (koncentrácia, ktorá znižuje počet životaschopných buniek po 3 dňoch liečby o 50 %) vypočítaná pre šesť línii ľudských rakovinových buniek bola 30 nM. Zodpovedajúca priemerná hodnota IC<sub>50</sub> pre tri bunkové línie fibroblastov bola 7,5 mM, čo naznačuje ich výrazne nižšiu citlivosť na cytotoxické účinky narciklasínu ako ľudské rakovinové bunky. Normálne ľudské fibroblasty sa javia približne 250-krát menej citlivé na narciklasín, ktorý

nevyvoláva apoptózu v týchto bunkách pravdepodobne v dôsledku neprítomnosti aktivácie dráhy receptora smrti.<sup>14</sup> Cytotoxická aktivita narciklasínu bola podobná v šiestich skúmaných rakovinových bunkových líniiach, čo sa zhoduje s údajmi National Cancer Institute.

### 3.4.5 Alkaloidy tazettínového štruktúrneho typu

Hlavným zástupcom je tazettín ktorý je jeden z najhojnejších alkaloidov tejto podskupiny. Štruktúrne je odvodený od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu a jeho štruktúra bola popísaná roku 1943.<sup>54</sup> Tazettín je rovnako ako haemanthamín a krinín, odvodený od 4-*O*-methylnorbellađínu oxidatívnou cyklizáciou *para-para*'. Do tejto podskupiny ďalej patrí pretazettín, plicamín, secoplicamín, jonquailín, makronín či kriwellín (Obr.8).<sup>13</sup> Alkaloidy tejto podskupiny sa taktiež vyznačujú zaujímavou biologickou aktivitou.



**Obr. 8:** Vybrané štruktúry tazettínového typu<sup>13</sup>

V roku 2003 sa uskutočnila štúdia s cieľom preskúmať antimalarický potenciál Amaryllidaceae alkaloidov, menovite lykorínu, krinínu, haemanthamínu, 6-hydroxyhaemanthamínu, 3-epihydroxybulbispermínu, galanthamínu a tazettínu proti dvom kmeňom *Plasmodium falciparum*, chlóróchin senzitivnému (T9.96) a chlóróchin rezistentnému (K1). Vyššie uvedené alkaloidy boli testované v štyroch dávkach (0,04; 0,2; 1 a 5 µg/ml) a vykazovali antimalarickú aktivitu spôsobom závislým od dávky. Najaktívnejšie boli v dávkach 1 a 5 µg/ml. Spomedzi štyroch testovaných skupín Amaryllidaceae alkaloidov boli 6-hydroxyhaemanthamín, haemanthamín a lykorín

stanovené ako najúčinnnejšie proti kmeňu T9.96 podľa ich hodnôt  $IC_{50}$ , zatiaľ čo tazettín a galanthamín boli najmenej účinné alkaloidy.<sup>81</sup> Rozdiely v účinnosti antimalarickej aktivity týchto alkaloidov môžu súvisieť s rozdielom v ich chemických štruktúrach.

Zaujímavou sa javí schopnosť tazettínu inhibovať rekombinantnú formu aldo-keto reductázy 1C3 (AKR1C3). AKR1C3 je dôležitý ľudský enzým, ktorý sa podieľa na redukcii steroidov a prostaglandínov. Práve tento enzým je často upregulovaný pri rôznych typoch rakovín, a tak bol navrhnutý ako terapeutický cieľ na liečenie týchto patologických stavov. Testovaných bolo dvadsaťosem AA, ktoré patria do siedmich štruktúrnych typov. Z testovaných alkaloidov vykazoval iba tazettín miernu inhibičnú účinnosť ( $IC_{50} = 15,80 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ) v porovnaní so známym inhibítorom AKR1C3, indometacínom ( $IC_{50} = 3,70 \mu\text{M}$ ). Jedenásť testovaných alkaloidov vykazovalo slabú inhibičnú účinnosť a ostatné sa považovali za neaktívne. Aj keď má tazettín nižší inhibičný potenciál ako známe inhibítory (napr. indometacín a jeho analógy), môže sa použiť ako hlavná štruktúra pri vývoji ďalších derivátov s lepšou inhibičnou účinnosťou, pretože ako som už vyššie spomenul, je jedným z najhojnejšie sa vyskytujúcich alkaloidov čeľade Amaryllidaceae.<sup>82</sup>

Tazettín vykazuje len zanedbateľnú cytotoxickú aktivitu. Zaujímavejšou látkou z tohto pohľadu sa javí jeho biosyntetický prekursor pretazettín, ktorý patrí medzi aktívnejšie alkaloidy. Bol testovaný na bunkách myšieho aj ľudského lymfómu so zaujímavými výsledkami. Najväčší účinok bol preukázaný na T-lymfoidné bunky MOLT-4, bunky Rauscherovej leukémie a bunky Lewisovho karcinómu. Pretazettín inhibuje aktivitu P-glykoproteínu (Pg-P), HeLa buniek a potencuje aktivitu doxorubicínu voči myšiacím lymfoidným bunkám.<sup>83</sup> Mechanizmom účinku pretazettínu je inhibícia proteosyntézy vo fáze formovania peptidovej väzby.<sup>9</sup>

Jeho cytotoxickú aktivitu potvrdzuje aj ďalšia štúdia, v ktorej boli testované antiproliferatívne účinky alkaloidov 2-O-acetyllykorínu, homolykorínu, pretazettínu, trisphaeridínu a ismínu. Ukázalo sa že pretazettín bol najúčinnjší na ľudské rakovinové bunky, jeho účinok bol porovnateľný s účinkom cisplatiny (Tabuľka 4).<sup>16</sup>

Zatiaľ čo pretazettín je stabilný v kyslom pH, je nestabilný v zásaditom pH a postupne sa premieňa na tazettín.<sup>84</sup> Vytvorením hydrochloridu pretazettínu získame vo vode stabilnú formu. Pretože je pravdepodobné, že pretazettín sa v tele zmení na tazettín, overovalo sa, či má tazettín biologickú účinnosť. Ako som už vyššie uviedol, zistilo sa, že tazettín nebol významne účinný proti Rauscherovej leukémii u myší a že bola potrebná 50 až 100-krát vyššia dávka ako v prípade pri pretazettínu, aby sa inhiboval rast vírusu *in vitro*.<sup>85</sup>

Ďalším významným zástupcom tejto podskupiny sa javí jonquailín. Jonquailín bol v jednej štúdií hodnotený proti dvom bunkovým líniam rakoviny pľúc H1993 a H2073. Tieto dve bunkové línie boli získané od toho istého pacienta, ktorý podstúpil chemoterapiu, ale relapsoval s opätovným rastom nádoru v primárnom mieste. Línia H1993 bola odvodená z metastázy lymfatických uzlín izolovanej pred chemoterapiou, zatiaľ čo línia H2073 bola odvodená z opätovného rastu pľúcneho tumoru mesiace po chemoterapii.<sup>86</sup> Bunková línia H2073 bola významne rezistentnejšia na liečivo. Aj keď účinnosť jonquailínu taktiež klesala proti bunkám H2073, pokles je výrazne menej výrazný ako v prípade paklitaxelu. Zaujímavosťou však ostáva, že jonquailín synergizuje s paklitaxelom pri jeho antiproliferatívnom pôsobení proti obidvom týmto bunkovým líniam, čo naznačuje potenciálne použitie jonquailínu ako adjuvans konvenčnej chemoterapie pri rakovinách rezistentných na liečivá.<sup>87</sup>

**Tabuľka 4:** Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných zlúčenín<sup>16</sup>

Zlúčenina	Bunečné línie		
	HeLa $IC_{50}$ ( $\mu$ M)	MCF7 $IC_{50}$ ( $\mu$ M)	A431 $IC_{50}$ ( $\mu$ M)
pretazettín	8,85	7,87	5,37
2-O-acetyllykorín	10,31	19,83	14,05
homolykorín	>30,00	nestanovené	nestanovené
trisphaeridín	24,09	21,13	>30,00
ismín	>30,00	>30,00	nestanovené
cisplatina	12,43	9,63	2,84
doxorubicín	0,15	0,28	0,15

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Materiál, chemikálie a metódy

#### 4.1.1 Amaryllidaceae alkaloidy

Počiatočná látka použitá pre syntézu derivátov (tazettín) bola izolovaná z cibulí *Zephyrantes robusta* Baker na katedre Farmaceutickej botaniky a ekológie za účelom študovania vzťahu štruktúra-účinok.<sup>88</sup>

#### 4.1.2 Rozpúšťadlá, chemikálie

Etanol, p.a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Pyridín, p.a. (Penta)

Etylacetát, p.a. (Penta)

Dimethylaminopyridín, p.a. (Penta)

2-Fluorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

3-Bromobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

2-Chlorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

2,4-Difluorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

4-Chlorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

4-Fluorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

3,4-Dichlorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

3-Chlorobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

4-Methyl-3-nitrobenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

4-Fluoro-3-methylbenzoylchlorid,  $\geq 99\%$  (Acros)

Dragendorffovo činidlo (pripravované v laboratóriu)<sup>89</sup>

Materiál pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu

Kiesel SiO<sub>2</sub> F254, Merck, 20 x 20 cm, hliníková doska s vrstvou silikagélu pre TLC;  
vrstva 0,2 mm

### 4.1.3 Vyvíjacie sústavy pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu

S1: cHx : EtOAc : DEA 70:20:10

S2: cHx: DEA 95 : 5

### 4.1.4 Štruktúrna analýza pripravených derivátov

#### 4.1.4.1 ESI-MS analýza

Látky obtiažne ionizujúce za podmienok merania EI spektier boli analyzované za účelom získania hodnôt Mr pomocou ESI ionizácie. Vzorky (0,2 – 0,3 mg) boli rozpustené v 1 ml metanolu čistoty LC-MS a merané pomocou systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Prístroj pozostáva z modulov Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binárnej gradientovej pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diódovým poľom a Waters Acquity qDa hmotnostného spektrometra. Vzorky boli analyzované pri laboratórnej teplote. Na separáciu bola použitá kolóna s reverznou fázou Xselect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Milford, USA). Ako mobilné fázy boli použité voda s 0,1 % kyselinou mravčou (rozpúšťadlo A) a metanol s 0,1 % kyselinou mravčou (rozpúšťadlo B). Prietok mobilnej fázy bol 1 ml / min. Elučný program s gradientom bol naprogramovaný nasledovne (v / v): 0 min 5 % B, 5 min 100 % B, 8,5 min 5 % B, potom 1,5 minúty v počiatočných podmienkach pre ekvilibráciu. Optimálne hodnoty parametrov ESI-MS boli: kapilárne napätie – 0,8 kV; Teplota próby – 600 ° C; Kuželové napätie – 15V. LC / MS hmotnostné spektrá boli zaznamenané v rozmedzí od 200 – 800 m/z. Pre detekciu PDA bol rozsah detektoru nastavený od 190 do 700 nm. LC ESI-MS analýzy boli prevedené v pozitívnom iónovom režime. Elúcia zlúčenín nastáva v poradí od viac polárnych k menej polárnym, s narastajúcou elučnou silou mobilnej fázy. V priebehu chromatografickej analýzy zostáva koncentrácia kyseliny mravej konštantná.

#### 4.1.4.2 NMR analýza

NMR spektrá boli merané v roztokoch  $\text{CDCl}_3$ , prípadne  $\text{CD}_3\text{OD}$  pri teplote  $25\text{ }^\circ\text{C}$  na spektrometre Varian Iniova 500 pracujúcom pri  $499,87\text{ MHz}$  pre  $^1\text{H}$  jadrá a  $125,70\text{ MHz}$  pre  $^{13}\text{C}$  jadrá. K ožarovaniu a detekcii signálu bola použitá OneNMR sonda, širokopásmová dvojkanálová gradientná sonda s reguláciou teploty. Chemické posuny boli zmerané ako hodnoty  $\delta$  pars per milion (ppm) a boli nepriamo vzťahované k TMS ako štandardu pomocou zvyškového signálu rozpúšťadla. Hodnoty chemického posunu pre  $\text{CDCl}_3$  sú u atómov  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26\text{ ppm}$  a u atómov  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0\text{ ppm}$ , pre  $\text{CD}_3\text{OD}$  sú u atómov  $^1\text{H}$   $\delta = 3,30\text{ ppm}$  a u  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0\text{ ppm}$ . Meraním získané dáta sú prezentované v nasledujúcom poradí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita  $^1\text{H}$  NMR spektier, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletov, m: multiplet, bs: široký singlet) a integračná konštanta (Hz).

#### 4.1.4.3 Optická otáčavosť

Optická otáčavosť bola meraná v roztokoch alkaloidov pri  $20\text{ }^\circ\text{C}$  na automatickom polarimetri ADP 220 BS v prostredí chloroformu alebo metanolu a špecifická otáčavosť bola dopočítaná podľa vzorca:

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

t – teplota merania =  $20\text{ }^\circ\text{C}$

D – línie sodíkového svetla =  $589,3\text{ nm}$

$\alpha$  – nameraná optická otáčavosť [ $^\circ\text{C}$ ]

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

l – dĺžka kyvety =  $1\text{ dm}$

#### 4.1.5 Metódy pre screening biologických aktivít pripravených zlúčenín

##### 4.1.5.1 Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči erytrocytarnej AChE a sérovej BuChE

Inhibičná aktivita týchto enzýmov bola meraná na Katedre farmaceutickej botaniky a ekológie, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Meranie vykonal prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Podrobný popis tejto metódy môžeme nájsť v literatúre.<sup>90</sup>

##### 4.1.5.2 Stanovenie cytotoxickej aktivity pripravených derivátov

Stanovenie cytotoxickej aktivity pripravených derivátov na ďalších líniách bolo vykonané v spolupráci s Katedrou lekárskej biochémie, Lekárskej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, za využitia systému xCELLigence. Testovanie vykonal RNDr. Radim Havelek, PhD. Podrobný popis tejto metódy môžeme nájsť v literatúre.<sup>65</sup>

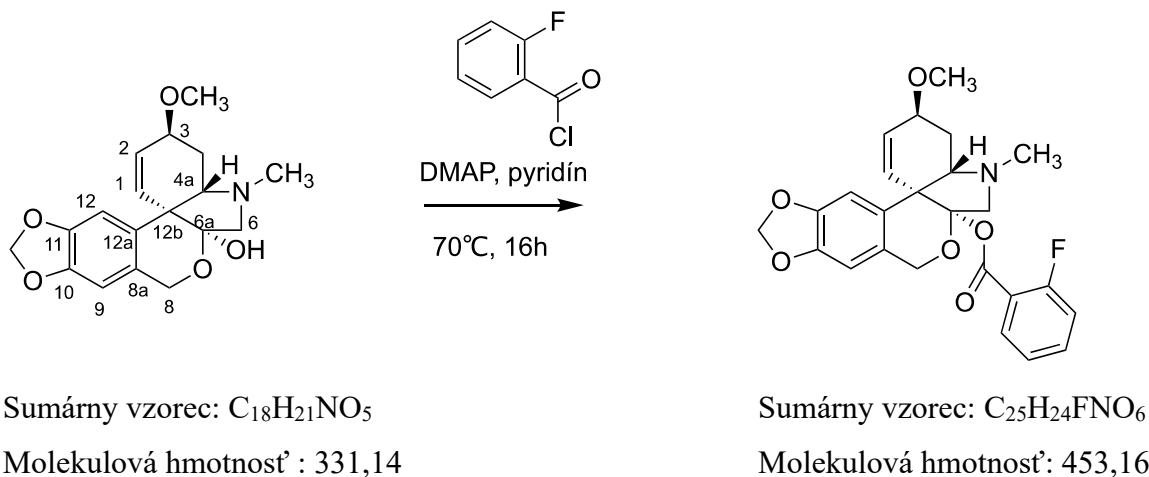
#### 4.1.6 Príprava hydrochloridov

Pripravené deriváty boli z dôvodu zvýšenia ich rozpustnosti prevedené na hydrochloridy. Presná navážka alkaloidu (poprípade derivátu alkaloidu) sa rozpustí v suchom dietyléteri v zabrusenej skúmavke, aby koncentrácia vzorky bola 1 M. Pokiaľ sa vzorka nerozpustí, odparí sa časť dietyléteru a pridá sa najmenšie možné množstvo suchého dichlórméтанu tak, aby sa vzorka úplne rozpustila. Po úplnom rozpustení vzorky sa pridá nadbytok 1 M éterového roztoku chlorovodíku, krátko sa sonikuje. Pomocou pH papieriku sa overí, či bolo pridané dostatočné množstvo chlorovodíku. Pokiaľ pH papierik indikuje kyslú reakciu, nie je potrebné pridávať ďalší éterový roztok chlorovodíku, skúmavka sa nechá 15 minút stáť. V opačnom prípade je nutné pridať ďalšie množstvo éterového roztoku chlorovodíku a znovu overiť pH pomocí pH papieriku. Vzniknutý hydrochlorid sedimentuje na dne skúmavky. Následne sa hydrochlorid v dietyléteri prevetráva na vodnej lázni (40 °C) prúdom vzduchu do úplného odparenia rozpúšťadla. Potom sa pridá niekoľko mililitrov suchého dietyléteru a suspenzia sa opäť odparí dosucha. Proces je nutné opakovať ešte dvakrát. Nadbytočný plynný chlorovodík sa týmto spôsobom úplne odstráni. Vzniknutý hydrochlorid sa suší vo vákuovom exikátore nad perlami silikagélu pri tlaku 2-8 mbar po dobu 12 hodín.



## 4.2 Príprava polosyntetických derivátov tazettínu a ich štruktúrna identifikácia

### 4.2.1 Príprava 6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-173)



#### *Obr. 9: Schéma syntézy 6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettínu*

30 mg (0,09 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 20  $\mu$ l (0,168 mmol) 2-fluorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 70°C po dobu 16 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola odparená do sucha a odparok bol rozpustený v 2 ml zmesi EtOH : EtOAc 1:1. Látka bola následne chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 17,2 mg 6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 42,2 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(2-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-173)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  454,054

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 7.86 (1H, td,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.9$  Hz), 7.54–7.48 (1H, m), 7.18 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz), 7.11–7.06 (1H, m), 6.93 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.20–6.16 (1H, m), 5.93 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz, overlapped), 5.93 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz, overlapped), 5.77 (1H, dt,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 1.7$  Hz), 4.79 (2H, s), 4.21–4.15 (1H, m), 3.68 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz), 3.50 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, overlapped), 3.49 (3H, s, overlapped), 2.92–2.89 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.31–2.25 (1H, m), 1.71–1.63 (1H, m)

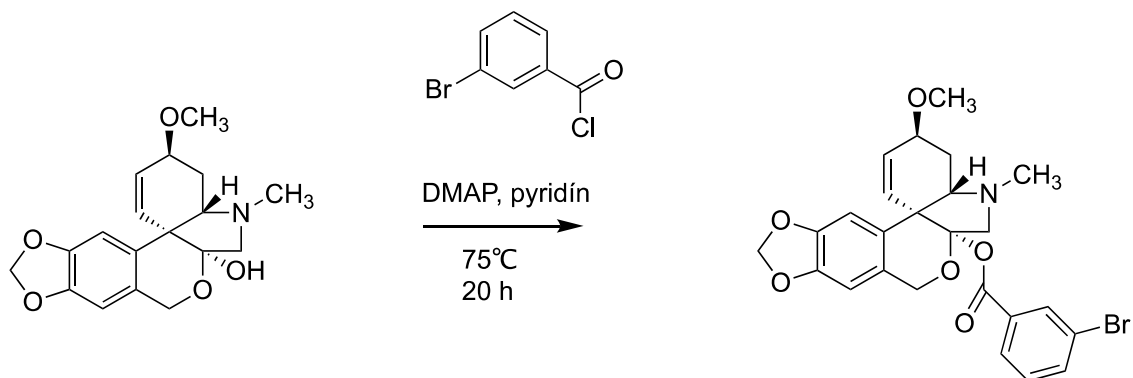
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 162.3 (d,  $J = 3.8$  Hz), 162.0 (d,  $J = 260.2$  Hz), 146.65, 146.59, 134.8 (d,  $J = 8.6$  Hz), 132.2, 131.4, 127.6, 126.7, 124.3, 124.0 (d,  $J = 3.8$  Hz), 118.3 (d,  $J = 9.5$  Hz), 117.1 (d,  $J = 21.9$  Hz), 109.4, 106.1, 103.7, 101.0, 73.0, 68.1, 63.4, 63.1, 56.2, 50.6, 42.3, 26.0

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0,0^\circ$  (c 0,221;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.2 Príprava 6-O-(3-bromobenzoyl)tazettínu (LC-209)



Sumárny vzorec:  $C_{18}H_{21}NO_5$

Molekulová hmotnosť : 331,14

Sumárny vzorec:  $C_{25}H_{24}BrNO_6$

Molekulová hmotnosť: 513,08

#### **Obr. 10:** Schéma syntézy 6-O-(3-bromobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,379 mmol) 3-bromobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 75°C po dobu 20 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 32,8 mg 6-O-(3-bromobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výtťažok reakcie bol 53,3 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(3-bromobenzoyl)tazettínu (LC-209)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  513,976

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 8.06–8.04 (1H, m), 7.86–7.83 (1H, m), 7.70–7.66 (1H, m), 7.28 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz), 6.95 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.20 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz), 5.95 (1H, d,  $J = 9.8$ , overlapped), 5.95 (1H, d,  $J = 9.8$ , overlapped), 5.75–5.70 (1H, m), 4.77 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.73 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.21–4.14 (1H, m), 3.63 (1H, d,  $J = 11.8$  Hz), 3.51–3.47 (1H, m, overlapped), 3.49 (3H, s, overlapped), 2.92–2.89 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.32–2.24 (1H, m), 1.71–1.64 (1H, m)

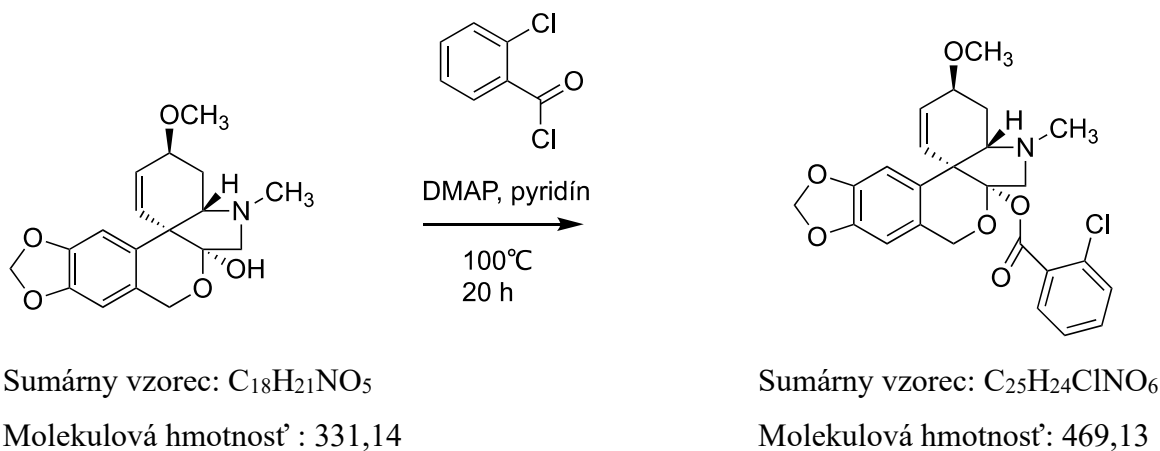
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

162.9, 146.7, 136.3, 132.5, 131.8, 131.7, 130.0, 128.2, 127.3, 126.5, 124.2, 122.57, 109.4, 105.9, 103.8, 101.1, 73.0, 68.1, 63.3, 63.0, 56.2, 50.7, 42.2, 26.0

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15,5^\circ$  (c 0,258;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.3 Príprava 6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-213)



**Obr. 11:** Schéma syntézy 6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,395 mmol) 2-chlorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 100°C po dobu 20 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Výsledný produkt bol dvakrát prečistený z dôvodu obsahu nečistôt. Po prečistení bolo získaných 33,2 mg 6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výtťažok reakcie bol 59,0 %. Predpokladaný výtťažok však bude určite nižší, vzhľadom k tomu že derivát LC-213 bude potrebné ešte raz prečistiť.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(2-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-213)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 470,136

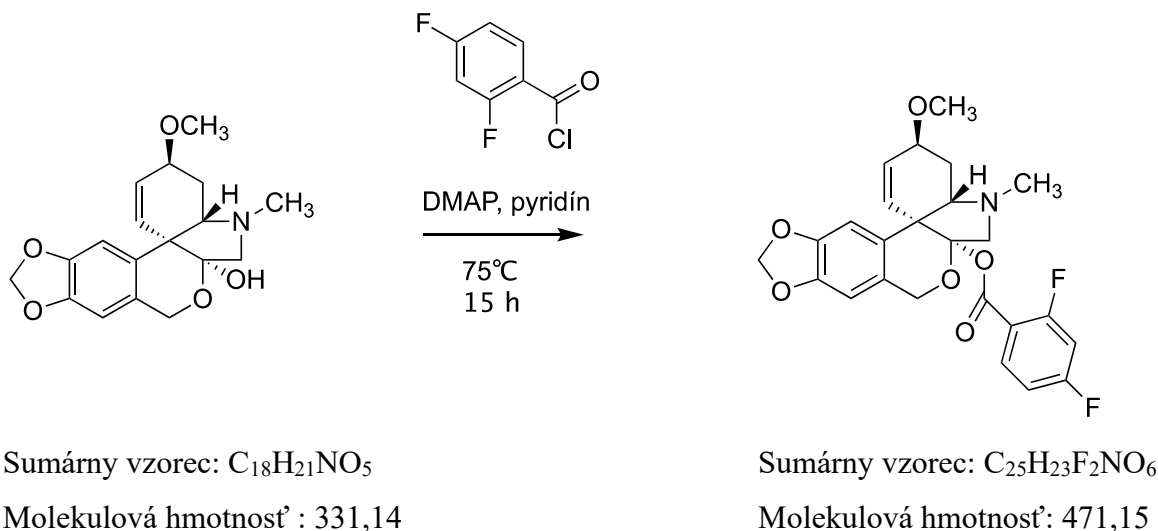
### *NMR štúdia*

Derivát LC-213 sa nepodarilo ani po dvoch separáciách úplne vyčistiť preto bude potrebné separáciu zopakovať a následne znova vykonať meranie NMR.

### *Optická otáčavosť*

Meranie optickej otáčavosti sa nepodarilo vykonať nakoľko uvedená látka nebola čistá. Po prečistení bude potrebné meranie vykonať.

#### 4.2.4 Príprava 6-O-(2,4-difluorobenzoyl)tazettínu (LC-200)



**Obr. 12:** Schéma syntézy 6-O-(2,4-difluorobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,407 mmol) 2,4-difluorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 75°C po dobu 15 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 39,4 mg 6-O-(2,4-fluorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 69,7 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(2,4-difluorobenzoyl)tazettínu (LC-200)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  472,058

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 7.90 (1H, td,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 6.4$  Hz), 6.94–6.89 (1H, m, overlapped), 6.92 (1H, m, overlapped), 6.82 (1H, ddd,  $J = 11.2$  Hz,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz), 6.48 (1H, s), 6.20–6.16 (1H, m), 5.93 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, overlapped), 5.93 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, overlapped), 5.74 (1H, dt,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 1.7$  Hz), 4.77 (2H, bs), 4.20–4.15 (1H, m), 3.66 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 3.48 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, overlapped), 3.48 (3H, s, overlapped), 2.91–2.88 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.31–2.24 (1H, m), 1.66 (1H, ddd,  $J = 13.3$  Hz,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 1.9$  Hz)

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

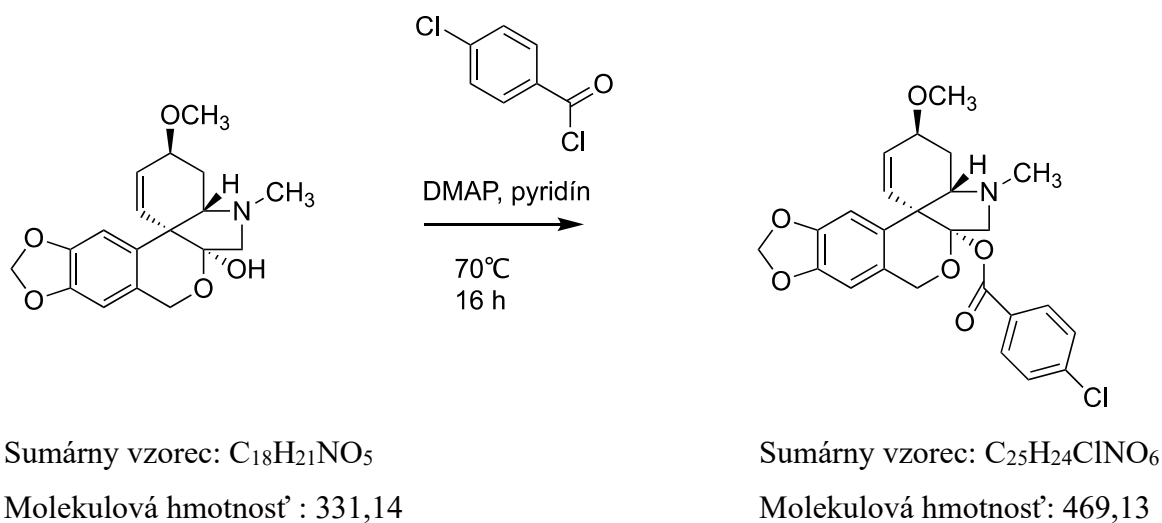
$\delta$ : 165.9 (dd,  $J = 256.9$  Hz,  $J = 12.4$  Hz), 162.9 (dd,  $J = 264.1$  Hz,  $J = 12.4$  Hz), 161.4 (d,  $J = 4.3$  Hz), 146.7, 146.6, 134.1 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 1.9$  Hz), 131.5, 127.5, 126.6, 124.2, 114.7 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 111.7 (dd,  $J = 21.5$  Hz,  $J = 3.5$  Hz), 109.4, 106.2, 105.3 (t,  $J = 25.7$  Hz), 103.7, 101.0, 73.0, 68.1, 63.4, 63.1, 56.2, 50.5, 42.2, 26.0

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 7,1$  ° (c 0,280;  $\text{CHCl}_3$ )



#### 4.2.5 Príprava 6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-199)



**Obr. 13:** Schéma syntézy 6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,395 mmol) 4-chlorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 70°C po dobu 16 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 38,1 mg 6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výtťažok reakcie bol 67,7 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(4-chlorobenzoyl)tazettínu (LC-199)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  470,058

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 7.88–7.84 (2H, m, AA'BB'), 7.39–7.35 (2H, m, AA'BB'), 6.94 (1H, s), 6.47 (1H, s), 6.19 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz), 5.96–5.93 (2H, m), 5.72 (1H, dt,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 1.7$  Hz), 4.77 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.72 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.20–4.15 (1H, m), 3.64 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz), 3.49 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, overlapped), 3.48 (3H, s, overlapped), 2.91–2.88 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.31–2.24 (1H, m), 1.70–1.64 (1H, m)

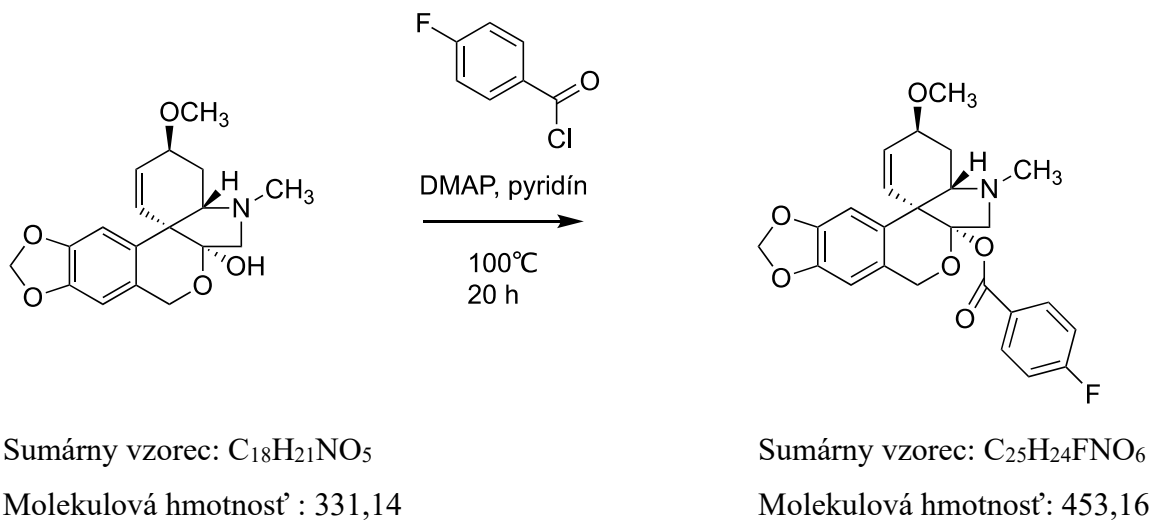
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

163.4, 146.7, 139.9, 131.8, 131.0, 128.8, 128.1, 127.3, 126.6, 124.3, 109.4, 105.6, 103.7, 101.1, 73.0, 68.0, 63.3, 63.0, 56.2, 50.7, 42.2

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28,7^\circ$  (c 0,279;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.6 Príprava 6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-198)



**Obr. 14:** Schéma syntézy 6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,423 mmol) 4-fluorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 100°C po dobu 20 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 37,7 mg 6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 69,3 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(4-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-198)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  454,030

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 7.97–7.92 (2H, m, AA'BB'), 7.10–7.04 (2H, m, AA'BB'), 6.95 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.21–6.17 (1H, m), 5.97–5.92 (2H, m), 5.75–5.71 (1H, m), 4.77 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.73 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.20–4.14 (1H, m), 3.65 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz), 3.49 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, overlapped), 3.49 (3H, s, overlapped), 2.92–2.87 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.32–2.24 (1H, m), 1.71–1.63 (1H, m)

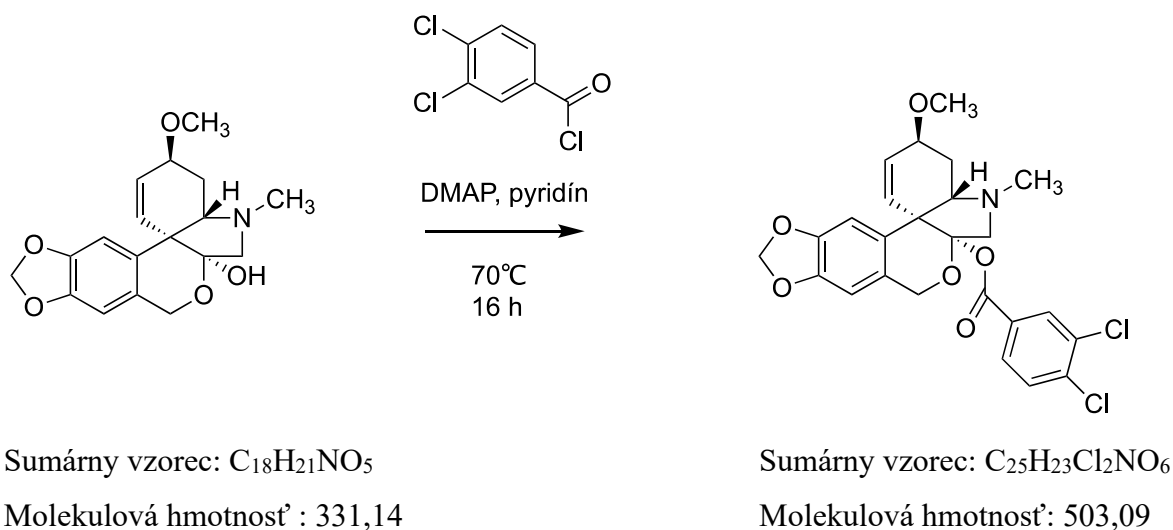
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 166.0 (d,  $J = 254.6$  Hz), 163.3, 146.72, 146.65, 132.3 (d,  $J = 9.3$  Hz), 131.7, 127.4, 126.6, 126.0 (d,  $J = 2.9$  Hz), 124.3, 115.7 (d,  $J = 22.0$  Hz), 109.4, 105.6, 103.8, 101.1, 73.0, 68.0, 63.3, 63.0, 56.2, 50.7, 42.2, 26.0

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 9,0^\circ$  (c 0,266;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.7 Príprava 6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu (LC-201)



**Obr. 15:** Schéma syntézy 6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 40 mg (0,191 mmol) 3,4-dichlorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 70°C po dobu 16 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 20,2 mg 6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 33,5 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu (LC-201)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  503,966

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 8.00 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.74 (1H, dd,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 2.0$  Hz), 7.49 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz), 6.94 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.21 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz), 5.98–5.94 (2H, m), 5.72–5.68 (1H, m), 4.78 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 4.71 (1H, d,  $J = 15.1$  Hz), 4.21–4.15 (1H, m), 3.64 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz), 3.49 (3H, s, overlapped), 3.49 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, overlapped), 2.92–2.90 (1H, m), 2.49 (3H, s), 2.32–2.25 (1H, m), 1.71–1.64 (1H, m)

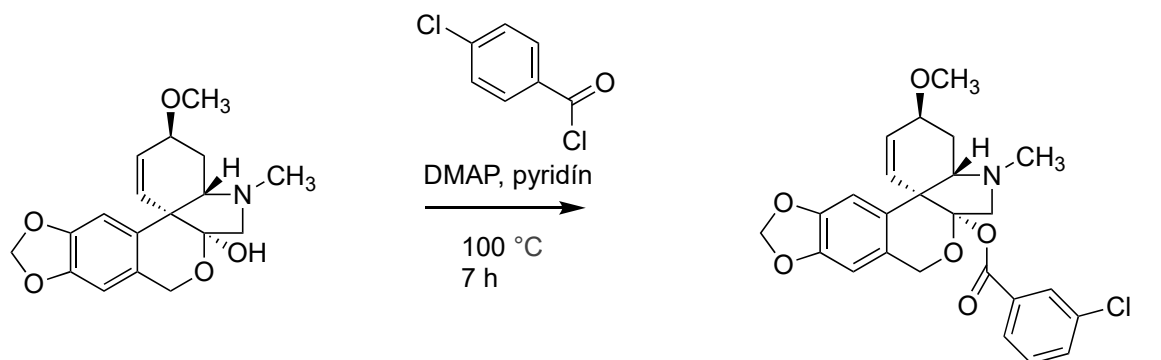
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

162.5, 146.9, 146.8, 138.1, 133.1, 132.0, 131.5, 130.7, 129.6, 128.7, 127.1, 126.4, 124.1, 109.4, 106.1, 103.8, 101.1, 72.9, 68.1, 63.3, 63.0, 56.3, 50.7, 42.2

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26,3^\circ$  (c 0,198;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.8 Príprava 6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettínu (DZ1)



Sumárny vzorec:  $C_{18}H_{21}NO_5$

Molekulová hmotnosť : 331,14

Sumárny vzorec:  $C_{25}H_{24}ClNO_6$

Molekulová hmotnosť: 469,13

#### **Obr. 16:** Schéma syntézy 6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettínu

20 mg (0,06 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 20  $\mu$ l (0,156 mmol) 3-chlorobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 100°C po dobu 7 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : DEA 95:5. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Výsledný produkt bol dvakrát prečistený z dôvodu obsahu nečistôt. Po prečistení bolo získaných 16 mg 6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 56,8 %. Predpokladaný výtazok však bude určite nižší, vzhľadom k tomu že derivát DZ1 bude potrebné ešte raz prečistiť.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(3-chlorobenzoyl)tazettínu (DZ1)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 470,236

### *NMR štúdia*

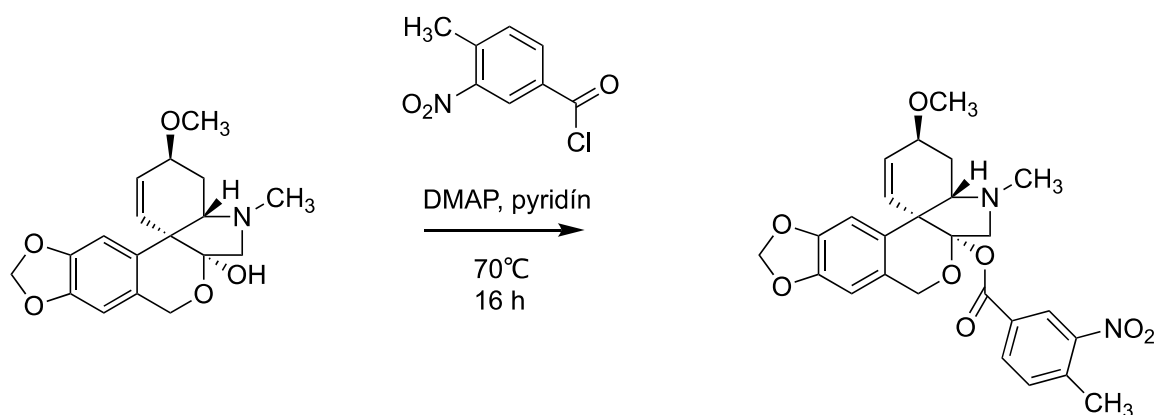
Derivát DZ1 sa nepodarilo ani po dvoch separáciách úplne vyčistiť, preto bude potrebné separáciu zopakovať a následne znova vykonať meranie NMR.

### *Optická otáčavosť*

Meranie optickej otáčavosti sa nepodarilo vykonať nakoľko uvedená látka nebola čistá. Po prečistení bude potrebné meranie vykonať.



#### 4.2.9 Príprava 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu (LC-203)



Sumárny vzorec:  $C_{18}H_{21}NO_5$

Molekulová hmotnosť : 331,14

Sumárny vzorec:  $C_{26}H_{26}N_2O_8$

Molekulová hmotnosť: 494,17

**Obr. 17:** Schéma syntézy 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,343 mmol) 4-methyl-3-nitrobenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 70°C po dobu 16 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 30,7 mg 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 51,8 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu (LC-203)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  495,264

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 8.45 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz), 8.02 (1H, dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.8$  Hz), 7.40 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 6.94 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.21 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz), 5.96 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, overlapped), 5.95 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, overlapped), 5.74–5.70 (1H, m), 4.78 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.72 (1H, d,  $J = 15.2$  Hz), 4.21–4.16 (1H, m), 3.66 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 3.49 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, overlapped), 3.49 (3H, s, overlapped), 2.93–2.90 (1H, m), 2.64 (3H, s), 2.50 (3H, s), 2.32–2.26 (1H, m), 1.67 (1H, ddd,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 2.1$  Hz)

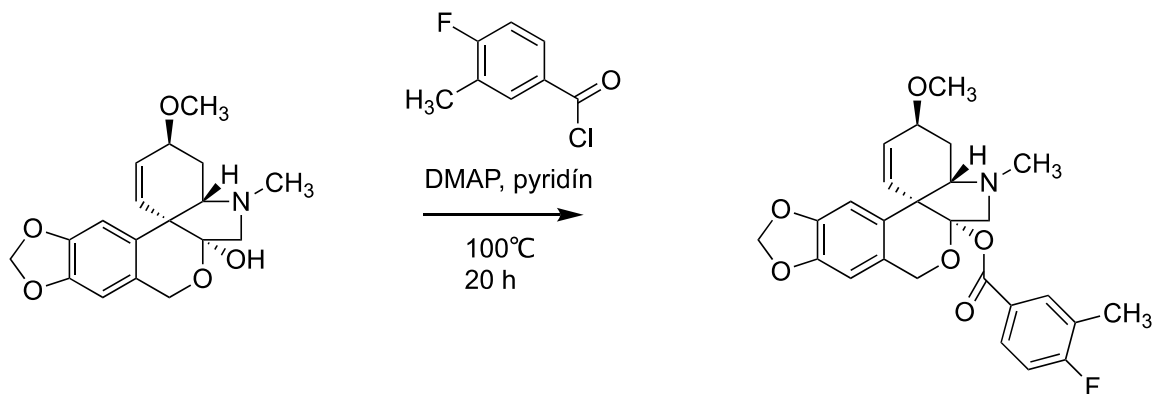
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

162.4, 149.3, 146.9, 146.8, 138.8, 133.3, 133.1, 131.9, 129.1, 127.1, 126.4, 125.7, 124.0, 109.4, 106.2, 103.8, 101.1, 72.9, 68.1, 63.3, 63.1, 56.2, 50.7, 42.2, 26.0, 20.5

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9,9^\circ$  (c 0,243;  $\text{CHCl}_3$ )

#### 4.2.10 Príprava 6-O-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettínu (LC-205)



Sumárny vzorec:  $C_{18}H_{21}NO_5$

Molekulová hmotnosť : 331,14

Sumárny vzorec:  $C_{26}H_{26}FNO_6$

Molekulová hmotnosť: 467,17

**Obr. 18:** Schéma syntézy 6-O-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettínu

40 mg (0,12 mmol) tazettínu bolo rozpustených v 2 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50  $\mu$ l (0,352 mmol) 4-fluoro-3-methylbenzoylchloridu a nakoniec 2 mg (0,016 mmol) DMAP. Zmes bola miešaná pri teplote 100°C po dobu 20 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou TLC za použitia mobilnej fázy cHx : EtOAc : DEA 70:20:10. Reakčná zmes bola potom odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola cHx: DEA 95 : 5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Bolo získaných 37,2 mg 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu vo forme žltých kryštálov. Výťažok reakcie bol 66,4 %.

## Štruktúrna analýza 6-*O*-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettínu (LC-205)

### *MS štúdia*

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  468,158

### *NMR štúdia*

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 7.81–7.78 (1H, m), 7.76–7.71 (1H, m), 7.00 (1H, t,  $J = 8.9$  Hz), 6.95 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.20 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz), 5.97–5.93 (2H, m), 5.76–5.72 (1H, m), 4.75 (2H, s), 4.20–4.15 (1H, m), 3.63 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz), 3.49 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, overlapped), 3.49 (3H, s, overlapped), 2.92–2.88 (1H, m), 2.48 (3H, s), 2.31–2.24 (1H, m, overlapped), 2.28 (3H, s, overlapped), 1.71–1.64 (1H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C):

$\delta$ : 164.5 (d,  $J = 253.0$  Hz), 163.6, 146.7, 146.6, 133.3 (d,  $J = 6.7$  Hz), 131.7, 129.5 (d,  $J = 9.5$  Hz), 127.4, 126.7, 125.5 (d,  $J = 8.6$  Hz), 125.4 (d,  $J = 23.6$  Hz), 124.4, 115.2 (d,  $J = 23.6$  Hz), 109.4, 105.5, 103.8, 101.0, 73.0, 68.0, 63.4, 62.9, 56.2, 50.7, 42.2, 26.0, 14.4 (d,  $J = 3.4$  Hz)

### *Optická otáčavosť*

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12,3^\circ$  (c 0,260;  $\text{CHCl}_3$ )

## 5. Výsledky

### 5.1. Príprava polosyntetických derivátov

*Tabuľka 5: Pripravené zlúčeniny a ich percentuálny výtťažok z reakcií*

Označenie látky	Chemický názov	Výtťažok (%)
LC-173	6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettín	42,2
LC-209	6-O-(3-bromobenzoyl)tazettín	53,3
LC-213	6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettín	59,0*
LC-200	6-O-(2,4-difluorobenzoyl)tazettín	69,7
LC-199	6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettín	67,7
LC-198	6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettín	69,3
LC-201	6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettín	33,5
DZ1	6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettín	56,8*
LC-203	6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettín	51,8
LC-205	6-O-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettín	66,4

\*uvedený výtťažok nie je konečný vzhľadom k tomu že uvedené deriváty je potrebné ešte raz prečistiť

## 5.2. Screening biologických aktivít

### 5.2.1. Inhibičná aktivita derivátov proti AChE a BuChE a ich prestup cez HEB

*Tabuľka 6: Hodnoty percentuálnej inhibície AChE a BuChE, hodnoty logBB*

	% inhibícia AChE (100 $\mu$ M)	% inhibícia BuChE (100 $\mu$ M)	logBB*
LC-173	37,46 $\pm$ 0,45	30,76 $\pm$ 1,31	0,277
LC-209	3,06 $\pm$ 0,85	11,42 $\pm$ 0,99	0,277
LC-200	13,17 $\pm$ 0,36	16,60 $\pm$ 0,41	0,277
LC-199	8,76 $\pm$ 0,48	4,38 $\pm$ 0,44	0,420
LC-198	4,21 $\pm$ 1,02	54,49 $\pm$ 1,47	0,277
LC-201	5,45 $\pm$ 0,26	10,38 $\pm$ 0,72	0,239
LC-203	17,67 $\pm$ 0,74	5,23 $\pm$ 0,13	0,030
LC-205	12,37 $\pm$ 0,86	11,08 $\pm$ 0,75	0,277

\*vypočítané cez <http://www.way2drug.com/geb/>

**LogBB** je hodnota vyjadrujúca prestup cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Je definovaná ako logaritmickej pomer medzi koncentráciou zlúčeniny v mozgu a krvi. Vypočítané hodnoty logBB pripravených zlúčenín sa pohybujú od 0,277 do 0,420. Zlúčeniny s logBB > 0,3 ľahko prestupujú HEB, zatiaľ čo tie čo majú < - 1,0 sú zle distribuované do mozgu.<sup>3</sup>

### 5.2.2. Protinádorová aktivita derivátov

V tabuľke 7 a 8 sú zhrnuté výsledky protinádorovej aktivity pripravených derivátov tazettínu. Vybrané nádorové bunečné línie a nenádorové bunečné línie ako Jurkat (akútna leukémia T-lymfocytov), MOLT-4 (akútna lymfoblastická leukémia), A549 (karcinóm pľúc), HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm), PANC-1 (karcinóm pankreatického epitelu), A2780 (karcinóm vaječníku), HeLa (cervikálny adenokarcinóm), MCF-7 (adenokarcinóm prs), SAOS-2 (osteosarkóm) and MRC-5 (normálne pľúcne fibroblasty) boli zakúpené buď od ATCC (Manassas, USA) alebo od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a kultivované podľa doporučených postupov. Všetky bunečné línie boli udržiavané na teplote 37 °C a vo zvlhčenom 5 % oxide uhličitom a z 95 % vo vzdušnom inkubátore. Ako štandard sa uvádza protinádorové chemoterapeutikum doxorubicín.<sup>10</sup> Testovanie žiaľ neprinieslo uspokojivé výsledky, nakoľko je z tabuľky 7 a 8 viditeľné, že žiadny z pripravených derivátov tazettínu nevykazuje významnú toxicitu voči nádorovým bunkám.

**Tabuľka 7:** Testované deriváty v koncentrácii 10 µM na vybraných bunečných líniách a ich hodnoty viability v % (prolifерácia buniek po 48 hod)

	<b>LC-173</b>	<b>LC-199</b>	<b>LC-200</b>	<b>LC-201</b>	<b>Doxorubicín*</b>
Jurkat	100±4	102±2	101±9	101±13	1±0
MOLT-4	99±14	98±13	98±16	97±17	1 ± 2
A549	100±4	100±8	125±25	123±24	17±6
HT-29	104±2	104±5	103±2	107±7	57±4
PANC-1	97±2	111±5	104±9	109±10	67±7
A2780	102±2	100±3	92±8	93±8	11±2
HeLa	108±4	106±10	100±9	98±5	25 ± 11
MCF-7	117±4	118±11	104±9	93±6	36 ± 3
SAOS-2	98±5	105±6	102±10	102±6	27 ± 5
MRC-5	108 ± 103	116 ± 96	117 ± 98	120 ± 102	52 ± 7

\*testovaná koncentrácia 1 µM

**Tabuľka 8:** Testované deriváty v koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  na vybraných bunčných liniách a ich hodnoty viability v % (proliferácia buniek po 48 hod)

	LC-203	LC-205	LC-209	Doxorubicín*
Jurkat	99 $\pm$ 11	100 $\pm$ 13	100 $\pm$ 15	1 $\pm$ 0
MOLT-4	106 $\pm$ 18	111 $\pm$ 15	112 $\pm$ 17	1 $\pm$ 2
A549	118 $\pm$ 26	119 $\pm$ 32	115 $\pm$ 30	17 $\pm$ 6
HT-29	101 $\pm$ 2	100 $\pm$ 4	97 $\pm$ 5	57 $\pm$ 4
PANC-1	106 $\pm$ 14	100 $\pm$ 20	92 $\pm$ 18	67 $\pm$ 7
A2780	94 $\pm$ 7	102 $\pm$ 11	99 $\pm$ 10	11 $\pm$ 2
HeLa	97 $\pm$ 10	94 $\pm$ 7	90 $\pm$ 11	25 $\pm$ 11
MCF-7	100 $\pm$ 8	94 $\pm$ 9	86 $\pm$ 13	36 $\pm$ 3
SAOS-2	99 $\pm$ 13	101 $\pm$ 5	99 $\pm$ 7	27 $\pm$ 5
MRC-5	118 $\pm$ 105	104 $\pm$ 102	93 $\pm$ 102	52 $\pm$ 7

\*testovaná koncentrácia 1  $\mu\text{M}$

Derivát LC-198 je v meraní, výsledky budú k dispozícii po dokončení testu. Deriváty DZ1 a LC-213 budú dodatočne domerané po ich prečistení.

### 5.3. Optická otáčavosť

**Tabuľka 9:** Prehľad optickej otáčavosti u pripravených derivátov

	Špec. Otáčavosť (°)
LC-173	0
LC-209	-15,5
LC-200	7,1
LC-199	-28,7
LC-198	9
LC-201	-26,3
LC-203	-9,9
LC-205	-12,3

Výsledky optickej otáčavosti derivátov LC-213 a DZ1 budú dostupné po opätovnom prečistení a zmeraní látok



## 6. Diskusia a záver

Rastliny z čeľade Amaryllidaceae sú známe predovšetkým kvôli širokému spektru biologických aktivít, medzi ktoré patrí inhibičná aktivita voči AChE, či protinádorové pôsobenie.<sup>42,43,44</sup> Štúdiom a izoláciou sekundárnych metabolitov týchto rastlín, nazývaných AA sa dlhodobo zaoberá Katedra farmaceutickej botaniky. Na základe štúdií, uskutočnených pracovnou skupinou ADINACO, bol pre túto diplomovú prácu vybraný alkaloid tazettín, ktorý bol na katedre izolovaný z cibulí *Zephyranthes robusta* Baker.<sup>4</sup>

Hlavným cieľom predloženej diplomovej práce bola modifikácia štruktúry tazettínu, vytvorením esterov v polohe C-6a, ich štruktúrna analýza a testovanie spektra biologických aktivít. Príprava týchto derivátov bola inšpirovaná predošlými štúdiami, ktoré boli vykonané na katedre farmaceutickej botaniky, kde sa esterifikáciou iného AA haemanthamínu podarilo pripraviť látky so zaujímavou inhibičnou aktivitou voči AChE/BuChE.<sup>5</sup> Štruktúra týchto pilotných derivátov haemanthamínu je ďalej optimalizovaná. Tazettín bol vybraný pre prípravu derivátov aj z dôvodu, že sa jedná o jeden z hlavných AA, ktorý sa vyskytuje v celej rade rodov čeľade Amaryllidaceae.<sup>53,70,88</sup> V rámci tejto diplomovej práce bolo pripravených desať aromatických esterov tazettínu (Tabuľka 5). Syntéza derivátov prebiehala reakciou tazettínu s príslušným acylchloridom v prostredí bezvodého pyridínu za zvýšenej teploty a v prítomnosti katalyzátoru DMAP. Využívali sa predovšetkým benzoylchloridy, ktoré boli substituované halogénmi v rôznych polohách benzénového jadra s výnimkou 6-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu (LC-203), ktorý bol pripravený reakciou s nitro-substituovaným chloridom. Po prebehnutí reakcie bola na získanie produktu použitá preparačná TLC. Po následnom spracovaní produktu boli výsledkom reakcie žlté kryštály. Produkty reakcie boli identifikované pomocou MS, NMR a optickej otáčavosti. Všetky pripravené deriváty tazettínu sú originálnej štruktúry a neboli doposiaľ syntetizované. Pre účely štúdie biologickej aktivity boli pripravené deriváty prevedené na hydrochloridy z dôvodu zvýšenia ich rozpustnosti.

Pripravené látky boli v rámci štúdií podrobené testovaniu, kde sa skúmal ich inhibičný potenciál voči ľudským cholínesterázam (AChE a BuChE) (tabuľka 6). Všetky pripravené deriváty boli podrobené screeningovej štúdii pri koncentrácii 100  $\mu$ M. Výsledky však ukázali, že inhibícia AChE a BuChE nedosahuje požadované hodnoty. Nevýznamné hodnoty inhibície voči ľudským cholínesterázam dosahoval aj samotný tazettín v publikovanej štúdii.<sup>91</sup> V rámci testovaných látok, dosiahol najvyššiu aktivitu 6-*O*-(2-

fluorobenzoyl)tazettín (LC-173), vykazujúci inhibíciu 37,46 % voči AChE. Najvyššiu aktivitu voči BuChE dosiahol 6-*O*-(4-fluorobenzoyl)tazettín (LC-198) s hodnotou a 54,49 %. Z toho dôvodu látky ďalej neboli vybrané pre stanovenie hodnoty IC<sub>50</sub>. Inhibítory AChE našli svoje uplatnenie v terapii AD.<sup>3</sup>

Deriváty DZ1 a LC-213 sa žiaľ ani po dvoch separáciách nepodarilo úplne vyčistiť a preto bude potrebné uvedené deriváty znova prečistiť a otestovať ich biologickú aktivitu.

Testoval sa aj potenciál derivátov inhibovať BuChE, pretože sa ukazuje jej významná úloha pri maturácii patologického A $\beta$ . Inhibícia BuChE signifikantne koreluje so zlepšením verbálnej i priestorovej pamäti, reakčných časov úloh, ktoré mapujú frontálne, temporálne a limbické mozgové regióny. Vo vývoji sú dnes selektívne inhibítory BuChE.<sup>32</sup>

Pri všetkých pripravených derivátoch bola stanovená hodnota logBB. Vypočítané hodnoty sú zhrnuté v tabuľke 6. Táto hodnota bola vypočítaná na základe štruktúry jednotlivých látok. Vyjadruje schopnosť látok prestupovať HEB. Schopnosť prestupovať HEB je kľúčová vlastnosť liečiv ktorú je potrebné poznať už na začiatku štúdie a je nevyhnutná pre pôsobenie ich pôsobenie v centrálnej nervovej sústave (CNS). Na základe výsledkov však spomedzi desiatich syntetizovaných látok, ľahko prestupujú HEB do CNS len 6-*O*-(2-chlorobenzoyl)tazettín (LC-213), 6-*O*-(4-chlorobenzoyl)tazettín (LC-199) a 6-*O*-(3-chlorobenzoyl)tazettín (DZ1).

Testovala sa aj protinádorová aktivita derivátov na paneli vybraných bunecných línií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a MRC-5). Žiadna z testovaných látok však nevykázala požadovanú toxicitu pri danej koncentrácii (Tabuľka 7 a 8). Výsledky z testovania protinádorovej aktivity 6-*O*-(4-fluorobenzoyl)tazettínu (LC-198) budú dostupné po dokončení testu.

Uvedené výsledky cytotoxickej aktivity derivátov podporujú závery vykonaných štúdií, pri ktorých tazettín nevykazoval významnú cytotoxickú aktivitu. Významný rozdiel v cytotoxicite medzi štruktúrne príbuznými zlúčeninami, tazettínom a pretazettínom naznačuje niektoré vzťahy medzi štruktúrou a účinkom. Premenu pretazettínu na tazettín dochádza k významnému poklesu cytotoxickej aktivity.<sup>85</sup>

Zároveň je možné konštatovať, že pripravené pilotné polosyntetické deriváty tazettínu nie sú perspektívne z pohľadu vývoja látok použiteľných v terapii AD. Od prípravy stabilnejších typov derivátov ako sú estery a amíny bude teda upustené.

## 7. Literatúra

1. Tomko J.: *Farmakognózia učebnica pre farmaceutické fakulty*. Vydavateľstvo Osveta, Martin 1999. ISBN 80-8063-014-3, s. 1-422.
2. Cragg G.M., Boyd M.R., Khanna R., Kneller R., Mays T. D., Mazan K.D., Newman D. J., Sausville E. A.: International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure and Applied Chemistry* 1999; 71, s. 1619–1633.
3. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*. Karolinum, Praha 2016. ISBN 978-80-246-3264-3, s. 1-348.
4. Doležal M.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum, Praha 2013. ISBN 978-80-246-2382-5, s. 1-187.
5. Kohelová E., Peřinová R., Maafi N., Korábečný J., Hulcová D., Kucera T., Martinez-González L., Maříková J., Hrabínová M., Vorčáková K., Nováková L., De Simone A., Havelek R., Cahlíková L.: Derivatives of the  $\beta$ -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules* 2019; 24, s. 1-18.
6. Opletal L.: Daidalea – Univerzita Karlova [online]. 2020 [cit. 15. 2. 2020]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>.
7. Jahodář L.: *Farmakobotanika – Semenné rostliny*, Karolinum, Praha 2012. ISBN 978-80-86231-40-2, s.1-278.
8. (a) *Galanthus nivalis*– Wikipedia [online].  
Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Galanthus\\_nivalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Galanthus_nivalis). Stiahnuté 30.3.2020  
(b) *Narcissus pseudonarcissus* – Wikipedia [online].  
Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus\\_pseudonarcissus](https://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus_pseudonarcissus). Stiahnuté 30. 3. 2020  
(c) *Leucojum vernum*– Wikipedia [online].  
Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Leucojum\\_vernum](https://en.wikipedia.org/wiki/Leucojum_vernum). Stiahnuté 30.3.2020.
9. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* 2013; 107, s. 701-708.
10. Breiterová K., Koutová D., Maříková J., Havelek R., Kuneš J., Majorošová M., Opletal L., Hošťálková A., Jenčo J., Řezáčová M., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids of different structural types from *Narcissus* L. Cv. Professor Einstein and their cytotoxic activity. *Plants* 2020; 9, s. 1-12.

11. Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Siatka T., Šafrátová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L.: AKR1C3 Inhibitory potency of naturally-occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types. *Natural Product Communications* 2017; 12, s. 245-246.
12. Kornienko A., Evidente E.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* 2008; 108, s. 1982–2014.
13. 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. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2011; 2, s. 65-100.
14. Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Kiss R.: The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia* 2007; 9, s. 766–776.
15. Griffin C., Karnik A., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 2011; 10, s. 57–68.
16. Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., Molnár J., Ocsóvszki I., Falkay G.: Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo* 2009; 23, s. 41-48.
17. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products* 2010; 73, s. 1223–1227.
18. Wilson R.S., Segawa E., Boyle P.A., Anagnos S.E., Hizek L.P., Bennett D.A.: The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychological Aging* 2012; 27, s. 1008–1017.
19. Barker W.W., Luis C.A., Kashuba A., Luis M., Harwood D.G., Loewenstein D., Waters C., Jimison P., Shepherd E., Sevush S., Graff-Radford N., Newland D., Todd M., Miller B., Gold M., Heilman K., Doty L., Goodman I., Robinson B., Pearl G., Dickson D., Duara R.: Relative frequencies of Alzheimer's disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 2002; 16, s. 203–212.

20. Gaugler J., James B., Johnson T., Scholz K., Weuve J.: Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2016; 12, s. 459–509.
21. Katzman R.: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: A major killer. *Archives of Neurology* 1976; 33, s. 217–218.
22. Jiráček R.: Duševní poruchy ve stáří. *Psychiatrie pro praxi* 2004; 6, s. 318-320.
23. 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 Science Journal* 2008; 5, s. 1-5.
24. Perry G., Zhu X., Smith M.A., Wang X.: Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 2013; 33, s. 277–281.
25. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Yourov I.Y.: The DNA replication stress hypothesis of Alzheimer's disease. *Scientific World Journal* 2011; 11, s. 2602–2612.
26. Robertson I. H.: A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2013; 41, s. 298–308.
27. Webber K. M., Raina A. K., Marlatt M. W., Zhu X., Prat M. I., Morelli L., Smith M. A.: The cell cycle in Alzheimer disease: A unique target for neuropharmacology. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005; 126, s. 1019–1025.
28. Čahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: Natural compounds (Small Molecules) as potential and Real Drugs of Alzheimer's disease: A Critical Review, *Studies in Natural Product Chemistry*, Amsterdam 2014. ISBN: 978-0-444-63281-4, s. 153-194.
29. Hardy, J.: The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 2002; 297, s. 353–356.
30. Kumar A., Singh A., Ekavali E.: A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports* 2015; 67, s. 195–203.
31. Silvestrelli G., Lanari A., Parnetti L., Tomassoni D., Amenta F.: Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; 127, s. 148–57.
32. Žigová E.: Liečba Alzheimerovej demencie memantínom. *Psychiatrie pro praxi* 2006; 6, s. 291-294.
33. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Bray F.: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2014; 136, s. 359–386.

34. Savage P., Stebbing J., Bower M., Crook T.: Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers? *Nature Clinical Practice Oncology* 2009; 6, s. 43–52.
35. Brenner H.: Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: a period analysis. *Lancet* 2002; 360, s. 1131–1135.
36. Giese A., Bjerkvig R., Berens M.E., Westphal M.: Cost of migration : invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21, s. 24–36.
37. Evdokimov N.M., Lamoral-Theys D., Mathieu V., Andolfi A., Pelly S., van Otterlo W.A.L., Magedov I. V., Kiss R., Evidente A., Kornienko A.: In search of a cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19, s. 7252–7261.
38. Cencic R., Robert F., Galicia-Vazquez G., Malina A., Ravindar K., Somaiah R., Pierre P., Tanaka J., Deslonghamps P., Pelletier J.: Modifying chemotherapy response by targeted inhibition of eukaryotic initiation factor 4A. *Blood Cancer Journal* 2013; 3, s. 1-8.
39. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E.: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2, s. 48–58.
40. Chen G.K., Duran G.E., Mangili A., Beketic-Oreskovic L., Sikic B.I.: MDR 1 activation is the predominant resistance mechanism selected by vinblastine in MES-SA cells. *British Journal of Cancer* 2000; 83, s. 892-898.
41. Geney R., Ungureanu M., Li D., Ojima I.: Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002; 40, s. 918–925.
42. Newman D.J., Cragg G.M.: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 2012; 75, s. 311–335.
43. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* 2003; 1, s. 37-44.
44. Tanahashi T., Poulev A., Zenk M.: Radioimmunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Medica* 1990; 56, 1, s. 77–81.
45. Greenblatt H. M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J. L.: Structure of acetylcholinesterase complexed with (–)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters* 1999; 463, s. 321-326.
46. Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M.: Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new

- treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 2001; 49, s. 279-288.
47. Raskind M.A., Peskind E.R., Wessel T., Yuan W., and the Galanthamine USA-1 Study Group: Galanthamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6 month extension. *Neurology* 2000; 54, s. 2261-2268.
48. Rockwood K., Mintzer J., Truyen L., Wessel T., Wilkinson D.: Effect of a flexible galanthamine dose in Alzheimer's disease: a randomised, controlled trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2001; 71, s. 589-595.
49. Han S.Y., Sweeney J.E., Bachman E.S., Schweiger E.J., Forloni G., Coyle J.T., Davis B.M., Joullié M.M.: Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease?, *European Journal of Medicinal Chemistry* 1992; 27, s. 673-687.
50. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 2002; 21, s. 2521-2529.
51. Nair J. J., Bastida J., Codina C., Viladomat F., van Staden J.: Alkaloids of the south african Amaryllidaceae: A review. *Natural Product Communications* 2013; 8, s. 1335-1350.
52. Lipovská K.: Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. 2018.
53. Jin Z.: Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports* 2009; 26, s. 363-381.
54. Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity, *Chirality* 2017; 29, s. 1-14.
55. DeGara L., Paciolla C., Tommasi F., Liso R., Arrigoni O.: *In vivo* inhibition of galactono- $\gamma$ -lactone to ascorbate by lycorine. *Journal of Plant Physiology* 1994; 144, s. 649-653.
56. Hwang Y., Chu J., Yang P., Chen W., Yates M.: Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Research* 2008; 3, s. 232-236.
57. Deng 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. *Journal of Virology* 2007; 24, s. 13392-13402.

58. Li S., Chen C., Zhang H.: Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research* 2005; 67, s. 18-23.
59. Thi Ngoc Tram N., Titorenkova T., St. Bankova V., Handjieva N., Popov S.: *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia* 2002; 73, s. 183–208.
60. Nair J. J., van Staden J.: Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural Product Communications* 2014; 9, s. 1193-1210.
61. Liu X. S., Jiang J., Jiao X. Y., Wu Y. E., Lin J. H., Cai Y. M.: Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters* 2009; 274, s. 16-24.
62. Perciavalle R.M., Stewart D. P., Koss B., Lynch J., Milasta S., Bathina M., Temirov J., Cleland M. M., Pelletier S., Schuetz J. D., Youle R.J., Green D.R., Opferman J.T.: Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nature Cell Biology* 2012; 29, s. 575-583.
63. Casu L., Cottiglia F., Leonti M., De Logu A., Agus E., Tse-Dinh Y.C., Sissi C.: Ungeremine effectively targets mammalian as well as bacterial type I and type II topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21, s. 7041–7044.
64. Habartová K., Cahlíková L., Rezacova M, Havelek R.: The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications* 2016; 11, s. 1587-1594.
65. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 2015; 13, s. 394-398.
66. Li Y., Liu J., Tang L. J., Shi Y. W., Ren W., Hu W. X.: Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology Reports* 2007; 17, s. 377 – 384.
67. Nair J.J., Bastida J., Viladomat F., Van Staden J., Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications* 2012; 7, s. 1677-1688.
68. Jin Z., Xu X.: Amaryllidaceae Alkaloids. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. *Springer Berlin Heidelberg* 2013; 1, s.479-522.



69. He M., Qu C., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 2015; 5, s. 16562–16574.
70. Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D.: Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Medica* 2002; 68, s. 454–457.
71. Tanker M., Citoglu G., Gümühel B., Hener B.: Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and their analgesic effects. *Pharmaceutical Biology* 1996; 34, s. 194–197.
72. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 425, s. 342–348.
73. Baez A., Vazquez D.: Binding of [<sup>3</sup>H]narciclasine to eukaryotic ribosomes, A study on a structure-activity relationship. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; 518, s. 95–103.
74. Havelek R., Seifrtová M., Kralovec K., Brucková L., Cahlíkova L., Dalecká M., Bilková Z.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* 2014; 21, s. 479–490.
75. Evidente A., Kireev A.S., Jenkins A.R., Romero A.E., Steelant W.F., Van Slambrouck S., Kornienko A.: Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica* 2009; 75, s. 501–507.
76. Pettit G., Gaddami G., Cragg D., Herald M., Sagawa Y.: Isolation and structure of pancratistatin. *Journal of the Chemical Society* 1984; 5, s. 1693–1694.
77. Ceriotti G.: Narciclasine: an antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. *Nature* 1967; 213, s. 595–596.
78. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 425, s. 342–348.
79. Dall'acqua F., Rodighiero C.: Investigations on the mechanism of action of narciclasine. *Farmaco Science* 1977; 32, s. 67–75.
80. National cancer institute. Division of cancer treatment and diagnosis [online]. 2020 [cit. 23.2.2020] Dostupné z: <https://dtp.cancer.gov>.

81. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 2003; 17, s.1220–1223.
82. Hulcová D., Breiterová K., Zemanová L., Siatka T., Šafrátová M., Vaněčková N., Hošťálková A., Wsól V., Cahlíková L.: AKR1C3 Inhibitory potency of naturally-occurring Amaryllidaceae alkaloids of different structural types, *National Product Communications* 2017; 12, s. 245-246.
83. Papas T. S., Sandhaus L., Chirigos M. A., Furusawa E.: Inhibition of DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by an alkaloid extract from *Narcissus tazetta* L. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1973; 52, s. 88-92.
84. Wildman W.C., Bailey D.T.: Novel alkaloids containing the [2]benzopyrano[3,4-c]indole nucleus. *The Journal of Organic Chemistry* 1968; 33, s. 3749–3753.
85. Furusawa E., Furusawa S., Lee J. Y. B., Patanavanich S.: Therapeutic activity of pretazettine, a *narcissus* alkaloid on Rauscher leukemia: Comparison with tazettine and streptonigrin. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 1976; 152, s. 186–191.
86. Mayba O., Gnad F., Peyton M., Zhang F., Walter K., Du P., Huntley M. A., Jiang Z., Liu J., Haverty P. M., Gentleman R. C., Li R., Minna J. D., Li Y., Shames D. S., Zhang Z.: Integrative analysis of two cell lines derived from a non-small-lung cancer patient - a panomics approach. *Pacific Symposium on Biocomputing* 2014; 1, s. 75–86.
87. Masi M., Frolova L. V., Yu X., Mathieu V., Cimmino A., De Carvalho A., Evidente A.: Jonquailine, a new pretazettine-type alkaloid isolated from *Narcissus jonquilla quail*, with activity against drug-resistant cancer. *Fitoterapia* 2015; 102, s. 41–48.
88. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chemistry and Biodiversity* 2013; 10, s. 1120-1127.
89. Šafrátová M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* a jejich biologická aktivita. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. 2013.

90. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanocá K., Jahodář L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications* 2011; 6, s. 603-606.
91. Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Hošťálková A., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Opletal L., De Simone A., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* 2019; 165, s. 1-12.

## 8. Zoznam použitých skratiek

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
AMK	aminokyselina
APP	amyloidový prekurzorový proteín
$A\beta$	$\beta$ -amyloid
BuChE	butyrylcholinesteráza
CD <sub>3</sub> OD	tetradeteromethanol
CDCl <sub>3</sub>	chloroform
CNS	centrálny nervový systém
DEA	dietylamín
DMAP	dimethylaminopyridín
EI-MS	hmotnostná spektroskopia s elektrónovou ionizáciou
EtOAc	etylacetát
HEB	hematoencefalická bariéra
ChAT	cholínacetyltransferáza
ChE	cholinesteráza
cHx	cyklohexán
IC <sub>50</sub>	inhibičná koncentrácia
MDR	rezistencia voči viacerým liečivám
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
Pg-P	P-glykoproteín
ppm	pars per milion
SARS	ťažký akútny respiračný syndróm
TLC	tenkovrstvá chromatografia

## 9. Zoznam tabuliek

<b>Tabuľka 1:</b> Štruktúrne typy alkaloidov Amaryllidaceae, hlavní zástupcovia a príklady rodov, z ktorých boli izolované (prevzaté a skrátené z literatúry) <sup>13</sup> .....	- 12 -
<b>Tabuľka 2:</b> Hodnoty IC <sub>50</sub> lykorínu na vybraných nádorových líniách <sup>65,66</sup> .....	- 21 -
<b>Tabuľka 3:</b> Cytotoxicita haemanthamínu a haemanthidínu proti dvom rakovinovým bunkovým líniám a jednej nekanceróznej gastrointestinálnej bunkovej línii. <sup>65</sup> .....	- 24 -
<b>Tabuľka 4:</b> Hodnoty IC <sub>50</sub> testovaných zlúčenín <sup>16</sup> .....	- 28 -
<b>Tabuľka 5:</b> Pripravené zlúčeniny a ich percentuálny výt'azok z reakcií .....	- 53 -
<b>Tabuľka 6:</b> Hodnoty percentuálnej inhibície AChE a BuChE, hodnoty logBB .....	- 54 -
<b>Tabuľka 7:</b> Testované deriváty na vybrané bunkové línie a ich hodnoty viability v % -	55 -
<b>Tabuľka 8:</b> Testované deriváty na vybrané bunkové línie a ich hodnoty viability v % -	56 -
<b>Tabuľka 9:</b> Prehľad optickej otáčavosti u pripravených derivátov .....	- 56 -

## 10. Zoznam obrázkov

<b>Obr.1:</b> <i>Galanthus nivalis</i> , <sup>8a</sup> <i>Narcissus pseudonarcissus</i> , <sup>8b</sup> <i>Leucojum vernum</i> <sup>8c</sup> .....	- 9 -
<b>Obr. 2:</b> Biosyntéza hlavných štruktúrnych typov Amaryllidaceae alkaloidov (prevzaté) <sup>9</sup> .....	- 11 -
<b>Obr. 3:</b> Schematické znázornenie ciest možného spracovania APP (prevzaté) <sup>30</sup> .....	- 15 -
<b>Obr. 4:</b> Štruktúry vybraných alkaloidov galanthamínového typu (prevzaté) <sup>13</sup> .....	- 18 -
<b>Obr. 5:</b> Vybrané štruktúry lykorínového typu <sup>13</sup> .....	- 21 -
<b>Obr. 6:</b> Vybrané štruktúry heamanthamínového a krinínového typu <sup>13</sup> .....	- 23 -
<b>Obr. 7:</b> Vybrané štruktúry pankratistatínového typu <sup>13</sup> .....	- 25 -
<b>Obr. 8:</b> Vybrané štruktúry tazettínového typu <sup>13</sup> .....	- 26 -
<b>Obr. 10:</b> Schéma syntézy 6-O-(2-fluorobenzoyl)tazettínu.....	- 33 -
<b>Obr. 11:</b> Schéma syntézy 6-O-(3-bromobenzoyl)tazettínu .....	- 35 -
<b>Obr. 12:</b> Schéma syntézy 6-O-(2-chlorobenzoyl)tazettínu .....	- 37 -
<b>Obr. 13:</b> Schéma syntézy 6-O-(2,4-difluorobenzoyl)tazettínu .....	- 39 -
<b>Obr. 14:</b> Schéma syntézy 6-O-(4-chlorobenzoyl)tazettínu .....	- 41 -
<b>Obr. 15:</b> Schéma syntézy 6-O-(4-fluorobenzoyl)tazettínu.....	- 43 -
<b>Obr. 16:</b> Schéma syntézy 6-O-(3,4-dichlorobenzoyl)tazettínu .....	- 45 -
<b>Obr. 17:</b> Schéma syntézy 6-O-(3-chlorobenzoyl)tazettínu .....	- 47 -
<b>Obr. 18:</b> Schéma syntézy 6-O-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)tazettínu .....	- 49 -
<b>Obr. 19:</b> Schéma syntézy 6-O-(4-fluoro-3-methylbenzoyl)tazettínu.....	- 51 -

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej botaniky

Kandidát: Dušan Zelina

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

Názov diplomovej práce: Deriváty Amaryllidaceae alkaloidov a ich biologická aktivita:

Deriváty tazettínu II

Rastliny čeľade Amaryllidaceae sú bohatým zdrojom alkaloidov ktoré sa vyznačujú širokou biologickou aktivitou. Azda celosvetovo najznámejším zástupcom tejto čeľade sa stal galanthamín, ktorý si pre svoj silný inhibičný potenciál našiel miesto v terapii Alzheimerovej choroby.

Na základe uskutočnených štúdií bol pre túto prácu zvolený alkaloid tazettín. Hlavným cieľom bola príprava aktívnejších derivátov tazettínu a testovanie biologickej aktivity v súvislosti s potenciálnym využitím v liečbe nádorových ochorení a Alzheimerovej choroby. Bolo pripravených desať aromatických esterov tazettínu. Výťažky reakcií boli v rozmedzí 33,5-69,3 % Deriváty boli identifikované pomocou MS, NMR a optickej otáčavosti.

Pripravené látky boli podrobené testovaniu, kde sa skúmal ich inhibičný potenciál voči ľudským cholinesterázam – AChE a BuChE. Žiaľ, nepodarilo sa pripraviť deriváty ktoré by vykazovali významnú aktivitu v inhibícii AChE alebo BuChE.

Na paneli vybraných bunčných línií sa testovala protinádorová aktivita derivátov. Avšak ani v tomto prípade sa nepodarilo pripraviť deriváty s požadovanou toxicitou.

Kľúčové slová: Amaryllidaceae alkaloidy, Alzheimerova choroba, tazettín, biologická aktivita

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Dušan Zelina

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

Title of diploma thesis: Derivates of Amaryllidaceae alkaloids and their biological activity:  
Derivates of tazettine II

Plants of family Amaryllidaceae are a rich source of alkaloids that are characterized by a broad biological activity. Perhaps the world's best-known member of this family has become galanthamine, which, because of its potent inhibitory potential, has found a place in the treatment of Alzheimer's disease.

Based on the conducted studies, the alkaloid tazettine has been chosen for this thesis. The main purpose was to prepare more active derivatives of tazettine and to test the biological activity for potential use in the treatment of cancer and Alzheimer's disease. Ten aromatic esters of tazettine were prepared. Reaction yields ranged from 33,5-69,3 %. Derivatives were identified by MS, NMR and optical rotation.

Prepared compounds were tested for their inhibitory potential against human cholinesterases - AChE and BuChE. Unfortunately, it has not been possible to prepare derivatives, which exhibit significant activity in inhibiting AChE or BuChE.

Anti-tumor activity of the derivates has been tested on the panel of selected cell lines. However, we did not manage to prepare derivates with the desired toxicity even in this case.

Keywords: Amaryllidaceae alkaloids, Alzheimer's disease, tazettine, biological activity