

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Alkaloidy kultivárov rodu *Narcissus* a ich biologická aktivita I.
Alkaloids of *Narcissus* species cultivars and their biological activity I.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Kateřina Breiterová, Ph.D.

Vedúci katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, august 2020

Tkáčová Beáta

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Týmto prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala sama, pod odborným dohľadom a vedením PharmDr. Kateřiny Breiterovej, Ph.D.

Všetky zdroje a literatúra, ktoré som pri jej vypracovaní použila, a z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola vytvorená za účelom získania iného titulu.

POĎAKOVANIE

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce, PharmDr. Kateřine Breiterovej, Ph.D., za jej odborné vedenie, ústretový prístup, konzultácie a poskytnuté materiály. Zároveň jej patrí veľká vďaka za všetok čas, ktorý mi venovala, za jej trpezlivosť, pomoc pri vypracovaní experimentálnej časti a pomoc pri interpretácii hmotnostných spektier. Poďakovanie patrí aj PharmDr. Marcelle Šafratovej, Ph.D., za prevedenie GC-MS analýzy. V neposlednej rade, by som chcela poďakovať PharmDr. Daniele Hulcovej, Ph.D., za jej čas strávený v laboratóriu, pri stanovovaní inhibičnej aktivity jednotlivých alkaloidných extraktov voči humánnym cholinesterázam.

Obsah

Obsah.....	4
Prehľad obrázkov a tabuliek.....	6
Zoznam skratiek	8
1. Úvod.....	10
2. Cieľ práce	12
3. Čeľad' Amaryllidaceae (Amarylkovitě)	13
3.1. Základná charakteristika rastlín z čeľade Amaryllidaceae	13
3.2. Botanický popis rodu <i>Narcissus</i> L.....	14
3.2.1. Taxonomická klasifikácia rodu <i>Narcissus</i>	15
3.3. Botanický popis kultivárov použitých v experimentálnej časti.....	16
3.3.1. <i>Narcissus</i> cv. Acropolis.....	16
3.3.2. <i>Narcissus</i> cv. Delta.....	16
3.3.3. <i>Narcissus</i> cv. White Marvel	17
3.3.4. <i>Narcissus</i> cv. Kedron	17
3.3.5. <i>Narcissus</i> cv. Scarlet Gem	18
3.3.6. <i>Narcissus albus</i> var. <i>plenus odoratus</i>	19
3.4. Alkaloidy čeľade Amaryllidaceae	20
3.4.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidov – norbelladínová cesta	20
3.4.2. Biologická aktivita amarylkovitých alkaloidov	24
3.4.2.1. Lykorínový štruktúrny typ	24
3.4.2.2. Homolykorínový štruktúrny typ	25
3.4.2.3. Galantamínový štruktúrny typ	26
3.4.2.4. Hemantamínový a krinínový štruktúrny typ	26
3.4.2.5. Pankratistatínový štruktúrny typ	27
3.4.2.6. Tazettínový štruktúrny typ	28
3.4.2.7. Montanínový štruktúrny typ	29
3.5. Alzheimerova choroba.....	30
3.6. Národové ochorenia.....	36
3.6.1. Alkaloidy lykorínového štruktúrného typu	38
3.6.2. Alkaloidy pankratistatínového štruktúrného typu	39
3.6.3. Alkaloidy hemantaminínového a krinínového štruktúrného typu	41

3.6.4.	Význam skratiek národných bunčných línií	43
4.	Experimentálna časť	45
4.1.	Všeobecné postupy	45
4.1.1.	Destilácia	45
4.1.2.	Odparovanie získaných extraktov	45
4.2.	Chemikálie, rozpúšťadlá a prístrojové vybavenie pre izoláciu alkaloidov	45
4.2.1.	Rozpúšťadlá, chemikálie a pomocný materiál	45
4.2.2.	Prístrojové vybavenie	46
4.2.3.	Databáze použité k vyhodnocovaniu výsledkov	46
4.3.	Príprava sumárnych extraktov	46
4.3.1.	Použitý biologický materiál	46
4.3.2.	Priebeh procesu extrakcie drogy a spracovanie extraktu	47
4.4.	GC-MS analýza a identifikácia jednotlivých alkaloidov	47
4.5.	Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov a alkaloidných extraktov voči erytrocytarnej <i>hAChE</i> a sérovej <i>hBuChE</i>	48
4.5.1.	Chemikálie, materiál a prístrojové vybavenie pre stanovenie biologických aktivít	48
4.5.1.1.	Chemikálie	48
4.5.1.2.	Tlmivé roztoky	48
4.5.1.3.	Biologický materiál	49
4.5.1.4.	Prístrojové vybavenie a použité programy	49
4.5.2.	Získavanie humánnych cholinesteráz <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i>	49
4.5.3.	Stanovenie inhibičnej aktivity extraktov voči <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i> (IC_{50})	50
4.6.	Stanovenie <i>in vitro</i> cytotoxického aktivity	51
5.	Výsledky	53
5.1.	Inhibičná aktivita voči <i>hAChE</i> a <i>hBuChE</i>	53
5.2.	Výsledky cytotoxického aktivity	53
5.3.	Identifikácia jednotlivých alkaloidov v sumárnych extraktoch, popis ich štruktúry a prehľad hmotnostných spektier	55
6.	Diskusia a záver	68
7.	Abstrakt	72
8.	Abstract	73
9.	Použitá literatúra	74

Prehľad obrázkov a tabuliek

Obrázok 1 – Prehľad rodov čeľade Amaryllidaceae	14
Obrázok 2 – <i>Narcissus</i> cv. Acropolis	16
Obrázok 3 – <i>Narcissus</i> cv. Delta	17
Obrázok 4 – <i>Narcissus</i> cv. White Marvel	17
Obrázok 5 – <i>Narcissus</i> cv. Kedron.....	18
Obrázok 6 – <i>Narcissus</i> cv. Scarlet Gem.....	18
Obrázok 7 – <i>Narcissus albus</i> var. <i>plenus odoratus</i>	19
Obrázok 8 – Norbelladínová biosyntetická cesta	22
Obrázok 9 – Štruktúrne typy amarylkovitých alkaloidov	23
Obrázok 10 – Pozitrónová emisná tomografia mozgu zdravého a chorého pacienta	31
Obrázok 11 – Inhibitory cholinesteráz	33
Obrázok 12 – Inhibitor NMDA receptorov	34
Obrázok 13 – Viacstupňový proces kancerogenézie.....	37
Obrázok 14 – Lykorínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou	39
Obrázok 15 – Pankratistatínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou.....	41
Obrázok 16 – Štruktúra narciprimínu.....	41
Obrázok 17 – Hemantamínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou	42
Obrázok 18 – Hemantamínový alkaloid bulbispermín a krinínový alkaloid distichamín s cytotoxickou aktivitou	43
Obrázok 19 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-450.....	60
Obrázok 20 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-457.....	61
Obrázok 21 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-460.....	62
Obrázok 22 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-463.....	63
Obrázok 23 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-467.....	64
Obrázok 24 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-508.....	65
Obrázok 25 – Prehľad štruktúr izolovaných alkaloidov.....	67
Tabuľka 1 – Prehľad hmotností jednotlivých vzoriek použitých pri extrakcii	46
Tabuľka 2 – Hodnoty cholinesterázovej aktivity štandardov.....	51
Tabuľka 3 – Prehľad výsledkov anticholinesterázovej aktivity sumárnych alkaloidných extraktov rodu <i>Narcissus</i> L.	53

Tabuľka 4 – Prehľad cytotoxického pôsobenia testovaných sumárnych alkaloidných extraktov voči bunkám nádorových línií.....	54
Tabuľka 5 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-450.....	56
Tabuľka 6 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-457.....	57
Tabuľka 7 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-460.....	58
Tabuľka 8 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-463.....	58
Tabuľka 9 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-467.....	59
Tabuľka 10 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-508.....	59
Tabuľka 11 – Percentuálne zastúpenie jednotlivých alkaloidov prítomných v sumárnych extraktoch.....	66

Zoznam skratiek

3,4-DHBA	3,4-dihydroxybenzaldehyd
A β	amyloid β
A2780	bunečná línia karcinómu vaječníka
A549	bunečná línia adenokarcinómu pľúc
ACh	acetylcholín
AD	Alzheimerova choroba
AmA	alkaloidy Amaryllidaceae
APP	amyloidový prekurzorový proteín
cv.	kultivár
CYP73A1	trans-cinamát-4 monooxygenáza
CYP96T1	noroxomaritidín syntáza
EBM	evidence based medicine (medicína založená na dôkazoch)
GC-MS	plynová chromatografia spojená s hmotnostným spektrometrom
GSK-3 β	glykogénsyntáza kináza 3 β
<i>h</i> AChE	humánna acetylcholínesteráza
<i>h</i> BuChE	humánna butyrylcholínesteráza
HeLa	bunečná línia adenokarcinómu krčku maternice
HT-29	bunečná línia kolorektálneho karcinómu
IC ₅₀	inhibičná koncentrácia (koncentrácia, ktorá spôsobuje 50% inhibíciu)
iChE	inhibítory cholínesteráz
Jurkat	bunečná línia akútnej leukémie T-lymfocytov
L-Phe	L-fenylalanín

L-Tyr	L-tyrozín
<i>m/z</i>	pomer hmotnosti iónu a náboja iónu
MCF-7	bunečná línia adenokarcinómu prs
MOLT-4	bunečná línia akútnej lymfoblastickej leukémie
MRC-5	bunečná línia zdravých pľúcnych fibroblastov
N4OMT	norbelladín 4'- <i>O</i> -metyltransferáza
NBS	norbelladín syntáza
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartátový receptor
NO	nádorové ochorenia
PAL	fenylalanínamóniumlyáza
PANC-1	bunečná línia epiteliálneho karcinómu podžalúdkovej žľazy
RT	retenčný čas
SAOS-2	bunečná línia osteosarkómu
TYDC	tyrozín dekarboxyláza
<i>Vp</i> VAN	vanillin syntáza

1. Úvod

Ľudia už odpradáva skúmali prírodu a jej prostriedky využívali k obžive, lovu, ako zdroje materiálov pre výrobu odevov, ale zároveň aj k liečbe zranení či ochorení. Práve prinavrátanie a udržanie ľudského zdravia viedlo ľudí k tomu, aby vyhľadávali nové zdroje s obsahom liečivých látok, ktoré by bolo možné v liečbe zranení či ochorení využiť. Jedným z najviac využívaných prírodných zdrojov s terapeutickým alebo poprípade toxickým účinkom boli rastliny, ktoré až do obdobia iatrochémie predstavovali základ liečby a profylaxie [1]. Využívali sa buď celé, ich časti, ale aj extrakty z nich získané. Ich používanie bolo spočiatku založené na empirickom podklade. Postupom času ich používanie opustilo empirický rámeč a začali sa používať cielene, k liečeniu konkrétnych ochorení. K najstarším zachovaným dokladom o používaní liečivých rastlín patria sumerská hlinená doska z Nagpur, Ebersov papyrus zahŕňajúci záznamy s viac ako 800 liečivými rastlinami určenými k liečbe ochorení, dielo „De Materia Medica“ spísané „otcom farmakognózie“ – Dioscoridom, zahŕňajúce informácie aj o rastlinách s obsahom alkaloidov, či dielo Plínia staršieho „Historia naturalis“, v ktorom popísal približne 1000 liečivých rastlín. Neutíchajúci a trvalý záujem ľudí o liečivé rastliny viedol k poznatkom, že rastliny neliečia celé, ale nositeľmi účinku sú ich obsahové látky [2].

Jedným zo značne využívaných zdrojov obsahových látok, vyznačujúcich sa širokým spektrom biologických účinkov, je čeľaď Amaryllidaceae, obsahujúca charakteristickú skupinu alkaloidov, známych ako Amaryllidaceae alkaloidy (AmA), ktoré sa vyskytujú skrze celú čeľaď, vo všetkých jej rodoch. Ich prvé terapeutické použitie sa datuje do obdobia 4. storočia p. n. l., k liečbe nádoru v oblasti maternice [3,4]. Alkaloidy sú definované ako prírodné organické látky bazickej povahy, obsahujúce heterocyklicky viazaný dusík, majúce výrazné, zvyčajne špecifické účinky. Jedná sa o sekundárne metabolity, ktoré sú biosyntetizované z prekursorov pochádzajúcich z primárneho metabolizmu rastlín – aminokyselín. Vyskytujú sa vo vyšších dvojkličnolistových a jednokličnolistových rastlinách, avšak ich výskyt bol potvrdený aj u niektorých druhov výtrusných rastlín – papraďorastov a plavúňorastov a taktiež aj u niektorých živočíchov. Doposiaľ boli alkaloidy nájdené vo viac než 4000 rastlinných druhoch a odhaduje sa, že asi 10 – 20 % všetkých rastlín obsahuje alkaloidy [5].

Alkaloidné extrakty rastlín tejto čeľade sú predmetom chemického výskumu takmer 200 rokov. V priebehu posledných troch desaťročí bolo mnoho týchto alkaloidov izolovaných a testovaných na rôzne biologické aktivity. Medzi známe aktivity poskytované týmito

alkaloidmi patrí antibakteriálna, antimikróbna, antifungálna, antimalarická, protizápalová, analgetická a v neposlednom rade aj inhibičná aktivita voči humánnym cholinesterázam a aktivita protinádorová [6,7].

Jedným z najzložitejších problémov dnešnej doby sú chronické neprenosné ochorenia, u ktorých sa predpokladá, že sú dôsledkom práve „moderného“ životného štýlu, spojeného so zvýšenou konzumáciou alkoholu, fajčením, fyzickou inaktivitou alebo dlhodobým a nadmerným stresom. Mimo ochorení aterosklerotickej etiológie, diabetu mellitu či obezity, sem patria neurodegeneratívne ochorenia ako je Alzheimerova choroba (AD) a onkologické ochorenia. Práve zhubné novotvary, sa podľa údajov zo zdravotníckej ročenky ČR v roku 2018, podieľali na štandardizovanej úmrtnosti s podielom 24,1 % u mužov a 21,9 % u žien [8].

Za účelom získať biologicky aktívne látky, ktoré by boli schopné vyššie uvedené ochorenia účinne liečiť, je mnoho z nich podrobovaných výskumu. Za týmto účelom sú podrobované testovaniu aj kultiváry (cv.) rastlín rodu *Narcissus* L., pričom do dnešného dňa bolo z rastlín tohoto rodu izolovaných viac než 100 alkaloidov rozličného štruktúrneho typu, poskytujúce široké spektrum biologických účinkov [9]. Jedným z najvýznamnejších AmA je alkaloid galantamín, ktorý sa dnes využíva ako selektívny, reverzibilný a kompetitívny inhibítor ľudskej acetylcholinesterázy (*hAChE*), k liečbe AD [9,10].

Nemenej známe sú aj alkaloidy ako narciklasín, hemantamín, či lykorín, ktorý vykazuje pomerne sľubné cytostatické účinky voči nádorovo transformovaným bunkám *in vitro* a jeho derivát pseudolykorín, ktorý bol navrhnutý ako prototyp pre ďalší výskum v liečbe metastázujúcich rakovinových buniek, rezistentných voči väčšine, v súčasnej dobe dostupných cytostatík [11,12].

2. Cieľ práce

Táto diplomová práca vychádza z výskumnej činnosti pracovnej skupiny ADINACO (Alzheimer Disesaes and Natural Compounds), ktorá prebieha na Katedre farmaceutickej botaniky Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Táto výskumná skupina sa zaoberá izoláciou obsahových látok vybraných alkaloidných rastlín a skúmaním ich inhibičnej aktivity voči humánnym cholinesterázam - *hAChE* a butyrylcholinesteráze (*hBuChE*).

Ciele diplomovej práce:

- spracovanie teoretickej časti k problematike alkaloidných rastlín zo zadaných taxonomických jednotiek čeľade Amaryllidaceae (výskyt, štruktúra, biologická aktivita, využitie a pod.),
- príprava sumárnych alkaloidných extraktov,
- GC-MS analýza jednotlivých sumárnych alkaloidných extraktov a vyhodnotenie získaných alkaloidných spektier,
- screeningové stanovenie inhibičnej aktivity sumárnych alkaloidných extraktov voči humánnym cholinesterázam (*hAChE* a *hBuChE*),
- stanovenie cytotoxickej aktivity *in vitro* (bunečnej viability) testovaných extraktov,
- vyhodnotenie výsledkov a spísanie práce.

3. Čeľad' Amaryllidaceae (Amarylkovit )

Čeľad' amarylkovit  je farmaceuticky významná  eľad', patriaca do rádu Amaryllidales. Medzi d'alsie významné čeľade patriace do tohto rádu sú napríklad čeľade Hyacinthaceae, Alliaceae  i Agavaceae [13].

3.1. Základná charakteristika rastlín z čeľade Amaryllidaceae

Rastlinné druhy čeľade Amaryllidaceae sa radia medzi jednokl i nolistov e krytosemenn e rastliny. Jedná sa o vytrvalé viacročné kvitnúce byliny. Stonky týchto rastlín sú pomerne často neolisten e a najčastejšie majú podobu stvolu. Listy sú striedavé, čiarkované a dvojradové, zriedka bývajú špirálovité.  epeľ listov je len zriedkavo rozšírená. Kvety sú obvykle obojpohlavné a majú spodný semenník [4,14]. U v  chiny druhov tejto čeľade sú kvety veľké a n padn e. Majú silnú vôňu a ich farba sa mení od žltej, oranžovej,  ervenej, ružovej po bielu a občas je možné nájsť aj modré sfarbenie kvetov [15]. Kvety vyrastajú samostatne alebo v skrutkovit ych  i hroznovit ych kvetenstv ach. Kvetn e obaly sú charakteristické tým, že sú nerozlišen e a usporiadané v dvoch kruhoch. Z okvetných lístkov niekedy nápadne vystupuje pakorunka, ako je tomu napríklad u niektorých druhov rodu *Narcissus* L. Plodom týchto rastlín je tobolka alebo bobuľa [13,14]. Čeľad' sa pôvodne vyvinula v Afrike a neskôr bola rozptýlená aj na iné kontinenty ako Európu,  ziu, Ameriku  i Austráliu. Typickými miestami výskytu rastlinných druhov tejto čeľade sú tropické a subtropické oblasti Južnej Afriky (hlavne Kapsk a oblasť) a Južnej Ameriky a zároveň bývajú hojne pestované k okrasn ym účelom [4,15].

T to  eľad' zahrňuje najmenej 1100 druhov rastlín (väčšina z nich býva často kultivovaná), zaradených do 85 rodov. K najznámejším rodom patria: *Amaryllis* L. (amarylka), *Clivia* L. (kl ivia), *Crinum* L. (krinum), *Narcissus* L. (narcis), *Galanthus* L. (sne ienka) a *Leucojum* L. (bleduľa) (Obrázok 1) [6,13]. Niektorých zástupcov z vyššie uvedených rodov, ako napríklad narcisy, bledule alebo sne ienky je možné nájsť voľne v prírode aj v  eskej republike. Rastliny tejto čeľade boli vyu ivan e v ľudovej medicíne po storočia kvôli ich terapeutickým vlastnostiam.  eľadi je v poslednej dobe venovaný stále narastajúci záujem vedeckých pracovníkov. Príčinou tohto záujmu je biologicky významná skupina alkaloidov (AmA). Tieto alkaloidy sú predmetom chemického výskumu už takmer 200 rokov [4,6].



Obrázok 1 – Prehľad rodov čeľade Amaryllidaceae [17,18,19,20,21,22]

3.2. Botanický popis rodu *Narcissus* L.

Rastliny rodu *Narcissus* L. sú jedny z najvýznamnejších, značne pestovaných záhradných rastlín s veľkým množstvom druhov, hybridov a variet. Rod *Narcissus* L. zahŕňa približne 80 – 100 voľne sa vyskytujúcich druhov, ktoré sa nachádzajú hlavne v oblastiach juhozápadnej Európy a severnej Afriky. Pôvodnými stanoviskami ich výskytu sú nížinné oblasti, trávnaté porasty, brehy riek, lesy, ale aj horské oblasti [9,23].

Jedná sa o odolné, viacročné, jednodomé cibulovité rastliny. Podzemnou časťou týchto rastlín je cibuľa bledohnedej farby, dosahujúca veľkosti v rozmedzí od 0,6 cm do 10 cm, pričom každý rok sa okolo materskej cibule vytvárajú nové cibule dorastaním ich sukníc. Prostredníctvom cibule narcisy prezimujú a na jar kvitnú. Dorastajú do výšky až 60 cm. Krátko po rozkvetu listy rýchlo starnú a nasleduje letné, tzv. „spiace“ obdobie. Pár druhov, ako napríklad *Narcissus elegans* (Haw.) Spach, *Narcissus serotinus* L. alebo *Narcissus humilis* (Cav.) Traub, kvitnú v jeseni [23,24,25,26,27].

Stonka má podobu dutého stvolu, je sploštená a neolistená. Listy narcisov sú matné, majúce súbežnú žilnatinu, udržiavajú si rovnakú šírku po celej svojej dĺžke a na svojom konci

bývajú zašpicatené. Väčšina druhov nesie na svojej stonke 2 – 4 listy, ale vyskytujú sa aj viaclisté, v počte 7 – 8 listov [23,27].

Obojpohlavné kvety dosahujú veľkosti od 12 do 125 mm a vyrastajú buď to samostatne alebo v kvetenstvách. Okvetie tvorí koruna skladajúca sa zo šiestich okvetných lístkov, ktoré sú v dvoch praslnoch a sú zrastené do okvetnej trúbky (pakorunka) rôznych tvarov (disk, trúbka, pohár alebo lievik) a farieb. Farba kvetov je väčšinou biela, svetložltá, tmavožltá, marhuľová alebo oranžová. Okvetné lístky môžu mať farbu totožnú s farbou pakorunky alebo ich sfarbenie môže byť odlišné. Farebnú výnimku tvorí *Narcissus viridiflorus* Schousb., ktorý kvitne v noci a má výrazne voňajúce kvety zeleného sfarbenia [23,24].

Narcisy sa rozdeľujú do trinástich divízií, na základe počtu kvetov nachádzajúcich sa na stonke a na základe odlišných pomerov vo veľkosti a tvare okvetia a pakorunky. Na tomto princípe sa rozlišujú narcisy trúbkovité, veľkokorunné, krátkokorunné, plnokveté a pod. Rod *Narcissus* L. obsahuje viac ako 100 alkaloidov, ktoré sú známe svojimi rôznymi farmaceutickými vlastnosťami [9,28].

Väčšina druhov rodu *Narcissus* L. je schopná ľahko hybridizovať, čoho výsledkom sa stalo veľké množstvo dnes existujúcich kultivárov. Hybridizácia viedla k vzniku komerčných kultivárov, ktoré sú častokrát mohutnejšie a robustnejšie, než divoko sa vyskytujúce druhy. Podľa niektorých autorov história hybridizácie siaha až do obdobia 17. storočia a s postupom času sa stala táto metóda čoraz populárnejšia. Momentálne je v medzinárodnom registri narcisov zaevidovaných viac než 27 000 názvov kultivárov rodu *Narcissus* L. [9,23].

3.2.1. Taxonomická klasifikácia rodu *Narcissus*

RÍŠA (REGNUM)	Plantae	Rastliny
PODRÍŠA (PHYLUM)	Tracheophyta	Cievnaté rastliny
ODDELENIE (DIVISIO)	Magnoliophyta	Krytosemenné rastliny
TRIEDA (CLASSIS)	Liliopsida	Jednoklíčnolistové
RÁD (ORDO)	Asparagales	Asparágotvaré
ČEĽAĎ (FAMILIA)	Amaryllidaceae	Amarylkovité
PODČEĽAĎ (SUBFAMILIA)	Amaryllidoideae	Amarylkové
ROD (GENUS)	<i>Narcissus</i> L.	Narcis [13,29]

3.3. Botanický popis kultivárov použitých v experimentálnej časti

Jedným z cieľov experimentálnej časti tejto diplomovej práce bola príprava sumárnych extraktov z piatich kultivárov a jednej variety druhov rodu *Narcissus* L. Menovito sa jedná o kultiváry *Narcissus* cv. Acropolis (Obrázok 2), *Narcissus* cv. Delta (Obrázok 3), *Narcissus* cv. White Marvel (Obrázok 4), *Narcissus* cv. Kedron (Obrázok 5), *Narcissus* cv. Scarlet Gem (Obrázok 6) a varietu *Narcissus albus* var. *plenus odoratus* (Obrázok 7).

3.3.1. *Narcissus* cv. Acropolis

Za hybridizátora tohto kultiváru je považovaný J. Lionel Richardson a je registrovaný od roku 1955. Tento kultivár vznikol hybridizáciou kultivárov *Narcissus* cv. Falaise a *Narcissus* cv. Limerick. Jedná sa o kultivár patriaci do divízie plnokvetých narcisov. Dorastá do výšky až 67,5 cm. Veľkosť kvetov dosahuje 11 cm. Je charakterizovaný krémovo bielym okvetím (okvetné lístky sú uložené v niekoľkých závitniciach a navzájom sa prekrývajú z viac ako polovice) a segmenty stredovej časti sú oranžového sfarbenia, so zeleno-žltým sfarbením na bázi [30].



Obrázok 2 – *Narcissus* cv. Acropolis [31]

3.3.2. *Narcissus* cv. Delta

Jedná sa o kultivár patriaci do divízie narcisov s členenou pakorunkou. Za hybridizátora tohto kultiváru sa považuje W. F. Leenen a je zaregistrovaný od roku 1983. K hybridizácii bol využitý kultivár *Narcissus* cv. Nippon. V dospelosti dorastá do výšky 45 cm. Hlboko členená šesťhranná pakorunka je oranžovožltej farby s charakteristickým bielym olemovaním. Okvetie je krémovo bielej farby [32,33].



Obrázok 3 – *Narcissus* cv. Delta [34]

3.3.3. *Narcissus* cv. White Marvel

Dlho kvitnúci kultivár, patriaci do divízie plnokvetých narcisov. Bol registrovaný pred rokom 1950 a k hybridizácii bol využitý kultivár *Narcissus* cv. Tresamble sport. Dorastá do výšky 40 cm, kvety dosahujú šírky až 87 mm. Na jednom stvole sa nachádzajú 2 – 4 kvety, charakterizované bielym okvetím [35,36].



Obrázok 4 – *Narcissus* cv. White Marvel [37]

3.3.4. *Narcissus* cv. Kedron

Jedná sa o kultivár patriaci do divízie Jonquilla narcisy. Za hybridizátora kultiváru sa považuje H. Willis a je registrovaný od roku 1974. K hybridizácii bol využitý druh *Narcissus*

jonquilla L. a kultivár *Narcissus* cv. *Apricot Distinction*. Dorastá do výšky menej ako 32,5 cm. Je charakterizovaný sladko voňajúcimi kvetmi, dosahujúcimi šírky 70 mm. Jeden stvol nesie obvykle 2 kvety bronzovo žltej farby s oranžovými pohárikmi [38].



Obrázok 5 – *Narcissus* cv. *Kedron* [39]

3.3.5. *Narcissus* cv. *Scarlet Gem*

Kultivár patriaci do divízie *Tazetta* narcisy. Za hybridizátora kultiváru sa považuje Percival D. Williams. Dosahuje výšky 40 cm. Stvol nesie 4 – 6 kvetov, charakterizovaných okvetím sivo žltej farby s pakorunkou červenej farby [40,41].



Obrázok 6 – *Narcissus* cv. *Scarlet Gem* [42]

3.3.6. *Narcissus albus* var. *plenus odoratus*

Varieta patrí do divízie plnokvetých narcisov. Do kultivácie bola zavedená v roku 1861 a často je nazývaná aj „Double Pheasant’s Eye“ alebo zjednodušene *Narcissus plenus*. V dospelosti dosahuje výšky od 32 cm až do 67,5 cm. Kvitne v období neskoršej jari a je charakteristická silno voňajúcimi kvetmi. Segmenty okvetia sú snehovo bielej farby, uložené vo viac ako jednej závitnici a navzájom sa prekrývajú. Vonkajšie závitnice sa rozširujú a sú mierne ohnuté, vnútorné sa postupne skracujú a viac ohýbajú [43].



Obrázok 7 – *Narcissus albus* var. *plenus odoratus* [44]

3.4. Alkaloidy čeľade Amaryllidaceae

Rastliny čeľade Amaryllidaceae priťahujú značné množstvo pozornosti vďaka vysokému obsahu alkaloidov rozmanitej štruktúry a vďaka ich širokému spektru poskytovaných biologických aktivít. Prvým vyizolovaným alkaloidom bol lykorín, pričom izoláciu uskutočnil v roku 1877 A. W. Gerrard z druhu *Narcissus pseudonarcissus* L. [12]. Doposiaľ bolo izolovaných a štruktúrne popísaných viac ako 500 alkaloidov, ktoré sa vyskytujú samostatne alebo v skupinách skrze celú čeľad' Amaryllidaceae, z toho viac ako 100 v rode *Narcissus* L. [4,45]. Alkaloidy je možné nájsť v celej rastline, ale ich najvyššie množstvo sa nachádza v cibuliach. AmA predstavujú veľkú a stále sa rozvíjajúcu skupinu izochinolínových alkaloidov, z ktorých väčšina sa nevyskytuje v žiadnej inej čeľadi [6].

Práve vďaka vysokému obsahu alkaloidov boli rastliny rodu *Narcissus* L. využívané už v ľudovej medicíne. Prvé dokumentované lekárske využitie sa datuje do doby pôsobenia Hippokrata z Kósu, ktorý už v 4. storočí pred Kristom použil extrakt z *Narcissus poeticus* L. na bázi olejovej emulzie k liečbe nádoru v oblasti maternice [4]. Cibule druhu *Narcissus tazetta* L. boli v minulosti využívané ako kontraceptíva a v Turecku boli značne využívané ako domáci prostriedok k liečbe abscesov vďaka ich antiflogistickým a analgetickým vlastnostiam. Zaujímavosťou je, že *Narcissus poeticus* L. bol zmieneny aj v Biblii, ako prostriedok k liečbe symptómov spájaných s rakovinou. Dnes je známe, že *Narcissus poeticus* L. obsahuje v čerstvých cibuliach 0,012 % alkaloidu narciklasínu, ktorý je známy svojimi antineoplastickými vlastnosťami [46,47].

3.4.1. Biosyntéza amarylkovitých alkaloidov – norbelladínová cesta

Na rozdiel od značného množstva dostupných informácií o farmaceutických vlastnostiach AmA, informácie o ich biosyntéze stále nie sú kompletne [48].

Biosyntetická cesta AmA vychádza z aminokyselín L-fenylalanínu (L-Phe) a L-tyrozínu (L-Tyr). Prostredníctvom enzýmu fenylalanínamónium lyáza (PAL) dochádza k oxidačnej deaminácii L-fenylalanínu, za vzniku kyseliny trans-škoricevej, ktorá je pôsobením CYP73A1 (trans-cinamát-4 monooxygenáza) transformovaná na kyselinu *p*-kumárovú. Tá je následne prostredníctvom oxidoreduktázy CYP98A3 premenená na kyselinu kávovú alebo 4-hydroxybenzaldehyd. Kyselina kávová je transformovaná prostredníctvom homológu vanillin syntázy (*Vp*VAN) na 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA). Aminokyselina L-tyrozín je dekarboxylovaná na tyramín pomocou enzýmu tyrozín dekarboxyláza (TYDC). Kondenzáciou 3,4-DHBA a tyramínu dochádza k vzniku Schiffovej báze. Túto kondenzáciu

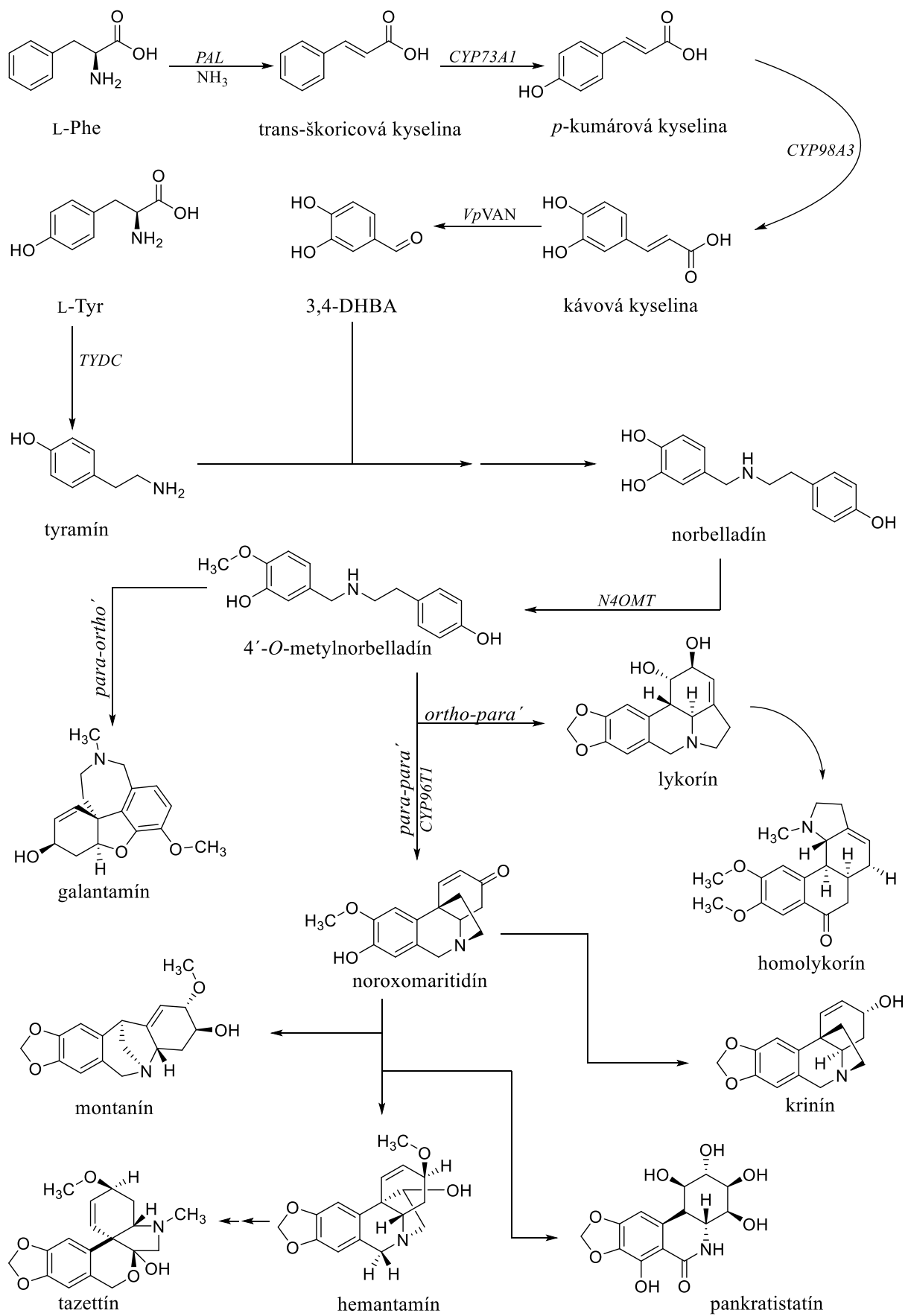
katalyzuje enzým NBS (norbelladín syntáza). Shiffova báza je následne transformovaná, pomocou neznámej reductázy na norbelladín, ktorý je prostredníctvom enzýmu norbelladín 4'-*O*-metyltransferáza (N4OMT) metylovaný za vzniku kľúčového medziproduktu biosyntézy AmA, 4'-*O*-metylnorbelladínu [6,49,50,51].

U tohto kľúčového medziproduktu dochádza k cyklizácii pomocou intramolekulárnej oxidácie fenol-fenol ('phenol oxidative coupling') za vzniku väzby C-C. Poznáme tri typy tohto oxidačného spojenia, a to typ *para-ortho'*, *ortho-para'* a *para-para'*, ktoré vedú k tvorbe rozličných štruktúrnych typov AmA. Spojenie *para-para'* je katalyzované enzýmom CYP96T1 (noroxomaritidín syntáza) a vedie k vzniku alkaloidov hemantamínového, krinínového, pankratistatínového, tazettínového a montanínového štruktúrneho typu. Intramolekulárna cyklizácia typu *ortho-para'* vedie k syntéze lykorínových a homolykorínových alkaloidov a *para-ortho'* spojenie k alkaloidom galantamínového typu [6,49,50,51]. (Obrázok 8).

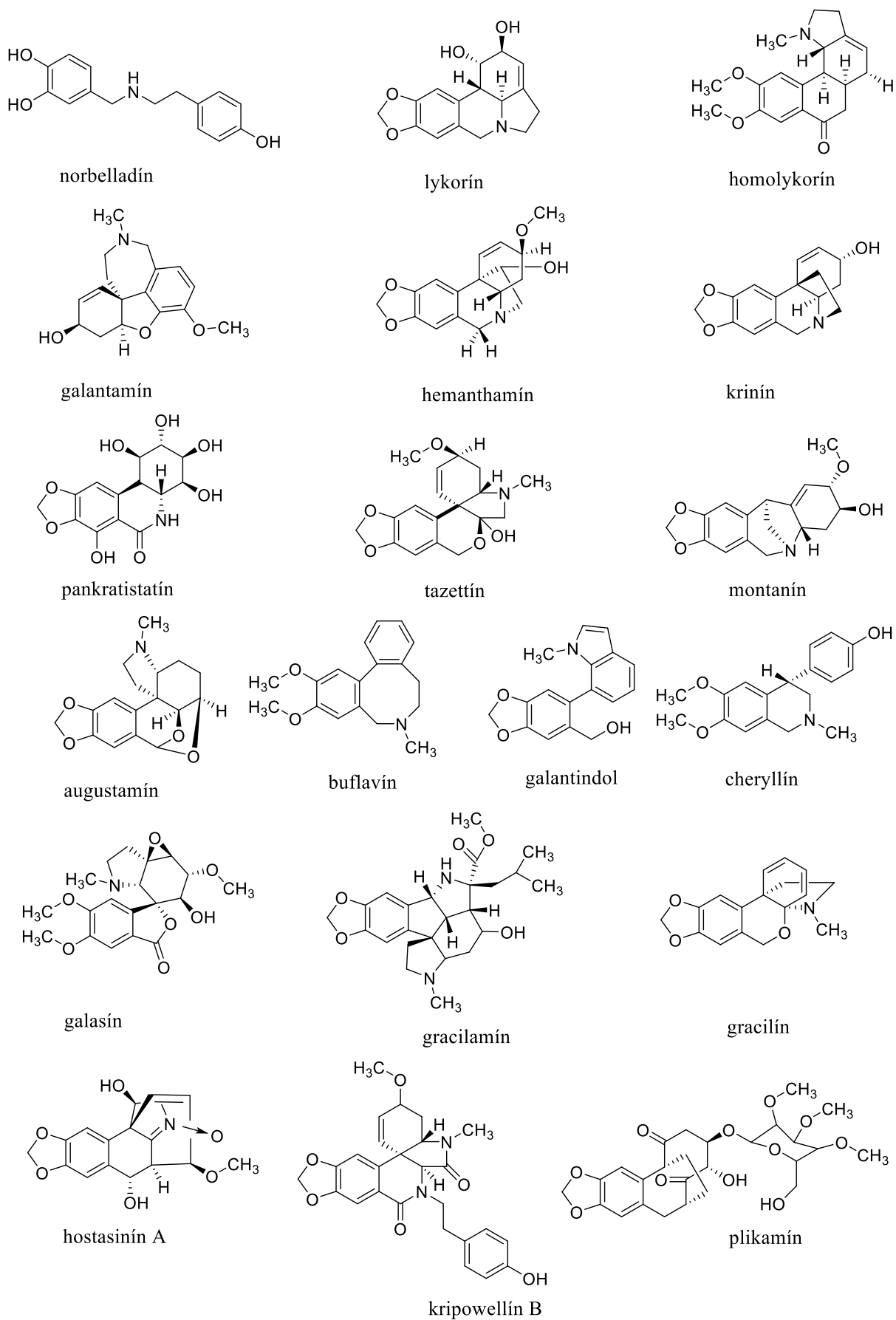
Ako vyplýva z predchádzajúceho textu, môžeme AmA rozdeliť do deviatich základných štruktúrnych skupín, vymenovaných podľa typického zástupcu: belladínový/norbelladínový, lykorínový, homolykorínový, galantamínový, hemantamínový, krinínový, pankratistatínový, tazettínový a montanínový štruktúrny typ [4,47]. (Obrázok 9).

K ďalším štruktúrnym typom, vymenovaných podľa typického zástupcu, patria: augustamínový, buflavínový, galantindolový, galasínový, gracilamínový, gracilínový, hostasinínový, cheryllínový, kripowellínový a plikamínový štruktúrny typ [15,49]. Jedná sa o štruktúrne typy alkaloidov, ktoré bývajú zastúpené jednou až štyrmi zlúčeninami u každého typu, boli izolované v minoritných množstvách a nájdené v jednom rastlinnom rode alebo druhu [49]. (Obrázok 9).

Špecifickým typom sú alkaloidy mesembránového štruktúrneho typu, doposiaľ izolované z dvoch druhov narcisov *Narcissus pallidus* Poir. a *Narcissus triandrus* L. [52]. Hlavným zdrojom ich výskytu je rod *Sceletium* L. (Aizoaceae) a hlavnými zástupcami sú mesembrín a mesemrenon [53,54].



Obrázok 8 – Norbelladínová biosyntetická cesta [6,49,50,51]



Obrázok 9 – Štruktúrne typy amarylkovitých alkaloidov [6,49,50,51,54]

3.4.2. Biologická aktivita amarylkovitých alkaloidov

Ako už bolo naznačené v úvode tejto práce, AmA sú známe predovšetkým širokým spektrom biologických aktivít, ktoré poskytujú. K najvýznamnejším aktivitám patrí schopnosť inhibovať aktivitu fyziologicky významných enzýmov ako je *hAChE*, čoho sa využíva v terapii AD, antibakteriálna, antivirotická aktivita a protinádorová aktivita [4].

3.4.2.1. Lykorínový štruktúrny typ

Alkaloidy lykorínového štruktúrneho typu boli nájdené takmer vo všetkých rodoch čeľade Amaryllidaceae, ako napríklad *Ammocharis* Herb., *Boophone* Herb., *Brunsvigia* Heist., *Crinum* L., *Galanthus* L., *Haemanthus* L., *Hippeastrum* Herb., *Hymenocallis* Salisb., *Leucojum* L., *Lycoris* L., *Narcissus* L., *Sternbergia* Waldst. & Kit. alebo *Zephyranthes* Herb. [55]. Jedná sa o alkaloidy patriace medzi deriváty pyrrolo[*de*]fenantridínu a vznikajú *ortho-para'* intramolekulárnym oxidačným spojením 4'-*O*-metylnorbellađínu [6]. Hlavným zástupcom tejto skupiny je alkaloid lykorín, nazývaný aj galantidín alebo amaryllín. Izolovaný bol A. W. Gerrardom v roku 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* L., a jeho štruktúra bola podrobnejšie popísaná Nagakawom a spol. v roku 1956. Zároveň sa jedná o úplne prvý vyizolovaný alkaloid z čeľade Amaryllidaceae, pričom doposiaľ bolo popísaných celkovo 119 alkaloidov tohto štruktúrneho typu [4,6,49,55].

Tieto alkaloidy vykazujú široké spektrum biologických aktivít. Z hľadiska cytotoxicity patria alkaloidy tejto skupiny k jedným z najúčinnjších AmA. Lykorín bol prvou identifikovanou zlúčeninou s cytostatickými účinkami z čeľade Amaryllidaceae [4,55]. Indukciou apoptózy a prostredníctvom mitochondriálnych dráh vykazuje antiproliferatívny účinok už v mikromolárnych množstvách voči väčšine multidrug rezistentných nádorovo transformovaných buniek a buniek rezistentných voči apoptóze. Redukciou expresie VE-kadherínu, vykazuje lykorín antiangiogénnu aktivitu a výrazné inhibičné účinky voči DNA topoizomeráze I, ktorá je nutná pre rast rakovinových buniek [55]. Napriek tomu, že AmA sú známe schopnosťou inhibovať *hAChE*, lykorín nevykazuje takmer žiadnu alebo veľmi slabú inhibičnú aktivitu voči *hAChE* ($IC_{50} = 213 \pm 1 \mu M$) [56].

Aj napriek veľmi slabému inhibičnému účinku lykorínu voči *hAChE*, je tento alkaloid účinný proti celej rade vírusov ako je poliovírus, vírus pravých kiahní a SARS-asociovaný koronavírus [4]. Vykazuje antimykotickú aktivitu voči kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*, má fatálny vplyv na život parazitujúceho prvoka *Trypanosoma brucei*, vykazuje antiprotozoálnu aktivitu voči anaerobnému parazitujúcemu prvoku *Trichomonas vaginalis*,

spôsobujúcemu sexuálne prenosné ochorenie trichomoniádu. Je aktívny proti parazitom *Entamoeba histolytica*, *Tribolium castaneum* a *Aphys gossypii* [4,55]. Podrobený štúdiu s využitím bunecných kultúr cholorichín citlivých (T9.96) a chlorochín rezistentných (K₁) kmeňov *Plasmodium falciparum*, vykazoval lykorín na dávke závislú antimalarickú aktivitu v štyroch testovaných dávkach (0,04; 0,2; 1,0 a 5,0 µg/ml) s hodnotami IC₅₀ = 1,026 (T9.96) a 0,379 (K₁) µg/ml [55,57].

Pri testovaní na rozličných zvieracích modeloch vykazuje lykorín pomerne dobrý antiartritický potenciál, účinne redukuje toxicitu zápalového faktoru kalprotektínu, ktorý vedie k rozvoju zápalu a následnému poškodeniu tkaniva pri závažných zápalových ochoreniach a blokuje lipopolysacharidmi indukovanú tvorbu zápalových mediátorov a lipopolysacharidmi indukovanú úmrtnosť u myši [55,58]. K ďalším aktivitám patrí aj hepatoprotektívna, imunopresívna, antioxidantná a analgetická [55]. K alkaloidom lykorínového štruktúrneho typu patria aj ďalšie alkaloidy podobnej štruktúry, pričom najvýznamnejšie z nich sú karanín, pseudolykorín, anhydrolykorín, 1,2-epoxylykorín, 1-*O*-acetyllykorín, lykorín-2-on, goleptín, jonquillín, pluvín, norpluvín, galantín a amarbellisín. Práve amarbellisín a pseudolykorín vykazujú podľa niektorých štúdií veľmi dobrú protinádorovú aktivitu, s hodnotou IC₅₀ < 10 µM, počas 72 hodín dlhého pôsobenia na bunky nádorových línií [4,49]. Amarbellisín vykazuje taktiež sľubnú aktivitu voči gram negatívnemu patogénu *Escherichia coli* a kvasinke *Candida albicans* [59].

3.4.2.2. Homolykorínový štruktúrny typ

Jedná sa o alkaloidy štruktúrne odvodené od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu a vznikajú *ortho-para'* intramolekulárnym oxidačným spojením. Súčasťou tejto štruktúrnej skupiny je veľké množstvo alkaloidov (približne 80), ale iba niektoré vykazujú sľubnú biologickú aktivitu [4,6]. K pomerne známym aktivitám patrí inhibícia rastu nádorovo transformovaných buniek ľudského karcinómu pečene HepG2, leukemických buniek MOLT-4 a buniek rakoviny prostaty LNCaP, za ktorú sú zodpovedné alkaloidy homolykorín, 8-*O*-dimethylhomolykorín, lykorenín, hippeastrín a duvoisín. Nevýhodou je, že tieto alkaloidy vykazujú cytotoxický účinok aj voči zdravým bunkám myšich fibroblastov LMTK. Duvoisín, lykorenín a 8-*O*-dimethylhomolykorín vykazujú schopnosť viazať sa na molekulu DNA porovnateľnú s vinblastínom. Alkaloid hippeastrín vykazuje, mimo vyššie spomínaných aktivít, aj antivírusovú aktivitu proti *Herpes simplex* vírusu typu 1 a antimykotickú aktivitu voči kvasinke *Candida albicans* [4,60]. U normotenzných potkanov bol preukázaný hypotenzívny účinok na arteriálny tlak krvi navodený alkaloidmi duvoisínom, homolykorínom,

lykorenínom a 8-*O*-dimethylhomolykorenínom. Lykorenín spôsobuje v kardiovaskulárnom systéme vazodepresívny účinok a modifikáciou vagovej aktivity navodzuje bradykardiu. Mimo iného vykazuje aj analgetický účinok [60].

3.4.2.3. Galantamínový štruktúrny typ

Alkaloidy tohto štruktúrneho typu sú tvorené *para-ortho* intramolekulárnym oxidačným spojením 4'-*O*-metylnorbellaínu a základ ich štruktúry tvorí dibenzofuran [60]. Z medicínskeho hľadiska je najvýznamnejším alkaloidom galantamín, ktorý bol po prvýkrát izolovaný zo snežienky *Galanthus woronowii* Losinsk. Fyziologicky podstatná aktivita galantamínu bola neočakávane objavená bulharskými farmakológmi na začiatku 50. rokov 20. storočia a od tejto doby bol využívaný k terapii rozličných neurologických ochorení ako myastenia gravis, k liečbe detskej obrny, alebo rôznych typov demencie [4,49]. Jedná sa o dlhodobý, selektívny, reverzibilný a kompetitívny inhibítor cholinesteráz, pričom vykazuje až 53-krát vyššiu selektivitu k *hAChE* než k *hBuChE* [4,10]. Zároveň ovplyvňuje pre- a post-synaptické nikotínové receptory, kedy prostredníctvom zvýšenia uvoľnenia neurotransmitterov dochádza k stimulácii neuronálnych funkcií. Mechanizmus inhibície *hAChE* je využívaný v symptomatickej terapii AD, pričom bolo preukázané, že terapia AD galantamínom vedie k zlepšeniu kognitívnych, funkčných a behaviorálnych symptómov [4,60]. K ďalším farmakologickým účinkom patrí obnova neuromuskulárneho transferu, v kardiovaskulárnom systéme spôsobuje bradykardiu alebo poruchy atrioventrikulárneho prevodu, je využívaný ako reverzné činidlo v anestézii, bol patentovaný k liečbe závislosti na nikotíne, pôsobí ako mierne analeptikum, vykazuje analgetický účinok zrovnateľný s morfínom a aplikovaný vo forme očných kvapiek znižuje vnútroočný tlak [60]. Ďalšími alkaloidmi tohto štruktúrneho typu sú chlidantín, habrantín, lykoramín, lykoraminon, narcisín, narwedín, sanguinín. Práve sanguinín vykazuje 10-krát vyššiu inhibičnú aktivitu a selektivitu k *hAChE* než galantamín. Biogenetický prekurzor galantamínu, narwedín, zvyšuje amplitúdu a znižuje frekvenciu srdečných kontrakcií, znižuje účinok narkotík a hypnotík a zvyšuje analgetický účinok morfinu a ďalších látok ako nikotínu či kofeínu [4,49,60].

3.4.2.4. Hemantamínový a krinínový štruktúrny typ

Podľa niekoľkých autorov sú alkaloidy týchto dvoch štruktúrnych skupín, líšiac sa priestorovou orientáciou etánového mostíka, súhrnne označované ako alkaloidy krinanového štruktúrneho typu, pričom alkaloidy hemantamínového typu sú označované ako alkaloidy β -krinanového typu a alkaloidy krininového štruktúrneho typu ako alkaloidy α -krinanového typu. Základ ich štruktúry je tvorený 5,10b-etanofenantridínom a rozdiel v tomto priestorovom

usporiadaní zohráva zároveň dôležitú úlohu v ich cytotoxickú aktivite [6,49,61]. Schopnosťou inhibovať rast rôznych typov nádorovo transformovaných buniek sa vyznačujú alkaloidy hemantamín, hemantidín, krinamín, maritidín a papyramín, ktoré patria k hlavným zástupcom týchto dvoch skupín. Z pohľadu cytotoxickú aktivity voči nádorovým bunkám patria k najvýznamnejším hemantamín, hemantidín a krinamín [4]. Alkaloid hemantidín pôsobí *in vitro* voči vnútrobunkovým parazitom *Trypanosoma brucei rhodesiense* a v menšej miere voči *Trypanosoma cruzi*. Ďalej vykazuje silnejšiu analgetickú a antiflogistickú aktivitu než aspirín (kyselina acetylsalicylová) [60]. Spolu s hemantamínom vykazujú antimalarickú aktivitu voči kmeňom chlorochín senzitivného prvoka *Plasmodium falciparum* [60]. Alkaloid krinamín vykazuje miernu antimalarickú aktivitu, pomerne silnú aktivitu voči gram-pozitívnym patogénom, ako napríklad *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. Ďalej bola preukázaná jeho schopnosť inhibovať produkciu oxidu dusnatého. Vittatín je známy svojou antibakteriálnou aktivitou voči gram-negatívnej tyčinke *E. coli* a gram-pozitívnemu koku *Staphylococcus aureus*. Ďalej je tiež známy svojou schopnosťou potencovať analgetický účinok morfínu. Niektoré alkaloidy tejto skupiny, ako papyramín a hemantamín majú hypotenzívny účinok [4,57,60]. U hemantamínu a jeho semisyntetických derivátov bola zároveň preukázaná silná *in vitro* antiretrovirotická aktivita voči vírusu influenzy A H5N1 s hodnotou $EC_{50} = 6,7 \mu\text{M}$ [59]. K ďalším známym alkaloidom patria napríklad makowín, powelín, narcidín či elwesín [49].

3.4.2.5. Pankratistatínový štruktúrny typ

Štruktúra pankratistatínových alkaloidov je odvodená od molekuly fenantridínu. K najvýznamnejším, z pohľadu biologickej aktivity, patrí narciklasín a pankratistatín. Narciklasín bol prvýkrát izolovaný z cibúľ rodu *Narcissus* L. v roku 1967 G. Ceriottim a 10 rokov po jeho objave Carrasco a kol. poskytol prvý dôkaz o protirakovinovej účinnosti tohto alkaloidu, mechanizmom inhibície tvorby proteínov v králičích retikulocytoch [4,59]. Podrobením ďalším štúdiám bol zistený jeho antimitotický účinok spôsobený inhibíciou delenia buniek v M-fázi bunkového cyklu [4,60]. Ďalej je schopný viazať sa na veľkú ribozomálnu podjednotku 60S, kde inhibuje enzým peptidyltransferázu, čím bráni vzniku peptidovej väzby a inhibuje tak elongáciu novovznikajúcich proteínov, vytvára komplexy s molekulou DNA a inhibuje kalprotektínom indukovanú cytotoxicitu, vo viac než 10-násobne nižšej koncentrácii, než lykorín [4,60]. Je považovaný za najdôležitejší AmA s antineoplastickou aktivitou, nakoľko inhibuje rast ľudských adenokarcinómových buniek krčka maternice (HeLa), má antileukemické vlastnosti a je aktívny proti celej rade ďalších nádorových buniek.

K nemenej známym patrí jeho antibakteriálna aktivita voči gram-pozitívnej tyčinke *Corynebacterium fascians*, antifungálna aktivita voči kvasinke *Cryptococcus neoformans* a antivirotická aktivita proti RNA vírusom z čeľade Flaviviridae a Bunyaviridae [4,59,60]. V roku 2015 bol narciklasín podrobený štúdiu, kde bola vyšetrovaná jeho aktivita voči AD. Zo štúdie vyplynulo, že narciklasín znižoval produkciu amyloidov β ($A\beta$), znížením hladín amyloidných prekursorov *in vitro*. Extrakt obsahujúci narciklasín, získaný z *Lycoris x chejuensis* K.H.Tae & S.C.Ko, redukoval množstvo $A\beta$ a amyloidných plakov a vykazoval pozitívny účinok na kognitívne funkcie u myšieho modelu AD [62]. Štruktúrne blízky analóg narciklasínu, pankratistatín, bol prvýkrát izolovaný v roku 1984 z cibúľ havajskej ľalie *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. a prvé poznatky o jeho cytotoxickom pôsobení pochádzajú z roku 1993 [4]. Cytotoxická aktivita pankratistatínu bola študovaná na paneli 60 bunkových línií, obsahujúcich nádorovo transformované bunky z vaječníkov, pľúc, čreva, ľadvín, mozgu, melanómu a buniek akútnej myeloidnej leukémie. Behom štúdií bolo zistené, že vykazuje pomerne sľubnú protinádorovú aktivitu voči HeLa bunkám, celej rade leukemických buniek a ďalších rôznych typov nádorov [4,59].

K minoritne sa vyskytujúcim alkaloidom príbuzným pankratistatínu a narciklasínu v rastlinách patria: narciklasín-tetraacetát, *cis*-dihydronarciklasín, *trans*-dihydronarciklasín, C10b-R-hydroxypankratistatín a ismín, vykazujúci cytotoxický účinok voči nádorovým bunkám MOLT-4, a alkaloid trisferidín, ktorý sa vyznačuje antiretrovirotickou aktivitou. Izoláciu týchto látok a následné biologické testovanie sťažuje ich nízky obsah v prírodných rastlinných zdrojoch [4,60].

3.4.2.6. Tazettínový štruktúrny typ

Do tejto štruktúrnej skupiny patria deriváty odvodené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu, nachádzajúce sa predovšetkým v rodoch *Narcissus* L., *Galanthus* L., *Lycoris* L., *Crinum* L., *Hippeastrum* L. a *Lapiedra* Lag. K hlavným zástupcom patria alkaloidy tazettín a jeho biosyntetický prekursor pretazettín [4,49]. Z pohľadu biologickej aktivity je menej významný tazettín, ktorý vykazuje pomerne slabú cytotoxickú aktivitu, antimalarickú aktivitu a má slabý hypotenzívny účinok. Významnejší je pretazettín, vďaka svojej antivírusovej a hlavne cytotoxickej aktivite. V prípade premeny pretazettínu na tazettín dochádza k pomerne značnej strate jeho biologickej aktivity [60]. Pretazettín patrí k najaktívnejším alkaloidom účinným voči bunkám MOLT-4, inhibuje rast HeLa buniek a je účinný voči rôznym typom leukémie (Rauscher leukémia, spontánna AKR lymfocytárna leukémia) a karcinómov (Lewisov karcinóm, Ehrlich ascites karcinóm). Vykazuje dobrú antivirotickú aktivitu voči vybraným

flavivírusom (horúčka dengue, žltá horúčka, japonská encefalitída), bunyavírusom (horúčka Punta Toro a horúčka Rift Valley) v orgánových kultúrach a voči vírusu *Herpes simplex* typu I, mechanizmom inhibície syntézy proteínov v priebehu ich replikácie [4,59,60].

3.4.2.7. Montanínový štruktúrny typ

Alkaloidy tejto štruktúrnej skupiny boli izolované z fylogeneticky odlišných rodov, ako je rod *Narcissus* L., *Lycoris* L., *Pancreatum* Dill.ex. L., *Hippeastrum* L. a *Haemanthus* L. Základný skelet je odvodený od molekuly 5,11-metanomorfantridínu. K pomerne významným zástupcom patria montanín, pankracín, nangustín, brunsvigín, alebo montabufín [6,49]. O alkaloidoch montanínového štruktúrneho typu je známe pomerne malé množstvo informácií, no významná je antibakteriálna aktivita pankracínu proti gram-pozitívnemu koku *Staphylococcus aureus*, gram-negatívnej tyčinke *Pseudomonas aeruginosa* a antiparazitická aktivita voči endoparazitickým prvokom *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi* a *Plasmodium falciparum* [60].

3.5. Alzheimerova choroba

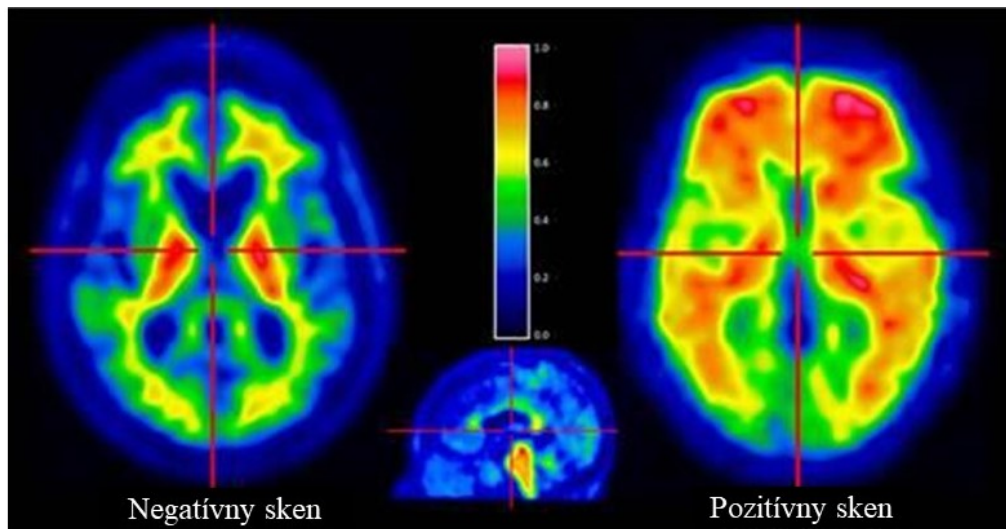
AD bola prvýkrát popísaná v roku 1907 nemeckým lekárom Aloisom Alzheimerom. Jedná sa o závažné, ireverzibilné, progredujúce, neurodegeneratívne ochorenie mozgu, ktorého podkladom je kortikálna degenerácia. Neuróny nachádzajúce sa v tejto oblasti sú narušené alebo zničené a dochádza tak k postupnému ubúdaniu mozgovej hmoty, s maximom zmien v okcipitálnych a frontálnych lalokoch. Klinicky je toto ochorenie manifestované syndrómom demencie, čo znamená, že dochádza k poruchám pamäte, myslenia, chápania reči, strate orientácie a poruche ďalších kognitívnych funkcií. Najčastejšou príčinou demencie je práve AD (62 %). K ďalším typom demencie patria vaskulárna demencia (17 %), vznikajúca na základe mozgových infarktov, Parkinsonova choroba (5 %) alebo demencia zmiešanej genézy (10 %) [63,64].

Podľa Českej alzheimerovskej spoločnosti v roku 2015 trpelo celosvetovo AD 46,8 milióna ľudí, pričom ich počet v ČR presahoval 156 tisíc, z čoho viac ako dve tretiny chorých tvorili ženy. S postupne sa zvyšujúcou hranicou starnutia populácie dochádza aj k zvyšovaniu počtu pacientov trpiacich AD, nakoľko s narastajúcim vekom sa zvyšuje riziko vzniku demencie [63]. Na základe meta-analýzy prevádzanej v roku 2017 sa predpokladá, že do roku 2050 bude počet pacientov trpiacich demenciou v ČR 383 tisíc a celosvetovo 106,8 miliónov, s počtom 16,51 milióna pacientov trpiacich AD v Európe [65].

Známe sú dve formy AD. Familiárna (vrodená), ktorá postihuje pacientov v nižšom veku, (hlavne okolo 50. roku života a skôr) a je pomerne vzácna. Druhou formou je sporadická (občasná) forma AD, objavujúca sa v seniorskom veku, nad 65 rokov a tvorí 80 % všetkých prípadov. K rizikovým faktorom zvyšujúcim šancu vzniku AD patria starnutie, dedičnosť, ženské pohlavie, nezdravý životný štýl, dlhodobý stres, prekonané ochorenia alebo úrazy mozgu, depresia [66].

V súčasnej dobe je možné klasifikovať niekoľko základných štádií AD, na základe rozsahu znehodnotenia nervových buniek v rozličných častiach mozgu, a to predklinické štádium, mierne štádium, stredne ťažké a ťažké štádium, pričom posledné 3 štádiá sú klinicky manifestovateľné. Predklinické štádium je charakterizovateľné merateľnými zmenami v mozgu, likvore a krvi (meranie prítomnosti bio markerov označovaných ako likvorový triplet alebo proteínová triáda), ale bez symptomatológie [66,67,68]. Predpokladaná doba prežitia po diagnostikovaní AD je približne 7 – 10 rokov, nakoľko dochádza k postupnému zhoršovaniu kognitívnych funkcií, ako je strata krátkodobej a v ťažších štádiách dlhodobej pamäte,

priestorová dezorientácia v neznámom, neskôr aj vlastnom prostredí, časová dezorientácia, postupné zhoršenie rečových schopností, behaviorálne poruchy (nepokoj, agresivita, halucinácie), strata schopnosti postarať sa sám o seba, vznik inkontinencie, porucha príjmu potravy a upútanie na lôžko. V dôsledku porušenia tých častí mozgu, ktorých úlohou je riadenie pohybu či prehĺtania, sa najfrekvencovanejšou príčinou úmrtia u pacientov trpiacich AD, stáva aspiračná pneumónia alebo rozličné úrazy [69].



Obrázok 10 – Pozitrónová emisná tomografia mozgu zdravého a chorého pacienta¹ [70]

Na multifaktoriálnej etiopatogenézii tohto ochorenia sa podieľa celá rada faktorov, ako napríklad kortikosubkortikálna atrofia, ku ktorej dochádza na základe neuronálneho a synaptického úbytku, extracelulárne hromadenie patologického proteínu A β , vo forme neuritických amyloidných plakov (Obrázok 10), vznikajúceho z amyloidného prekurzorového proteínu (APP), ktorý je za patologických okolností štiepený β - a γ -sekretázou, za vzniku nerozpustných fragmentov – A β 40 a A β 42, ktoré sú následne aglomerované do plakov. V ich tesnej blízkosti dochádza v dôsledku rozvoja zápalu a oxidatívneho stresu k strate neurónov a synapsií. Ďalej dochádza, vďaka zoskupovaniu extracelulárneho proteínu A β , k ukladaniu τ -proteínu, ktorý je hyperfosforylovaný prostredníctvom enzýmu glykogénsyntáza kináza 3 β (GSK-3 β) a cyklín-dependentná kináza 5 (CDK5), vo forme nerozpustných neurofibrilárnych uzlíkov, čím dochádza k blokovaniu transportu živín a ďalších esenciálnych molekúl vo vnútri neurónov. Jedná sa o štruktúry ukladané vo vnútri

¹ Zdravý pacient (vľavo). Pacient trpiaci na AD (vpravo). Teplé farby indikujú prítomnosť A β . Kontrast: Flutemetanol ¹⁸F [70].

neurónov, sú badateľné najpvi v oblasti hippocamu a následne môžu byť pozorované v mozgovej kôre [67,68,69,71].

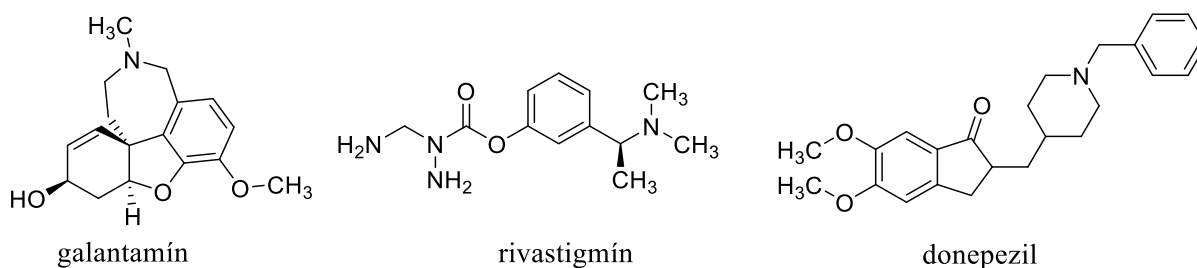
Už na počiatku AD je značne poškodený cholinergný systém, pričom dochádza k redukcii tvorby a uvoľnenia acetylcholínu (ACh) zo synaptickej štrbiny, k menšej tvorbe cholinacetyltransferázy, ktorá je nutná k syntéze ACh z acetyl-CoA a cholínu. Redukované je aj množstvo nikotínových receptorov, pričom množstvo muskarínových receptorov zostáva relatívne zachované [72]. ACh je metabolizovaný enzýmami acetylcholinesterázami, podieľajúcimi sa na jeho hydrolýze. Známe sú dve formy tohto enzýmu, a to G1 a G4 forma. U zdravého človeka značne prevláda G4 forma, zatiaľ čo u pacientov trpiacich AD dochádza k nárastu množstva G1 a redukcii G4 formy tohto enzýmu [72,73]. Pre neskoršie štádiá tohto ochorenia je charakteristická nadmerná tvorba *h*BuChE, pôsobiacej hlavne na periférii, ktorá sa taktiež podieľa na metabolizácii ACh a u zdravého človeka sa vyskytuje v minoritných množstvách [9]. V neskorších štádiách AD je poškodený aj glutamatergny systém, kde dochádza k prílišnému uvoľňovaniu a zníženiu spätného vychytávania excitačných aminokyselín – glutamátu a aspartátu, v oblastiach dôležitých pre pamäť, čo vedie k hyperexcitácii ich receptorov – *N*-metyl-D-aspartátových receptorov (NMDA). Do neurónov tak vstupuje nadmerné množstvo vápenatých iónov, čo vedie k zvýšenej expresii niektorých génov a aktivácii proteínkináz, zodpovedajúcich za zmenu štruktúry proteínov, v dôsledku čoho sa zvyšuje excitotoxicita a dochádza k apoptóze neurónov. V stredných a ťažkých štádiách AD, preto dochádza k poškodeniu procesu dlhodobej potenciácie, ktorá je realizovaná práve prostredníctvom NMDA receptorov [72,73].

K ďalším možným mechanizmom prispievajúcim k rozvoju AD patrí poškodenie mitochondriálneho metabolizmu, u ktorého sa predpokladá, že súvisí s rozvojom neurotoxicity a apoptózy neurónov, zvýšená hladina kyslíkových a dusíkatých radikálov a zníženie tvorby nervových rastových hormónov [72]. Mutácia genetických faktorov, konkrétne génu kódujúceho APP, Presenilinu 1 a Presenilinu 2, vedúcich k nárastu tvorby a agregácie A β , je zodpovedná za výskyt autozomálne dedičnej formy AD, postihujúcej pacientov v mladšom veku. Ďalším genetickým faktorom zvyšujúcim riziko vzniku AD po 65. roku života, je prítomnosť alely ApoE 4. Prítomnosť týchto alel nie je nutne spätá s výskytom AD, ale s narastaním rizika jej vzniku a znižovaním veku nástupu ochorenia [74].

Vzhľadom k tomu, že doposiaľ stále ešte nie je známa úplná etiológia AD, nie je možné toto ochorenie liečiť kauzálne. Využívanými farmakoterapeutickými postupmi

sú ovplyvňované už známe patologické mechanizmy. Súčasná terapia neumožňuje úplné vyliečenie, ale iba spomalenie progresie choroby a oddialenie ťažkých štádií, ktoré sú spojené s postupným zhoršovaním kvality života pacientov [73]. V komplexnej terapii AD sú využívané kombinácie farmakologických a nefarmakologických postupov. U farmakologickej liečby rozlišujeme liečbu kognitívnych a nekognitívnych porúch. Liečba nekognitívnych porúch, ktoré doprevádzajú pacientov hlavne vo vyšších štádiách ochorenia, zahŕňa terapiu antidepresívami zo skupiny selektívnych inhibítorov spätného vychytávania serotonínu (citalopram, fluoxetin, sertralin) alebo selektívnych inhibítorov spätného vychytávania noradrenalínu (venlafaxin, duloxetín), u pacientov trpiacich súčasnou depresiou. U pacientov s agitovanosťou alebo agresivitou sú využívané atypické neuroleptiká (hlavne tiaprid, olanzapin a risperidon) [69,72]. V terapii kognitívnych porúch sú na základe „medicíny založenej na dôkazoch (evidence based medicine, EBM)“ využívané inhibítory cholinesteráz (iChE). Prvým využívaným bol takrin, dnes sa však už kvôli jeho nízkej znášanlivosti a hepatotoxicite nepoužíva a inhibítory NMDA receptorov [73,75].

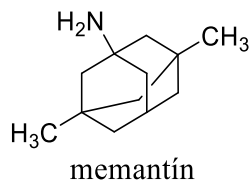
Z iChE, tzv. kognitív, sú klinicky využívané hlavne tri liečivá, a to donepezil (inhibítor *hAChE*, dostupný v perorálnych liekových formách), galantamín (inhibítor *hAChE* a alosterický modifikátor nikotínových receptorov) a rivastigmín (inhibítor *hAChE* a *hBuChE*, dostupný vo forme transdermálnych náplastí a perorálnych liekových formách). Tieto látky ovplyvňujú porušenie cholinergnú transmisii a tvorbu patologického A β . Sú indikované hlavne u miernych a stredne ťažkých štádií AD, pričom rivastigmín je využívaný aj v terapii Parkinsonovej choroby. Pri ich užívaní pacientmi je využívaná postupná titrácia dávky, aby sa predišlo nimi spôsobeným nežiadúcim účinkom ako gastrointestinálne problémy (nauzea, dyspepsia, nechutenstvo) a poruchy srdcového rytmu [69,73,76].



Obrázok 11 – Inhibítory cholinesteráz [77]

Ďalším, všeobecne dobre znášaným liečivom s minimom nežiadúcich účinkov, využívaným v terapii stredne ťažkých až ťažkých štádií AD je memantín, ktorý je parciálnym inhibítorom NMDA receptorov, spojených s otvorením iónových kanálov pre Ca²⁺ a Na⁺ ióny.

Ďalším jeho predpokladaným účinkom je pokles degenerácie τ -proteínu, inhibíciou enzýmu GSK-3 β a schopnosť súčasne mierniť príznaky behaviorálnych porúch. Je využívaný buď samostatne alebo v kombinácii s inhibítormi cholinesteráz, najmä donepezilom [69,73].



Obrázok 12 – Inhibitor NMDA receptorov [77]

Známe sú aj ďalšie terapeutické možnosti, u ktorých nie je v dôsledku absencie klinických štúdií preukázaná dostatočná účinnosť u neurodegeneratívnych demencií. Ich použitie nie je založené na princípe EBM, avšak aj bez týchto dôkazov môžu mať na pacientov s AD určitý pozitívny efekt. Napríklad určitý neuroprotektívny účinok môže vykazovať užívanie antioxidantov ako doplnkových liečiv (retinol, β -karotén, tiooktová kyselina, alfa-tokoferol), majúcich schopnosť vychytávať voľné radikály, ktorých uvoľňovanie je u neurodegeneratívnych ochorení zvýšené [72]. Aj napriek faktu, že niektoré štúdie považujú ich použitie v terapii AD za úplne neracionálne, je možné využiť k podpore myslenia a pamäte niektoré nootropiká, ako je piracetam alebo piritinol [73]. Štúdie zamerané na účinok nicergolínu (dihydrovaný námeľový alkaloid, ktorý spôsobuje vazodilatáciu mozgových ciev a zlepšuje tak jeho mikrocirkuláciu) u pacientov s AD nepreukázali dostatočnú účinnosť pri jeho využití v terapii. Ani v prípade cerebrolysinu, látky pôsobiacej ako prekursor tvorby nervových rastových hormónov, získaný z prasacích mozgov, štúdie nepreukázali dostatočnú účinnosť u pacientov trpiacich AD [72,73]. Suplementácia vitamínmi u pacientov trpiacich AD, konkrétne vitamínom B12 (koncentrácia u pacientov s AD býva znížená), kyselinou listovou, ktorej nedostatok môže viesť k zhoršeniu kognitívnych funkcií, alebo koenzýmom Q10, v klinických štúdiách nepreukázala terapeutickú efektivitu [72]. Mierny pozitívny efekt, ktorý bol preukázaný viacerými štúdiami má užívanie extraktu z ginkgo biloba (EGb 761), ktorý je zdrojom viac než 60 aktívnych zlúčenín, ako napríklad diterpény, ginkgolidy A a B, seskviterpén bilobalid alebo flavonoidy. Účinnosť tohto extraktu v terapii AD je pripisovaná antioxidantnému pôsobeniu, ktoré má za následok obsah flavonoidov a antiflogistickým účinkom, za ktoré sú zodpovedné terpenoidné zložky. Doporučované je jeho užívanie v terapii začínajúcich demencií a ako doplnková terapia pri súčasnom užívaní iChE a memantínu [78,79,80].

V súvislosti s vytváraním amyloidných plakov, ktoré spúšťajú neurodegeneratívnu kaskádu (vznik zápalu s uvoľnením interleukínov, voľných radikálov a ďalších mediátorov zápalu, strata neurónov a synapsii) sú vyvíjané antiamyloidné terapeutické stratégie, pôsobiace rôznymi mechanizmami [72]. Patria sem stimulátory α -sekretáz (etazolát), podporujúce štiepenie APP a tvorbu rozpustného amyloidu. Nedávne štúdie prevádzané u 159 pacientov v miernom a stredne ťažkom štádiu AD preukázali, že táto látka bola bezpečná a dobre tolerovateľná, čo poskytlo sľubné výsledky do ďalších klinických hodnotení na väčšom počte pacientov [81]. Ďalšími, pomerne sľubnými terapeutickými cieľmi v terapii AD, sú látky schopné inhibovať β -sekretázy, konkrétne typ 1, pričom niektoré látky, ako napríklad verubecesta, podstupujú tretiu fázu klinického hodnotenia. Blokátor γ -sekretázy, avagacestat, preukázal v prvej fázi klinického hodnotenia redukcii hladín $A\beta_{40}$ a $A\beta_{42}$, už po 18 dňoch užívania o 30 %, pri podaní dennej dávky 100 mg a pri podaní dávky 150 mg denne pokles až o 60% [81]. Ďalšiu možnosť predstavujú látky zabraňujúce oligomerácii a polymerácii β -peptidu, kam patrí glykosaminoglykán tramiprotat, ktorého užívanie viedlo k nadmernému zhlukovaniu τ -proteínu, alebo polypeptid colostrinín, obsahujúci vysoké množstvo prolínu, získavaný z ovčieho kolostra, u ktorého štúdie prevádzané počas 15 mesiacov u pacientov v miernom štádiu AD preukázali mierne zlepšenie, počas ďalších 15 mesiacov liečby však pozitívny účinok udržaný nebol. Potenciálnymi liečivami sú inhibítory GSK-3 β (lítium a memantín), zabraňujúce hyperfosforylácii τ -proteínu alebo aktívna a pasívna imunoterapia, ktoré sú predmetom aktívneho skúmania [72,80,81].

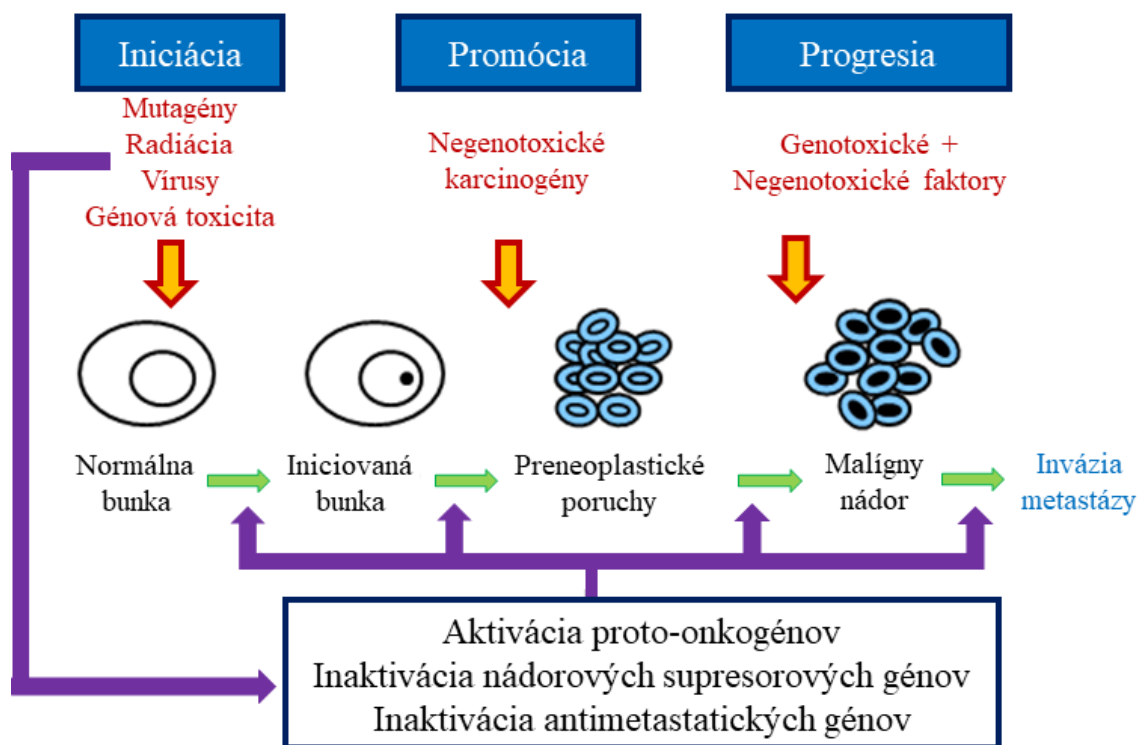
K nefarmakologických možnostiam terapie AD patria kinezioterapia, tanečná terapia, reminiscenčná terapia, programové a individualizované aktivity a kognitívna rehabilitácia. Ich cieľom u pacientov trpiacich AD je zachovať alebo skvalitniť zhoršené kognitívne funkcie, zlepšiť celkovú kvalitu života a zmierniť behaviorálne príznaky ako depresia, agresivita, či poruchy spánku. Dôležitou súčasťou nefarmakologických postupov je pracovať s blízkymi a personálom starajúcim sa o pacientov trpiacich AD [66].

3.6. Národové ochorenia

Podľa údajov WHO sú nádorové ochorenia (NO) druhou najčastejšou príčinou úmrtia, pričom za rok 2018 sú zodpovedné za celkovo 9,8 milióna úmrtí. Po kardiovaskulárných ochoreniach, zodpovedajúcich za takmer polovicu všetkých úmrtí v ČR, predstavujú zhubné NO druhú najčastejšiu príčinu úmrtí. Najviac frekventovanými sú nádory pľúc, prsníka, hrubého čreva, žalúdka a prostaty [82,83].

Jedným z najvýznamnejších rizikových faktorov, zvyšujúcich riziko vzniku zhubných NO je starnutie, pričom najviac týchto ochorení býva diagnostikovaných u pacientov v 6. a 7. decéniu života. Epidemiologické štúdie, prevádzané posledných 40 rokov preukázali, že hlavnou príčinou, podieľajúcou sa na vzniku týchto ochorení, sú faktory vonkajšieho prostredia, hlavne nezdravý životný štýl, kam zaradzujeme fajčenie, konzumáciu alkoholu, nesprávne zloženie stravy a spôsob stravovania, ionizujúce žiarenie, UV žiarenie, karcinogénne látky atď. [84].

Na úrovni molekulárnej patológie NO zohráva dôležitú úlohu komplexný viacstupňový proces, nazývaný kancerogenézia. Proces je charakterizovaný malígnou premenou buniek a následným vznikom nádoru, na základe vzájomnej interakcie vnútorných faktorov (spontánna mutácia, genómová nestabilita, klonálna expanzia) a vonkajších faktorov (pôsobenie chemických, fyzikálnych a biologických kancerogénov) [83]. K vzniku zmien dochádza na úrovni DNA, kódujúcej gény dôležité pre rozvoj nádorov. Prvými dôležitými génmi sú onkogény, vznikajúce mutáciou alebo aktiváciou fyziologických protoonkogénov, podieľajúcich sa na regulácii diferenciácie a proliferácie bunkového cyklu. V poradí druhými dôležitými génmi sú nádorové supresory, nazývané aj antionkogény, ktoré sa za fyziologických podmienok zúčastňujú procesu bunkového delenia, apoptózy a reparačných mechanizmov molekuly DNA, a tak bránia vzniku a rozvoju NO [84]. Ich inaktiváciou dochádza k procesom vedúcim k rozvoju NO. V procese kancerogenézie dochádza teda k viacerým genetickým zmenám, ako je bodová mutácia, delécia, translokácia, alebo inzercia nukleotidov a epigenetickým zmenám, ako je metylácia molekuly DNA alebo acetylácia histónov. Nádorovo transformované bunky sú nemé voči kontrole procesu proliferácie a vytvárajú si vlastný program bunkového delenia. Nebezpečnou vlastnosťou týchto buniek je schopnosť metastázovať. V prípade napadnutia životne dôležitých tkanív a orgánov, sa tak stávajú letálnymi [83,84].



Obrázok 13 – Viacstupňový proces kancerogenézie² [83]

Liečba NO sa obvykle delí na protinádorovú terapiu a podpornú starostlivosť, orientovanú na riešenie problémov súvisiacich s týmito ochoreniami, ako je bolesť alebo psychologická podpora, vrátane odstraňovania nežiadúcich účinkov vznikajúcich v dôsledku liečby [84]. K základným liečebným modalitám protinádorovej terapie patrí chirurgická liečba, rádioterapia ionizujúcim žiarením, systémová terapia cytostatikami, hormonálna liečba, imunoterapia a cieľená terapia, vedúca k ovplyvneniu konkrétnych signálnych dráh a proteínov [85].

Svoje využitie v terapii NO našli aj látky prírodného pôvodu a ich deriváty, pričom klinicky využívané sú napríklad vinblastín, vinkristín či paklitaxel [86]. Protinádorovou aktivitou sa vyznačujú aj alkaloidy čeľade Amaryllidaceae, ktorým je venovaná pozornosť v tejto diplomovej práci. Jednou z pomerne výrazných výhod týchto alkaloidov je ich vysoká selektivita voči nádorovo transformovaným bunkám a nízka toxicita voči zdravým a kľudovým bunkám [4]. Do dnešného dňa bolo viac než 300 alkaloidov podrobených screeningovým stanoveniam s využitím rozličných typov nádorovo transformovaných bunecných línií. K najvýznamnejším štruktúrnym typom poskytujúcim pomerne sľubnú cytotoxickú aktivitu, patria alkaloidy lykorínového, hemantamínového, pankratistatínového a krinínového štruktúrneho typu [4,87].

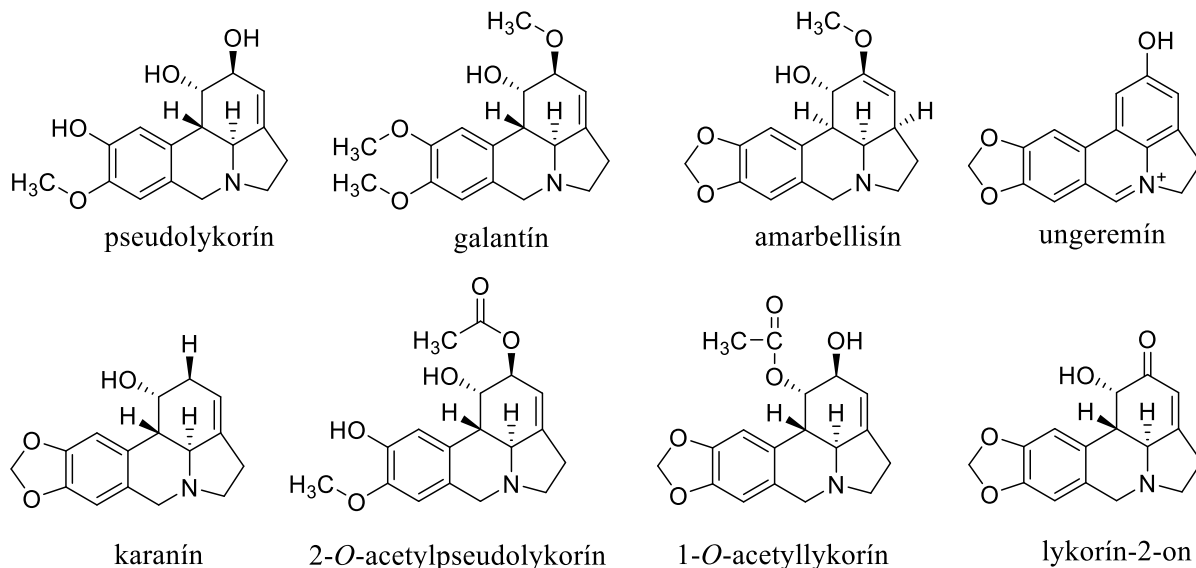
² Pôvodný obrázok bol preložený a upravený autorom.

3.6.1. Alkaloidy lykorínového štruktúrného typu

Z cytotoxického hľadiska patria k jedným z najúčinnějších a zároveň najviac preskúmaných alkaloidy lykorínového štruktúrného typu. Hlavný zástupca tejto štruktúrnej skupiny, alkaloid lykorín, bol prvou identifikovanou cytostatickou zlúčeninou, pričom jeho antiproliferatívne účinky voči rôznym líniam nádorovo transformovaných buniek boli známe už od dvadsiatych rokov 20. storočia [55,87]. Jeho protinádorová aktivita bola testovaná *in vitro* a *in vivo* na viacerých bunečných líniah, ktorých súpis je uvedený v kapitole 3.6.4. V bunkách HL-60, viedol lykorín k zástave G2/M fáze bunkového cyklu, zvýšeniu aktivity proapoptotických faktorov kaspázy 3, 8 a 9, uvoľneniu cytochrómu-c a následnému navodeniu apoptózy [4,88]. Štúdie prevádzané na tejto bunečnej línii viedli k výsledkom vykazujúcim pomerne sľubnú protirakovinovú aktivitu v koncentráciách od 0,31 do 5 μM [59]. Pri testovaní na bunkách ľudského mnohočetného myelómu KM-3 bolo preukázané, že lykorín zastavuje G0/G1 fázu bunkového cyklu a následne vedie k aktivácii procesu apoptózy, prostredníctvom „down“ regulácie cyklínu D1 a cyklín-dependentnej kinázy 4. U nádorovo transformovaných bunečných línii HL-60, K-562, U-937, vedie lykorín k navodeniu apoptózy prostredníctvom „down“ regulácie proteínu Mcl-1, patriaceho do skupiny proteínov Bcl-2, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii procesu apoptózy [4,88]. Na základe štúdií bolo tiež preukázané, že lykorín môže indukovať poškodenie DNA, zrovnateľné s poškodením spôsobeným ionizujúcim žiarením a niektorými chemoterapeutickými látkami a spôsobovať tak programovanú nekrozu v bunkách mnohočetného myelómu ARH-77. Prevedením viacerých *in vitro* a *in vivo* štúdií bolo zistené, že lykorín je schopný inhibovať rast, pohyb, inváziu a prežitie nádorovo transformovaných buniek prostaty u bunečných línii PC-3M, DU145, LNCaP a 22Rv1, s pomerne malou afinitou k zdravým bunkám [59,89]. Výsledky štúdií, zameraných na preukázanie antiproliferatívneho účinku lykorínu voči bunečným líniam rakoviny prsníka (MDA-MB-231, MCF-7, HMEC) potvrdili, že lykorín dokázal významne potlačiť nárast, pohyb, kolonizáciu a invazivitu týchto nádorových buniek. Prevedením týchto štúdií bolo potvrdené, že na molekulárnej úrovni vedie lykorín k zábrane aktivácie epidermálneho rastového faktoru, interleukínu 6 a následnej aktivácii JAK/STAT signalizačnej dráhy, ďalej vedie k inhibícii fosforylácie transkripčného faktoru STAT3, významného pre rast buniek a ich apoptózu, reguluje expresiu génov Mcl-1, Bcl-xL, MMP-2 a MMP-9, a vedie k inhibícii expresie transkripčného faktoru TWIST. Všetky tieto fakty vedú k zisteniu, že lykorín sa tak stáva potencionálnym kandidátom v prevencii a liečbe rakoviny prsníka a prostaty [59,89,90]. Pomerne zaujímavý výsledok poskytol lykorín vo forme soli hydrochloridu, ktorý pri *in vitro* testovaní viedol k potlačeniu proliferácie buniek

nádorovej línie Hey1B, s hodnotou $IC_{50} = 1,2 \pm 0,1 \mu M$ [59]. Zároveň bolo preukázané, že lykorín významne inhibuje aktivitu DNA topoizomerázy I, ktorá je nevyhnutná pre rast rakovinových buniek. U lykorínového derivátu, označovaného ako HLY78 bolo preukázané, že vedie k aktivácii fosforylácie ko-receptoru LRP6 a signalizačnej dráhy Wingless/INT-1, ktoré sú užitočné v boji proti nádorovým bunkám prostaty, prsníka a glioblastómu [55].

K ďalším alkaloidom tohoto štruktúrneho typu, vykazujúcim sľubnú cytotoxickú aktivitu voči nádorovým bunkám, patrí pseudolykorín, galantín, amarbellisín, ungeremín, karanín a 2-*O*-acetylpseudolykorín. Alkaloid pseudolykorín vykazuje schopnosť inhibovať syntézu proteínov nádorovo transformovaných buniek v štádiu formácie peptidovej väzby [60]. Po vystavení pôsobeniu 1-*O*-acetyllykorínu a lykorín-2-onu bola preukázaná apoptóza leukemických buniek línie Jurkat. Alkaloid amarbellisín vykazuje pomerne silnú cytostatickú aktivitu voči bunečným líniam nádorových buniek A549, OE21, Hs683, U373, SK-MEL-28 a B16F10, s hodnotou IC_{50} v rozmedzí 5-10 μM [4,59]. Metabolit lykorínu, ungeremín, nazývaný aj lycobetaín, vykazuje väzbou na topoizomerázu II β cytotoxický účinok na paneli bunečných línii HL-60, MOLT-4, K-562, U-937, LXFL529L, s priemernou hodnotou $IC_{50} = 1,3 \mu M$ [59].



Obrázok 14 – Lykorínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou [49]

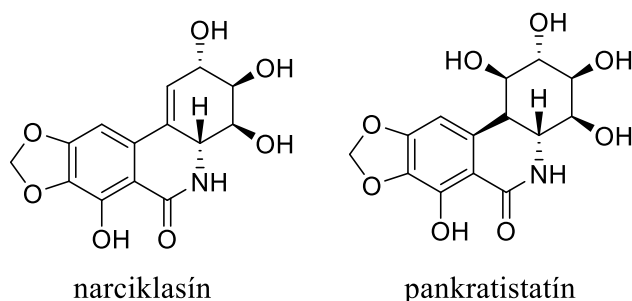
3.6.2. Alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu

Nemenej významnú cytotoxickú aktivitu poskytujú alkaloidy pankratistatínového štruktúrneho typu. Z pohľadu cytotoxickej aktivity patria k najúčinnnejším narciklasín a pankratistatín. Prevádzaním štúdií bolo zistené, že pôsobením narciklasínu dochádza

v bunkách k ovplyvneniu ich delenia v štádiu metafázy, má schopnosť blokovat' formáciu peptidovej väzby naviazaním na 60S ribozomálnu podjednotku tRNA, kde inhibuje peptidyltransferázu. Ďalším jeho predpokladaným účinkom je schopnosť vytvárať komplexy s molekulou DNA a zabraňovať vzniku kalprotektínom indukovanej cytotoxicity v 10-násobne nižšej koncentrácii než lykorín. Jeho schopnosť znižovať proliferáciu a migráciu nádorových buniek sa prejavuje už pri koncentrácii nižšej než 1 μM [4,59,60]. U melanómových buniek VN-48, implantovaných do mozgu imunodeficitných myší a následne liečených narciklasínom, bola preukázaná jeho schopnosť viazať sa na elongačný faktor eEF1A, čo predstavuje nový potenciálny cieľ v terapii týchto metastázujúcich buniek, rezistentných voči apoptóze. U bunčných línií U373, Hs683, GL19, narciklasín vedie k narušeniu proliferácie glioblastómových buniek, spomalením procesu mitózy a spôsobuje indukciu polymerizácie aktínu [7,59]. U nádorovo transformovaných buniek prostaty PC-3 a prsníka MCF-7, viedol narciklasín k navodeniu procesu apoptózy prostredníctvom aktivácie receptorov smrti (Fas a DR-4) a súčasnou aktiváciou kaspázy 8 a 9, s viac než 250-krát vyššou účinnosťou k nádorovým bunkám, než k bunkám zdravých fibroblastov CCD-25Lu. V nedávnej dobe bol tiež popísaný cytotoxický účinok narciklasínu voči bunčným líniám HL-60 ($\text{IC}_{50} = 0,018 \mu\text{M}$) a HSC-2 ($\text{IC}_{50} = 0,05 \mu\text{M}$), navodený indukciou apoptózy [4,7,59].

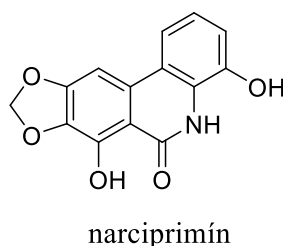
Cytotoxická aktivita bola preukázaná aj u ďalšieho alkaloidu tohto štruktúrneho typu - pankratistatínu, ktorý bol v roku 2004 predmetom štúdií, ktoré popísali jeho schopnosť navodiť apoptózu leukemických buniek Jurkat, v koncentrácii 1 μM , bez toxického účinku voči zdravým bunkám [59]. Neskôr bolo zistené, že pankratistatínom navodená apoptóza je spojená s aktiváciou kaspázy 3, produkciou reaktívnych foriem kyslíka a stratou mitochondriálneho membránového potenciálu, pričom práve mitochondrie nádorovo transformovaných buniek predstavujú potenciálne miesto pôsobenia pankratistatínu v terapii nádorových ochorení. U nádorovo transformovaných buniek ľudského neuroblastómu SHSY-5Y, viedol pankratistatín v dávke 1 μM k aktivácii kaspázy 3, zvýšeniu produkcie reaktívnych foriem kyslíka a poklesu množstva ATP v mitochondriách, čím viedol k ich poškodeniu [59,91]. Podobný proapoptotický mechanizmus spôsobený pankratistatínom bol potvrdený aj u dvoch typov bunčných línií rakoviny prostaty LNCaP, DU145 a bunčnej línie rakoviny prsníka MCF-7 [92]. Pankratistatín vykazoval synergický účinok v kombinácii s Tamoxifenom, v liečbe nádorovo transformovaných buniek rakoviny prsníka, zásahom do mitochondrií a navodením apoptózy [93]. Jeho pomerne vysoká selektivita voči nádorovým bunkám bola potvrdená aj pri prevádzaní *in vitro* a *in vivo* štúdií, na bunčných líniách

kolorektálneho karcinómu HT-29, HCT116, bez významného vplyvu voči zdravým bunkám čreva CCD-18Co [4,59]. Indukciou apoptózy, autofágie buniek a zástavou bunecného cyklu v G2/M fázi, vedie pankratistatín k inhibícii rastu nádorových buniek kolorektálneho karcinómu HCT-15 *in vitro* [94].



Obrázok 15 – Pankratistatínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou [49]

Štruktúrne blízky alkaloid pankrastatínu, narciprimín, vykazuje strednú cytotoxickú aktivitu voči bunkám nádorovej línie CEM, a slabú aktivitu voči bunecnými líniám MCF-7, K-562, G-361 a HeLa. Nevýhodou je, že tento alkaloid vykazoval pri testovaní cytotoxický účinok aj voči zdravým ľudským fibroblastom (BJ) [88].

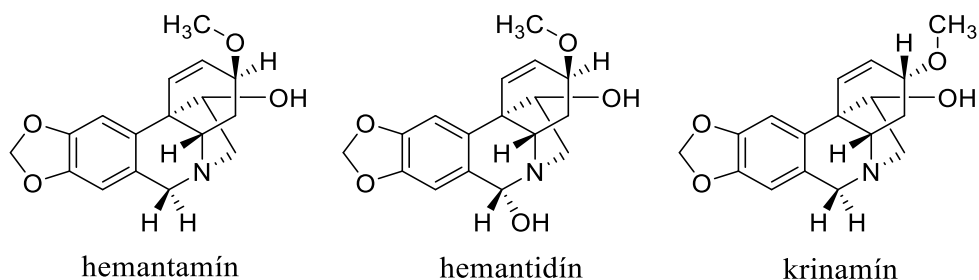


Obrázok 16 – Štruktúra narciprimínu [49]

3.6.3. Alkaloidy hemantaminínového a krinínového štruktúrneho typu

Z alkaloidov hemantaminínového a krinínového štruktúrneho typu vykazujú najvyššiu cytotoxickú aktivitu voči nádorovým bunkám alkaloidy hemantamín, hemantidín a krinamín. β -krinanový alkaloid hemantamín vykazoval prevádzaním *in vitro* štúdií cytotoxickú aktivitu voči rozličným líniám nádorovo transformovaných buniek, zahŕňajúcich bunecné línie MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF-7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, A2780, SW1573 a T47-D [4,59,60]. Jeho predpokladaný účinok spočíva v mechanizme inhibície syntézy proteínov v momente, kedy dochádza k väzbe peptidyltransferázy na 60S ribozomálnu podjednotku. Indukcia apoptózy doprevádzaná aktiváciou kaspáz 3, 7, 8, 9, pokles mitochondriálneho membránového potenciálu a zástava bunecného cyklu vo fázi G1 a G2/M, bola pozorovaná u buniek nádorovej línie Jurkat, po jej vystavení pôsobeniu hemantamínu

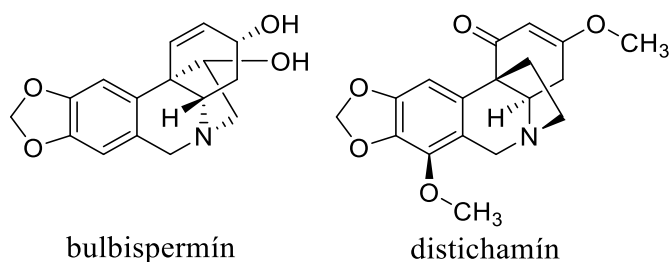
a hemantidínu, ktorý môže vzniknúť ireverzibilnou premenou hemantamínu. Štúdie prevedené na bunkách myšieho lymfómu L5178 preukázali schopnosť hemantamínu spôsobovať silnú inhibíciu ich rastu, tvorbou komplexov s molekulou RNA. Hemantidín vykazoval sľubnú cytotoxickú aktivitu prevedením *in vitro* štúdií voči nádorovým líniam A549, OE21, Hs683 a SK-MEL-28. Ďalším významným alkaloidom je krinamín, ktorý rovnako ako hemantamín, je potenciálnym induktorom apoptózy nádorovo transformovaných buniek už v mikromolárnych koncentráciách [59,88,95].



Obrázok 17 – Hemantamínové alkaloidy s cytotoxickou aktivitou [49]

Štúdie prevedené v roku 2012 poukázali na protinádorovú aktivitu α -krinanového alkaloidu bulbispermínu. Tento alkaloid viedol v koncentrácii 10 μM k významnej inhibícii proliferácie glioblastómových buniek T986 a U373, rezistentných voči apoptóze, prostredníctvom cytostatického účinku v dôsledku zvýšenia množstva polymerizovaného aktínu. V rámci tejto štúdie bola potvrdená aj jeho silná cytotoxická aktivita proti bunkám HL-60 [96].

V priebehu posledných rokov sa viacero štúdií zameralo na protinádorovú aktivitu β -krinanového alkaloidu distichamínu. V *in vitro* štúdiách vykazoval tento alkaloid cytotoxickú aktivitu voči nádorovým líniam HeLa, CEM, K562, MCF-7 a G361, už v mikromolárnych množstvách, s najvyššou aktivitou voči línii HeLa buniek ($\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{M}$). U nádorovej línie leukemických buniek CEM, viedol distichamín k navodeniu apoptózy aktiváciou kaspázy 3 a 7, vedúcich k tvorbe fragmentov DNA [4,59].



Obrázok 18 – Hemantamínový alkaloid bulbispermín a krinínový alkaloid distichamín s cytotoxickou aktivitou [49]

3.6.4. Význam skratiek národových bunčných línií

22Rv1	bunčná línia epiteliálneho karcinómu prostaty
A2780	bunčná línia ľudského karcinómu vaječníkov
A549	bunčná línia ľudského adenokarcinómu pľúc
ARH-77	bunky mnohopočetného myelómu
B16F10	bunčná línia myšieho melanómu kože
BJ	bunčná línia ľudských zdravých fibroblastov
Caco-2	bunčná línia ľudského kolorektálneho karcinómu
CCD-18Co	fibroblasty, izolované zo zdravého tkaniva hrubého čreva
CCD-25Lu	fibroblasty, izolované zo zdravého pľúcneho tkaniva
CEM	bunčná línia akútnej leukémie T-lymfoblastov
DU145	bunčná línia ľudského karcinómu prostaty
G-361	bunčná línia malígneho melanómu
GL19	bunčná línia multiformného glioblastómu
HCT116	bunčná línia kolorektálneho karcinómu
HeLa	bunčná línia adenokarcinómu krčka maternice
HepG2	bunčná línia hepatocelulárneho karcinómu
Hey1B	bunčná línia karcinómu vaječníkov
HL-60	bunčná línia akútnej promyelocytárnej leukémie
HMEC	primárne ľudské epiteliálne bunky mliečnej žľazy
Hs683	bunčná línia glioblastómu mozgu

HSC-2	bunečná línia skvamocelulárneho karcinómu ústnej dutiny
HCT-15	bunečná línia ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
HT-29	bunečná línia ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
Jurkat	bunečná línia akútnej leukémie T-lymfocytov
K-562	bunečná línia chronickej myeloidnej leukémie
KM-3	bunečná línia ľudského mnohopočetného myelómu
L5178	bunky myšieho lymfómu týmu
LMTK	zdravé bunky myších fibroblastov
LNCaP	bunky ľudského hormón-dependeného karcinómu prostaty
LXFL529L	bunečná línia ľudského karcinómu pľúc
MCF-7	bunečná línia adenokarcinómu prs
MDA-MB-231	bunečná línia adenokarcinómu prs
MOLT-4	bunečná línia akútnej lymfoblastickej leukémie
OE21	bunky skvamocelulárneho karcinómu pažeráka
PC-3M	bunečná línia ľudského karcinómu prostaty
SHSY-5Y	bunečná línia ľudského neuroblastómu
SK-MEL-28	bunečná línia ľudského malígneho melanómu kože
SW1573	bunečná línia karcinómu pľúc
T47D	bunky ľudského nádoru prs
T-98G	bunky glioblastómu
U373	bunky ľudského glioblastómového astrocytómu
U-937	bunky histiocytického lymfómu
VM-48	ľudské metastázujúce melanómové bunky mozgu, rezistentné voči apoptóze

4. Experimentálna časť

4.1. Všeobecné postupy

4.1.1. Destilácia

Všetky komerčné rozpúšťadlá, ktoré boli pri experimentálnej práci použité, boli pred samotným použitím predestilované. V prvom kroku bol zachytený destilačný predok (asi 5 % pôvodného objemu), následne bola zachytená hlavná frakcia, pričom bolo predestilovaných maximálne 90 % pôvodného objemu rozpúšťadla. Rozpúšťadlá boli uchovávané v hnedých širokohrdlých fľašiach, patrične označených a chránených pred svetlom.

4.1.2. Odparovanie získaných extraktov

Odparovanie sumárnych etanolových extraktov a následne alkaloidných etylacetátových výtrepkov, ktoré boli určené pre stanovenie biologickej aktivity, bolo prevádzané na vákuovej odparke Buchi Rotavapor R-114, pri tlaku 1,33 kPa a pri teplote, ktorá neprevyšovala 40 – 50 °C. Alkaloidné výtrečky boli odparené dosucha. Po ukončení odparovania boli banky, ktorých hrdlo bolo prekryté alobalom, uložené do eksikátora a dosušované po dobu minimálne 24 hodín za vákua nad perlami silikagélu. Po vybratí z eksikátora boli extrakty uchovávané tak, aby boli chránené pred svetlom a pri teplote 2 – 8 °C, až do doby navažovania pre príslušnú analýzu.

4.2. Chemikálie, rozpúšťadlá a prístrojové vybavenie pre izoláciu alkaloidov

4.2.1. Rozpúšťadlá, chemikálie a pomocný materiál

- Etanol 95%, denaturovaný metanolom, (EtOH), (Penta a.s.)
- Destilovaná voda, (H₂O)
- Chloroform p.a., (CHCl₃), (Penta a.s.)
- Dietyléter, čistý destilovaný bez stabilizátoru, (Et₂O), (Penta a.s.)
- Metanol p.a., (MeOH), (Penta a.s.)
- Etyl-acetát p.a., (EtOAc), (Penta a.s.)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w), (Na₂CO₃), (Lachema)
- 2% kyselina chlorovodíková, (HCl)
- Síran sodný bezvodý čistý, (Na₂SO₄), (Penta a.s.)
- Kremelina Celite C 535 Jonh's Manville (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Sušiacie perly silikagélu (Penta a.s.)

4.2.2. Prístrojové vybavenie

- Vákuová odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland)
- Ultrazvukový vodný kúpeľ Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostným detektorom 5975C inert MSD, EI mód 70 eV, kolóna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

4.2.3. Databáze použité k vyhodnocovaniu výsledkov

- Knižnica EI-MS spektier NIST Virtual Library 2011 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

4.3. Príprava sumárnych extraktov

4.3.1. Použitý biologický materiál

Ako biologický materiál boli použité zmrazené cibule rastlín rodu *Narcissus* L., jednotlivých kultivárov (Scarlet Gem, Acropolis, Kedron, Delta, White Marvel) a variety *Narcissus albus* var. *plenus odoratus*, ktoré boli tesne pred použitím rozmrazené. Jednotlivé vzorky cibúľ boli zakúpené od firmy LUKON BULBS (Lovčice 30) a LUKON GLANDS (Lysá nad Labem). Doba zberu cibúľ – 09/2013. Botanická verifikácia bola prevedená prof. RNDr. Lubomírom Opletalom, CSc. Dokladové vzorky boli uložené v herbáriu na Katedre farmaceutickej botaniky FAF UK, pod označením *Narcissus* cv. Acropolis CUFPH-16130/AL-450, *Narcissus* cv. Delta CUFPH-16130/AL-457, *Narcissus* cv. White Marvel CUFPH-16130/AL-460, *Narcissus* cv. Kedron CUFPH-16130/AL-463, *Narcissus* cv. Scarlet Gem CUFPH-16130/AL-467, *Narcissus albus* var. *plenus odoratus* CUFPH-16130/AL-508.

Tabuľka 1 – Prehľad hmotností jednotlivých vzoriek použitých pri extrakcii

Číslo vzorku*	Názov kultiváru	Hmotnosť [g]	
		Cibule k extrakcii	Sumárny extrakt
AL – 450	<i>Narcissus</i> cv. Acropolis	198	0,150
AL – 457	<i>Narcissus</i> cv. Delta	188	0,168
AL – 460	<i>Narcissus</i> cv. White Marvel	210	0,113
AL – 463	<i>Narcissus</i> cv. Kedron	185	0,171
AL – 467	<i>Narcissus</i> cv. Scarlet Gem	256	0,184
AL – 508	<i>Narcissus albus</i> var. <i>plenus odoratus</i>	103	0,122

* číslo vzorku z katalogizácie pracovnej skupiny ADINACO group

4.3.2. Priebeh procesu extrakcie drogy a spracovanie extraktu

Prvý krok procesu extrakcie drogy spočíval v vpravení nasekaných a rozmrazených cibúl do 500 ml Erlenmeyerovej banky. Cibule boli zaliate dostatočným množstvom EtOH 95%, aby nad drogou bola aspoň 1-2 cm vrstva kvapaliny. Droga bola extrahovaná po dobu 20 minút na vodnom kúpeli za varu a pod spätným chladičom. Po uplynutí tejto doby, bola banka odpojená a odobraná z variča a ponechaná k ochladeniu. Následne bola zmes prefiltrovaná cez vliselín. Tento celý proces bol prevedený celkovo trikrát. Spojené filtráty boli prefiltrované cez vrstvu kremeliny s Willdstädterovou ihlou (vzhľadom k obsahu vyššieho množstva slizových látok), ktorá bola umiestnená do filtračného tubusu a pred samotnou filtráciou bola premytá destilovanou vodou. Spojené etanolové extrakty boli následne odparené na vákuovej odparke Buchi Rotavapor R-114 dosucha. Odparky boli po odparení zvážené a podľa ich jednotlivých hmotností okyselené takým množstvom 2% HCl, aby došlo k dosiahnutiu koncentrácie 100 mg odparku / 0,5 ml kyseliny. Následne bol odparok zriedený vodou do objemu približne 50 ml, pričom bola prevedená kontrola jeho výsledného pH. Hodnota pH by mala byť v rozmedzí 1 – 2. Aby došlo k odstráneniu zbytkov odparkov, ktoré sa prichytávajú na stenu banky, banka bola ponorená do ultrazvukového kúpeľa SONOREX a sonikovaná pri normálnej teplote po dobu približne 5 minút. Došlo k odlepeniu zbytkov odparkov od stien banky a rozbitiu jednotlivých väčších kusov. Získaný číry kyslý filtrát bol vytrepaný v deliacej nálevke, za použitia predestilovaného a nestabilizovaného Et₂O, celkovo trikrát, z dôvodu odstránenia nežiadúcich nepolárnych látok nealkaloidnej povahy ako sú silice, či tuky. Po vytrepaní bola éterová vrstva oddelená a nachádzala sa hore. Kyslá vodná vrstva bola následne zalkalizovaná 10% Na₂CO₃, do dosiahnutia pH 9 – 10, a znova vytrepaná celkovo trikrát, za použitia predestilovaného EtOAc. Polárne nečistoty po vytrepaní zostali vo vodnej vrstve. Alkaloidné výtrepky boli následne spojené. Stopy vody boli odstránené pridaním malého množstva Na₂SO₄ bezvodého, za mierneho premiešania a následného prefiltrovania cez filtračný papier. Číry filtrát bol odparený dosucha. Po odparení boli odparky dosušované po dobu minimálne 24 hodín v exsikátore za vákua nad perlami silikagélu. Z každého alkaloidného extraktu boli pripravené vzorky pre analýzu pomocou GC-MS a pre screeningové stanovenie biologických aktivít extraktov (inhibícia hAChE + hBuChE a cytotoxicitu).

4.4. GC-MS analýza a identifikácia jednotlivých alkalodov

Analýza zloženia a identifikácia jednotlivých alkaloidov rodu *Narcissus* L. bola prevádzaná s využitím plynového chromatografu (Agilent Technologies 7890A) s hmotnostným detektorom (Agilent Technologies 5975C), pracujúcim pri elektrónovej

ionizácii 70 eV. Separácia bola prevedená s využitím kolóny HP-5MS, 30 m x 0,250 mm, za použitia teplotného programu: 100 – 180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180-300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min). Ako mobilná fáza bolo použité hélium s rýchlosťou prietoku 0,8 ml/min. Teplota, pri ktorej bol prevedený nástrek vzorku bola 280 °C, pričom bol nastreknutý 1 µl metanolického roztoku analyzovaného vzorku o koncentrácii 1 mg/ml, pri splite 1:10. Rozsah merania hodnôt bol 40-600 m/z.

Identifikácia alkaloidov prebiehala porovnávaním ich spektier so spektrami dostupnými v komerčnej knižnici dostupných spektier NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), ďalej s dátami, ktoré sú publikované v literatúre a so štandardami látok, ktoré už boli v našom laboratóriu izolované.

4.5. Stanovenie inhibičnej aktivity alkaloidov a alkaloidných extraktov voči erytrocytárnej *hAChE* a sérovej *hBuChE*

4.5.1. Chemikálie, materiál a prístrojové vybavenie pre stanovenie biologických aktivít

4.5.1.1. Chemikálie

- Acetyltiocholín jodid, (ATChI), (Sigma – Aldrich s.r.o.)
- Butyryltiocholín jodid, (BuTChI), (Sigma – Aldrich s.r.o.)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (DTNB), (Sigma – Aldrich s.r.o.)
- Dimetylsulfoxid p.a. (Sigma – Aldrich s.r.o.), (DMSO)
- Galantamín hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- Huperzín A 95% (TAZHONGHUI — Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- Eserín (Sigma – Aldrich s.r.o.)
- Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát, p.a. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (Lachema)
- Hydrogénfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), (Lachema)

4.5.1.2. Tlmivé roztoky

- 5 mM Fosfátový tlmivý roztok (pH 7,4) - pripravený zmiešaním 57 ml zásobného roztoku A (10 mM roztok NaH_2PO_4 ; 1 liter roztoku obsahuje 1,20 g NaH_2PO_4) s 283 ml zásobného roztoku B (10 mM roztok Na_2HPO_4 ; 1 liter roztoku obsahuje 1,42 g Na_2HPO_4), a 300 ml vody.

- 5mM Fosfátový tlmivý roztok, obsahujúci 150 mM chloridu sodného (NaCl) o pH 7,4 – pripravený rozpustením 8,766 g NaCl v 5 mM fosfátovom tlmivom roztoku o pH 7,4 a doplnený ním na 1000 ml.
- 100 mM Fosfátový tlmivý roztok (pH 7,4) – pripravený zmiešaním 57 ml zásobného roztoku A (200 mM roztok NaH₂PO₄; 1 liter roztoku obsahuje 24,0 g NaH₂PO₄) s 243 ml zásobného roztoku B (200 mM roztok Na₂HPO₄; 1 liter roztoku obsahuje 28,4 g Na₂HPO₄) a 300 ml vody.

Hodnoty všetkých použitých tlmivých roztokov boli kontrolované na kalibrovanom pH metri PHM 220.

4.5.1.3. Biologický materiál

- Zdrojom *hAChE* bol hemolyzát ľudských erytrocytov.
- Ako zdroj *hBuChE* bola použitá ľudská plazma.

4.5.1.4. Prístrojové vybavenie a použité programy

- Reader SynergyTM HT Multi. Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Centrifúga 5810/5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Mikrotitračné doštičky 96 jamiek (Fisher Scientific, Pardubice)
- pH meter PHM 220 (Radiometer, Kodaň, Denmark)
- Trepáčka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pensylvánia, USA)
- Odstredivka AVANTI J-301 s rotorom JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, California, USA)
- Odstredivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorom Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- Program pre vyhodnocovanie štatistických dát GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA, 2006)

4.5.2. Získavanie humánných cholínesteráz *hAChE* a *hBuChE*

Erytrocyty použité k získaniu humánných cholínesteráz boli získané z čerstvo odobranej krvi zdravých dobrovoľníkov, ku ktorej bolo pridané protizrážanlivé činidlo – citrát sodný, (18 ml krvi + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Okamžite po odbere bola krv rozdelená rovnomerne po 5 ml do šrubovacích skúmaviek, kónického tvaru. Následne bola prevedená centrifugácia krvi, za použitia odstredivky Boeco U-32R s rotorom Hettich 1611, pri rýchlosti 4000 otáčok/minútu, teplote 4 °C, po dobu 10 minút. Po ukončení tejto centrifugácie bola

plazma zo skúmaviek odobraná tak, aby v nej nezostali žiadne erytrocyty. Plazma bola uchovávaná v chladničke, pri teplote 4 °C, do doby stanovenia aktivity *hBuChE*. Uchovávanie plazmy je možné najdlhšie po dobu nepresahujúcu 6 hodín.

Zvyšok plazmy z erytrocytárneho sedimentu bol opatrne odsatý za použitia bezpopolového filtračného papiera s hladným povrchom. Špička tohto filtru bola zostrihnutá. Po odčítaní objemu erytrocytov bol sediment zriedený 5 mM fosfátovým tlmivým roztokom o pH 7,4 obsahujúcim 150 mM NaCl. Pridané bolo také množstvo tohto tlmivého roztoku, aby výsledný objem erytrocytarnej suspenzie bol 13ml. Po rovnomernom premiesení suspenzie bola vykonaná centrifugácia rovnakým spôsobom, ako pri oddeľovaní plazmy. Týmto spôsobom bolo prevedené premytie erytrocytov (za účelom odstránenia zvyškov plazmy a *hBuChE*), celkovo trikrát a premývacia kvapalina bola dokonale odstránená. V nasledujúcom kroku bolo pridané také množstvo 5 mM fosfátového tlmivého roztoku o pH 7,4 bez obsahu NaCl, aby bol objemový pomer erytrocyty : tlmivý roztok 1:9. Preklápaním skúmaviek bola zmes opäť zhomogenizovaná a následne preliata do Erlenmayerovej banky. Erytrocyty boli ponechané spontánnej hemolýze po dobu 10 minút za miešania teflónovým miešadlom pri počte 300 otáčok/minútu. Po ukončení riadenej hemolýzy bola u suspenzie stanovená acetylcholinesterázová aktivita.

V prípade potreby je možné upraviť absorbanciu pridaním 5 mM fosfátového tlmivého roztoku (rozmedzie absorbancie pre *hAChE* musí byť 0,08 – 0,15 a pre *hBuChE* 0,15 – 0,20). Nariedený hemolyzát bol v Eppendorfkách uchovávaný až do doby použitia pri teplote - 22 °C.

4.5.3. Stanovenie inhibičnej aktivity extraktov voči *hAChE* a *hBuChE* (IC₅₀)

K stanoveniu cholinesterázovej inhibičnej aktivity (IC₅₀) bola použitá Ellmanova spektrofotometrická metóda za využitia DTNB.

K stanoveniu inhibičnej aktivity enzýmov bolo do šiestich jamôk mikrotitračnej doštičky napipetovaných 8,3 µl plazmy alebo hemolyzátu, 283 µl 5 mM DTNB a 8,3 µl DMSO. Po pretrepaní na mikrotrepačke po dobu 1 minúty bola následne zmes inkubovaná v komore readeru Reader Synergy™ pri teplote 37 °C po dobu 5 minút. Po inkubácii bolo následne pridaných 33,3 µl substrátu. Ako substráty sa využívajú estery tiocholínu, pričom bol použitý 10 mM roztok ATChI alebo 10 mM roztok BuTChI, ktoré sú cholinesterázami štiepené na tiocholín a príslušnú kyselinu. Po uplynutí dvoch minút bola za použitia vhodnej vlnovej dĺžky premeraná absorbancia [(λ = 436 nm (*hAChE*-hemolyzát); λ = 412 nm (*hBuChE*-plazma)] vzniknutého žltého produktu. Tento produkt je výsledkom naviazania

SH-skupiny z tiocholínu na DTNB. V priebehu analýzy bol sledovaný nárast absorbancie za 1 minútu. Prostredníctvom vzorca, ktorý je uvedený nižšie, bola vypočítaná priemerná hodnota inhibície so smerodatnou odchýlkou.

Pri stanovení inhibičnej aktivity extraktov bolo postupované rovnakým spôsobom, pričom zhodný bol aj postup merania. Do mikrotitračnej doštičky boli napipetované rovnaké objemy činidiel a roztoku substrátu (využívaná bola plocha šiestich riadkov po troch jamkách). Do jednotlivých jamôk boli pridávané roztoky extraktov v DMSO v použitých out koncentráciách 20,0; 2,0; 0,2; 0,02; 0,002 mg/ml, prípadne v nižšej koncentrácii. Možné sú aj iné série koncentrácií, ak je aktivita vysoká. Do poslednej šiestej jamky bol napipetovaný samotný DMSO, ktorý funguje ako slepá vzorka.

Jednotlivé hodnoty IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$] boli vypočítané nelineárnou regresiou z nameraných hodnôt poklesu aktivity *hAChE* a *hBuChE*, za využitia programu GraphPad Prism (verzia pre Windows, výrobca GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Získané hodnoty IC_{50} *hAChE* a IC_{50} *hBuChE* v $\mu\text{g/ml}$, boli porovnávané s hodnotami IC_{50} referenčných látok – galantamínom, huperzínom A a eserínom.

Percentá inhibície (%I) je možné vypočítať podľa nasledujúceho vzorca:

$$\%I = 100 - \frac{\Delta_{ABL}}{\Delta_{ASA}} \times 100$$

Δ_{ABL} – nárast absorbancie slepého vzorku behom jednej minúty

Δ_{ASA} – nárast absorbancie meraného vzorku behom jednej minúty

Tabuľka 2 – Hodnoty cholinesterázovej aktivity štandardov

Názov	Pôvod	IC_{50} [μM]	
		<i>hAChE</i>	<i>hBuChE</i>
Galantamín HBr	Changsha Organic Herb, China	1,710 \pm 0,065	42,301 \pm 0,065
Eserín	Sigma Aldrich s.r.o.	0,063 \pm 0,001	0,130 \pm 0,004
Huperzín A	Tai'an Zhonghui Plant., China	0,033 \pm 0,001	> 1000

4.6. Stanovenie *in vitro* cytotoxického pôsobenia

Stanovenie bunečnej viability/cytotoxického pôsobenia testovaných extraktov, bolo prevádzané v spolupráci s Ústavom lekárskej biochémie na Lekárskej fakulte v Hradci Králové.

Stanovenie cytotoxickej aktivity prebiehalo s využitím optických kolorimetrických metód. V tomto prípade bolo prevedené stanovenie bunečnej viability pomocou WST-1 metódy, ktorá je obdobou MTT metódy. Využíva ako reakčné činidlo tetrazolióvú soľ 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát namiesto 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu, ktorý je využívaný pri prevádzaní MTT metódy. Obe tieto metódy používajú ako činidlá tetrazolióvé soli, ale výhodami metódy WST-1 je vynechanie kroku rozpúšťania a zároveň citlivejšie a rýchlejšie stanovenie testovaných extraktov.

V prvom kroku boli pripravené z testovaných extraktov roztoky o koncentrácii 50 µg/ml. V čase použitia bolo nutné zabezpečiť, aby koncentrácia DMSO v pripravených roztokoch bola < 0,1%, a tým bola vylúčená jeho toxicita. Do 96-jamkovej doštičky boli nasadené bunky, a to v koncentrácii 1×10^3 – 50×10^3 buniek/jamku podľa danej línie. Následne boli bunky podrobené inkubácii pri teplote 37 °C a koncentrácii CO₂ odpovedajúcej 5 %. Po 24 hodinovej inkubácii boli k bunkám pridané roztoky testovaných extraktov o koncentrácii 50 µg/ml. Popríklad bol pridaný doxorubicín ako pozitívna kontrola v koncentrácii 1µM. Po uplynutí inkubácie o dobe trvania 48 hodín za rovnakých podmienok, bolo do jamôk pridané činidlo WST-1. Toto činidlo bolo následne v živých bunkách redukované mitochondriálnymi dehydrogenázami, za vytvorenia purpurovo sfarbeného formazanu. Po pridaní DMSO bol následne purpurovo sfarbený formazan rozpustený a absorbancia bola zmeraná pri vlnovej dĺžke $\lambda = 440$ nm, na readeri Infinite M200.

Miera sfarbenia roztoku je priamo úmerná množstvu živých buniek. S prevedením troch nezávislých experimentov, bola následne spočítaná bunečná viabilita každého extraktu, v porovnaní s negatívnou kontrolou. Pri negatívnej kontrole nebola k bunkám pridaná žiadna účinná látka, iba DMSO o koncentrácii 0,1%.

5. Výsledky

5.1. Inhibičná aktivita voči *hAChE* a *hBuChE*

Tabuľka 3 – Prehľad výsledkov anticholinesterázovej aktivity sumárnych alkaloidných extraktov rodu *Narcissus* L.

Číslo vzorku	IC ₅₀ <i>hAChE</i> [µg/ml]**	Inhibícia <i>hAChE</i> [%]*	IC ₅₀ <i>hBuChE</i> [µg/ml]**	Inhibícia <i>hBuChE</i> [%]*
AL – 450	-	50,98 ± 1,18	n.t.	58,06 ± 0,62
AL – 457	9,69 ± 1,24	82,24 ± 0,80	n.t.	45,32 ± 0,83
AL – 460	3,34 ± 0,49	87,10 ± 0,67	n.t.	53,96 ± 0,68
AL – 463	2,53 ± 0,61	80,99 ± 0,63	n.t.	45,18 ± 0,59
AL – 467	-	55,11 ± 1,66	n.t.	30,50 ± 0,88
AL – 508	5,30 ± 0,19	85,99 ± 0,72	n.t.	37,58 ± 0,38
Galantamín***	0,606 ± 0,065		15,579 ± 0,065	
Eserín***	0,017 ± 0,001		0,036 ± 0,065	
Huperzín A***	0,008 ± 0,001		>1000	

* testovaná koncentrácia extraktov pre screeningové stanovenie bola 50 µg/ml

** prevádzané u extraktov dosahujúcich pri screeningovom stanovení inhibície > 60 %

***použité štandardy – hodnota cholinesterázovej aktivity štandardu v [µg/ml]

5.2. Výsledky cytotoxickej aktivity

Nasledúca tabuľka (Tabuľka 4) uvádza prehľad cytotoxickej aktivity jednotlivých sumárnych alkaloidných extraktov. Viabilita buniek bola stanovená po 48 hodinovej inkubácii, v prítomnosti jednotlivých sumárnych extraktov o koncentrácii 50 µg/ml.

Tabuľka 4 – Prehľad cytotoxického pôsobenia testovaných sumárnych alkaloidných extraktov voči bunkám nádorových línií

Testovaná vzorka ¹	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5 ²
AL – 450	2	2	22	34	31	28	18	15	20	26
AL – 457	2	3	15	34	26	17	2	11	17	17
AL – 460	1	2	16	30	18	12	2	15	12	11
AL – 463	2	2	15	32	24	15	3	12	15	15
AL – 467	1	3	17	33	21	17	2	13	15	14
AL – 508	1	2	16	32	22	19	3	12	16	16
Doxorubicín ³	2	1	28	50	87	9	15	31	21	22

¹ testovaná koncentrácia 50 µg/ml; ² kontrola – zdravé bunky; ³ štandard

0-25	26-50	51-75	76-100
------	-------	-------	--------

Farebná vysvetlivka k heatmapu (množstvo preživších buniek v % oproti kontrole po 48 hodinovej inkubácii o koncentrácii extraktu 50 µg/ml).

5.3. Identifikácia jednotlivých alkaloidov v sumárnych extraktoch, popis ich štruktúry a prehľad hmotnostných spektier

Nasledujúca podkapitola zhrňuje, formou tabuliek (Tabuľka 5, Tabuľka 6, Tabuľka 7, Tabuľka 8, Tabuľka 9 a Tabuľka 10) a obrázkov (Obrázok 19, Obrázok 20, Obrázok 21, Obrázok 22, Obrázok 23 a Obrázok 24), výsledky štruktúrálnej analýzy alkaloidov z jednotlivých sumárnych extraktov. Ako prvé sú v podkapitole uvedené tabuľky hmotnostných spektier jednotlivých sumárnych extraktov – radené vzostupne podľa čísla sumárneho extraktu. Za nimi nasledujú chromatogramy jednotlivých sumárnych extraktov (radené rovnako ako tabuľky). Na konci podkapitoly je uvedená tabuľka (Tabuľka 11) s percentuálnym zastúpením identifikovaných alkaloidov, na ktorú nadväzuje obrázok (Obrázok 25) s popisom ich štruktúr.

Tabuľka 5 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-450

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,936	287(50) 286(100) 244(19) 216(35) 174(25) 141(9) 128(12) 115(19)	[NIST]
2	Lykoramín	16,091	289(40) 288(100) 202(11) 187(8) 174(6) 161(6) 109(23)	[97]
3	A ₁	16,497	271(50) 253(40) 252(100) 224(35) 199(46) 187(38) 109(39)	-
4	Homolykorínový typ	16,657	300(-) 253(3) 207(2) 191(4) 147(2) 110(7) 109(100) 108(15) 94(2)	[NIST]
5	3-O-demetylmartidín	16,762	273(85) 255(22) 207(29) 202(26) 201(100) 189(31) 175(23)	[98]
6	Martidín	16,831	287(100) 268(41) 254(49) 253(79) 252(59) 224(46) 215(89)	[99]
7	11,12-dehydroanhydrolykorín	17,593	249(62) 248(100) 207(5) 191(8) 190(17) 189(7) 133(5) 123(5)	[98]
8	A ₂	17,803	329(34) 281(25) 270(34) 269(41) 268(100) 240(24) 232(29)	-
9	Pankracín	18,131	287(100) 270(21) 269(29) 264(31) 243(22) 199(29) 185(52)	[98,NIST]
10	Galantín	18,281	317(8) 316(10) 284(8) 268(14) 258(44) 253(9) 243(80) 242(100)	[99,NIST]
11	Lykorín	18,612	287(19) 268(19) 252(12) 250(32) 248(18) 227(59) 226(100)	[NIST]
12	Homolykorínový typ	18,695	249(3) 110(10) 109(100) 108(22) 82(5)	[NIST]
13	Homolykorínový typ	18,847	315(20) 266(29) 248(38) 242(28) 241(56) 240(72) 109(100)	[NIST]
14	A ₃	19,995	295(83) 294(100) 287(10) 250(5) 207(6) 194(6) 178(6) 147(10)	-
15	A ₄	20,150	281(18) 280(48) 265(74) 264(100) 249(19) 248(14) 193(19)	-

Tabuľka 6 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-457

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,947	287(76) 286(100) 270(17) 244(23) 216(25) 174(43) 165(15)	[NIST]
2	Lykoramín	16,096	279(35) 288(100) 216(15) 207(49) 202(30) 165(22) 152(13) 109(39)	[97]
3	Homolykorínový typ	16,273	273(60) 272(69) 230(21) 202(27) 175(11) 174(16) 115(12) 109(100)	[NIST]
4	Homolykorínový typ	16,654	191(6) 110(8) 109(100) 108(14) 94(4) 73(4)	[NIST]
5	A ₅	16,952	329(45) 328(65) 270(35) 269(47) 268(100) 266(22) 256(17) 242(22)	-
6	A ₆	17,207	287(59) 286(100) 270(13) 268(9) 258(17) 243(15) 242(38) 229(9)	-
7	Pluvín	17,270	287(59) 286(48) 268(44) 266(13) 254(10) 243(49) 242(100) 228(10)	[NIST]
8	Assoanín	17,369	267(48) 266(100) 250(19) 222(10) 193(6) 191(6) 180(10) 133(6)	[99,NIST]
9	Hemantamín	17,742	301(10) 273(16) 272(100) 242(15) 240(15) 211(17) 186(16) 181(31)	[99]
10	Dehydroassoanín	18,109	267(13) 265(76) 264(100) 248(14) 220(15) 207(8) 191(17) 178(28)	[NIST]
11	Galantín	18,292	317(15) 316(12) 284(9) 268(15) 266(13) 244(13) 243(85) 242(100)	[99,NIST]
12	Inkartín	18,634	333(28) 332(95) 259(36) 258(100) 253(17) 250(19) 227(20) 226(22)	[99]
13	Homolykorínový typ	18,698	179(2) 110(8) 109(10) 108(25) 107(2) 94(2) 82(3) 81(2) 77(2)	[NIST]
14	A ₇	18,847	315(23) 267(21) 266(21) 265(29) 264(20) 250(14) 241(100) 240(58)	-
15	Homolykorínový typ	19,104	281(46) 265(35) 253(17) 224(8) 208(50) 165(11) 133(16) 109(100)	[NIST]
16	Hippeastrín	19,612	315(-) 281(7) 209(5) 207(6) 193(6) 191(19) 178(6) 126(7) 125(100) 96(36)	[12,99]
17	A ₈	19,777	315(27) 295(51) 294(70) 284(35) 266(35) 208(100) 191(84) 133(62)	-
18	A ₉	19,996	295(86) 294(100) 278(11) 250(9) 194(9) 178(10) 147(11)	-
19	A ₁₀	20,178	341(9) 283(26) 281(34) 280(29) 265(34) 208(100) 191(20) 178(25)	-
20	A ₁₁	20,269	295(100) 294(72) 281(28) 265(42) 264(55) 257(62) 193(33) 133(39)	-

Tabuľka 7 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-460

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,953	287(76) 286(100) 270(17) 244(24) 230(14) 216(44) 174(45) 115(28)	[NIST]
2	Lykoramín	16,102	289(54) 288(100) 232(8) 202(16) 187(14) 175(13) 115(20) 109(96)	[97]
3	Homolykorínový typ	16,276	287(4) 286(5) 175(8) 115(3) 110(8) 109(100) 108(14) 94(4) 77(3)	[NIST]
4	Narwedín	16,574	286(20) 285(96) 284(100) 216(18) 199(17) 174(55) 128(35) 115(28)	[99,NIST]
5	A ₁₂	16,834	265(53) 264(31) 209(6) 208(6) 207(8) 191(7) 103(12) 94(100)	-
6	A ₁₃	16,933	281(60) 271(50) 252(45) 227(35) 226(100) 109(78) 108(25) 94(25)	-
7	Homolykorínový typ	17,102	283(4) 267(4) 250(4) 207(8) 191(5) 110(7) 109(100) 108(21) 94(8)	[NIST]
8	Norpluvín	17,483	273(39) 272(33) 254(20) 240(7) 229(36) 228(100) 214(10) 109(12)	[99]
9	11,12-dehydroanhydrolykorín	17,596	249(44) 248(100) 190(25) 163(3) 123(5) 95(13) 73(13)	[98]
10	Hipeastrín	17,858	253(7) 249(5) 207(55) 175(18) 126(7) 125(100) 96(31) 94(9) 77(7)	[12,99]
11	Homolykorínový typ	18,237	281(5) 162(2) 134(2) 110(6) 109(100) 108(27) 107(2) 82(3) 81(2)	[NIST]
12	Lykorín	18,596	287(19) 286(15) 268(17) 252(11) 250(26) 227(63) 226(100) 135(11)	[NIST]
13	Pseudolykorín	19,134	289(24) 288(11) 270(11) 229(62) 228(100) 214(9) 209(13) 147(9)	[97]

Tabuľka 8 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-463

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,953	287(73) 286(100) 270(13) 244(22) 216(34) 174(39) 165(16) 128(15)	[NIST]
2	11,12-dehydroanhydrolykorín	17,599	249(55) 248(100) 191(12) 190(20) 163(7) 123(10) 95(23)	[98]
3	Tazettín	17,839	331(14) 316(8) 298(10) 281(23) 247(100) 225(29) 181(16) 152(31)	[NIST]
4	Pankracín	18,143	287(100) 286(20) 270(23) 243(17) 223(40) 214(26) 199(38) 185(45)	[NIST]
5	Lykorín	18,651	287(18) 286(14) 268(19) 250(34) 248(33) 227(57) 226(100) 147(12)	[NIST]

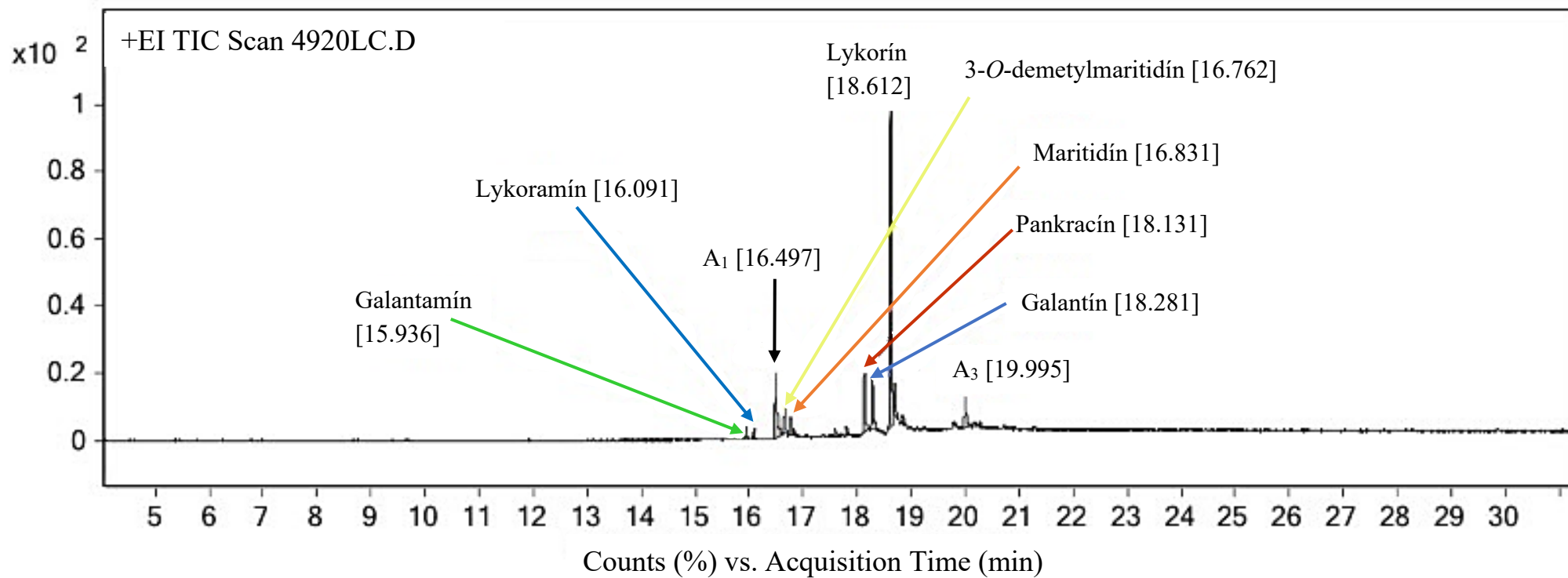
Tabuľka 9 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-467

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,939	287(43) 286(100) 270(13) 244(19) 216(26) 207(31) 174(32) 115(17)	[NIST]
2	Hemantamín	17,748	301(10) 273(18) 272(100) 240(15) 214(17) 186(17) 181(30) 128(17)	[99]
3	Lykorín	18,604	287(19) 286(11) 268(15) 250(30) 249(15) 248(24) 227(40) 226(100)	[NIST]
4	Homolykorínový typ	18,709	178(2) 110(8) 109(100) 108(22) 107(1) 94(3) 93(2) 82(3)	[NIST]
5	A ₁₄	19,601	279(59) 278(100) 235(12) 178(18) 177(12) 133(9) 109(10)	-

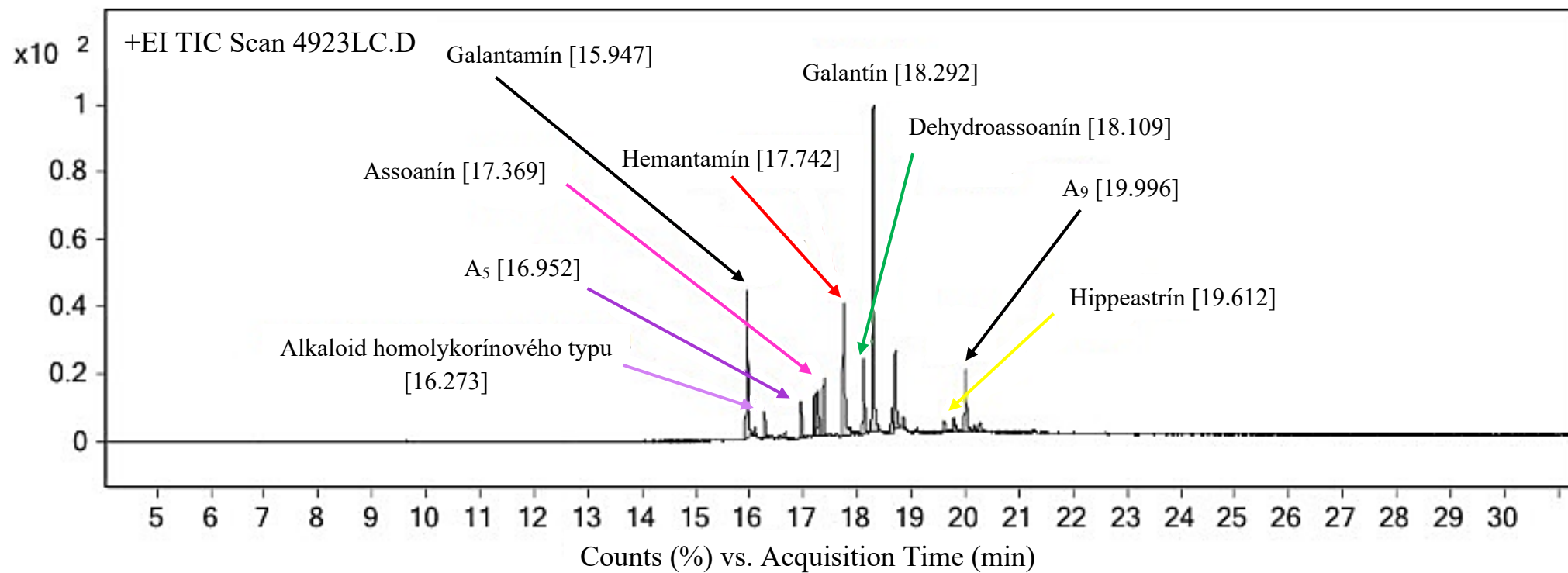
Tabuľka 10 – Alkaloidy identifikované v sumárnom extrakte AL-508

Názov alkaloidu		RT	[M ⁺] m/z [%]	
1	Galantamín	15,953	287(75) 286(100) 270(15) 244(24) 216(41) 174(44) 165(20) 115(29)	[NIST]
2	A ₁₅	16,361	287(90) 269(76) 253(45) 223(73) 217(100) 199(57) 174((49) 165(96)	-
3	A ₁₆	16,417	301(100) 286(54) 270(25) 269(91) 246(31) 231(75) 217(25) 115(83)	-
4	A ₁₇	18,142	287(64) 272(100) 253(38) 223(61) 199(42) 185(66) 165(43) 141(32)	-
5	A ₁₈	18,438	329(45) 270(38) 268(71) 252(66) 224(42) 223(100) 194(43) 165(77)	-
6	Lykorín	18,64	287(19) 268(19) 250(31) 227(59) 226(100) 191(6) 147(12) 77(8)	[NIST]
7	A ₁₉	18,758	329(33) 270(100) 269(32) 252(50) 250(45) 249(37) 223(61) 248(59)	-

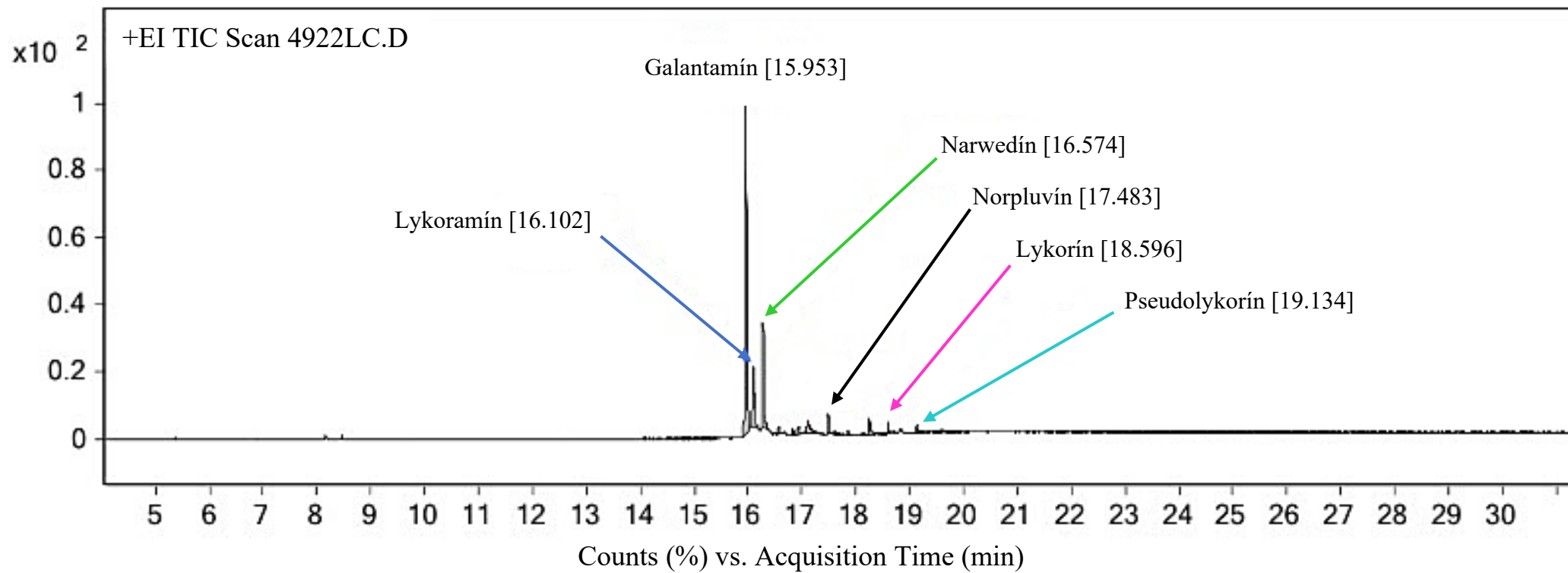
Obrázok 19 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-450



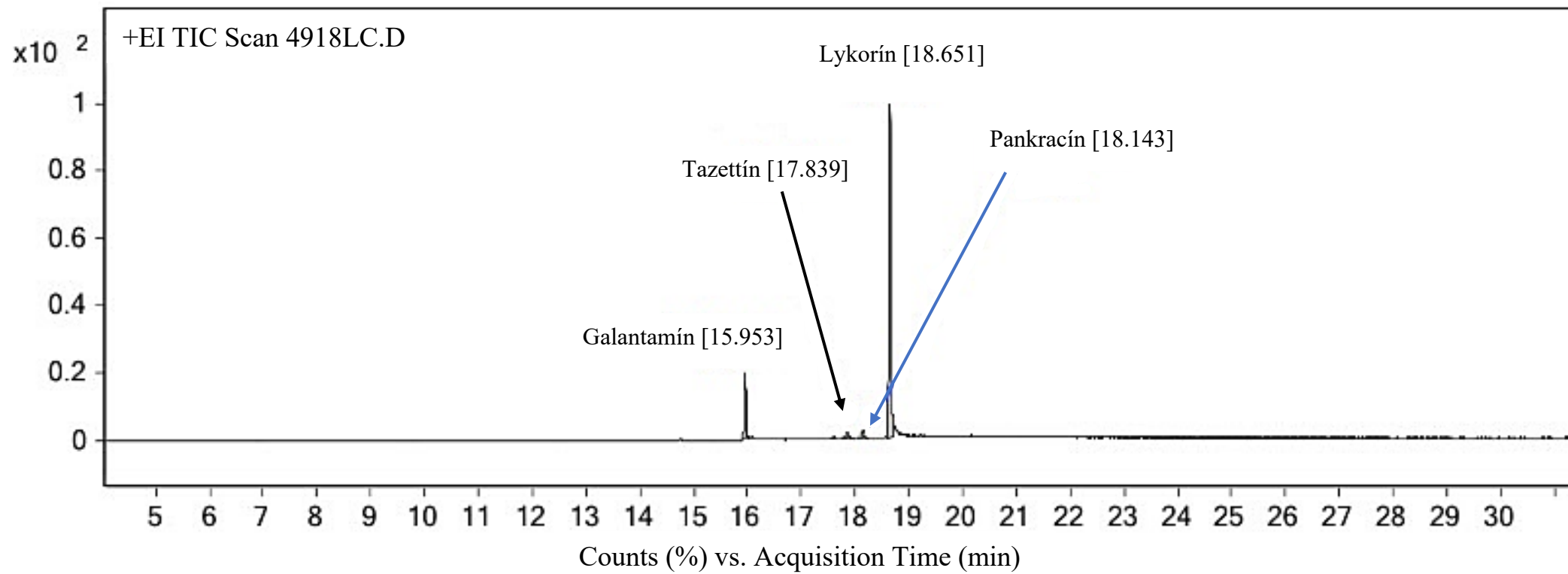
Obrázok 20 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-457



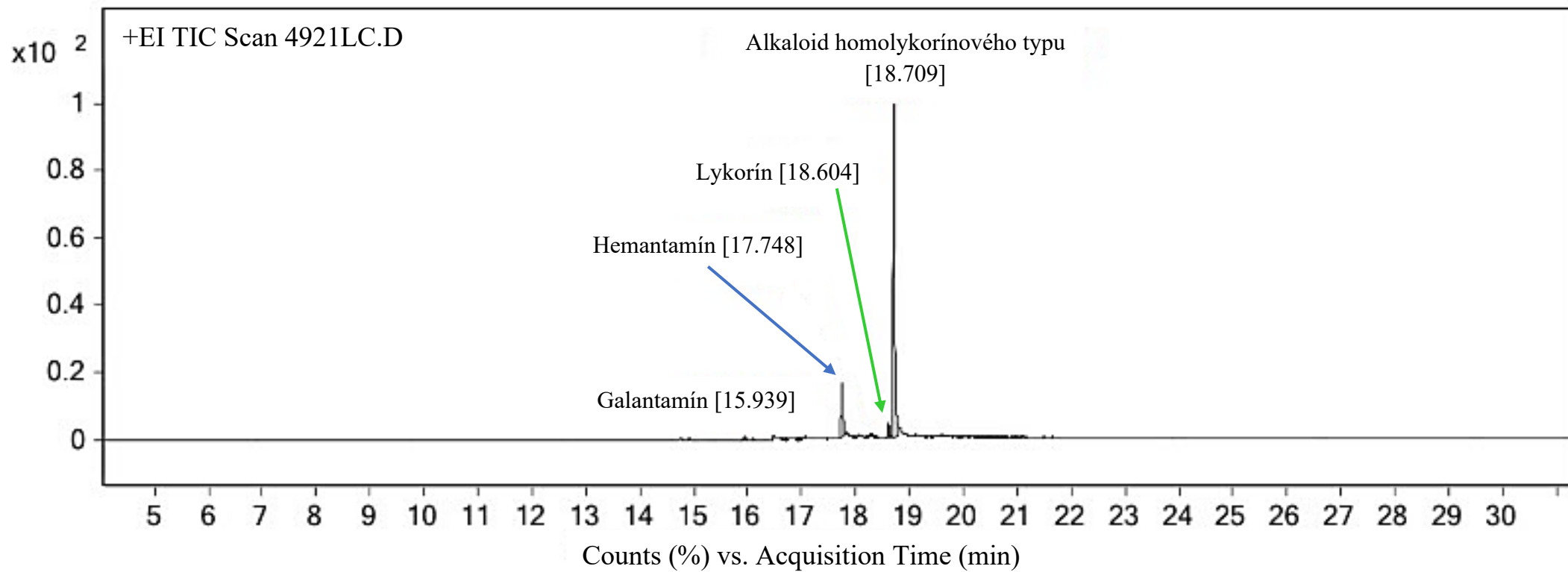
Obrázok 21 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-460



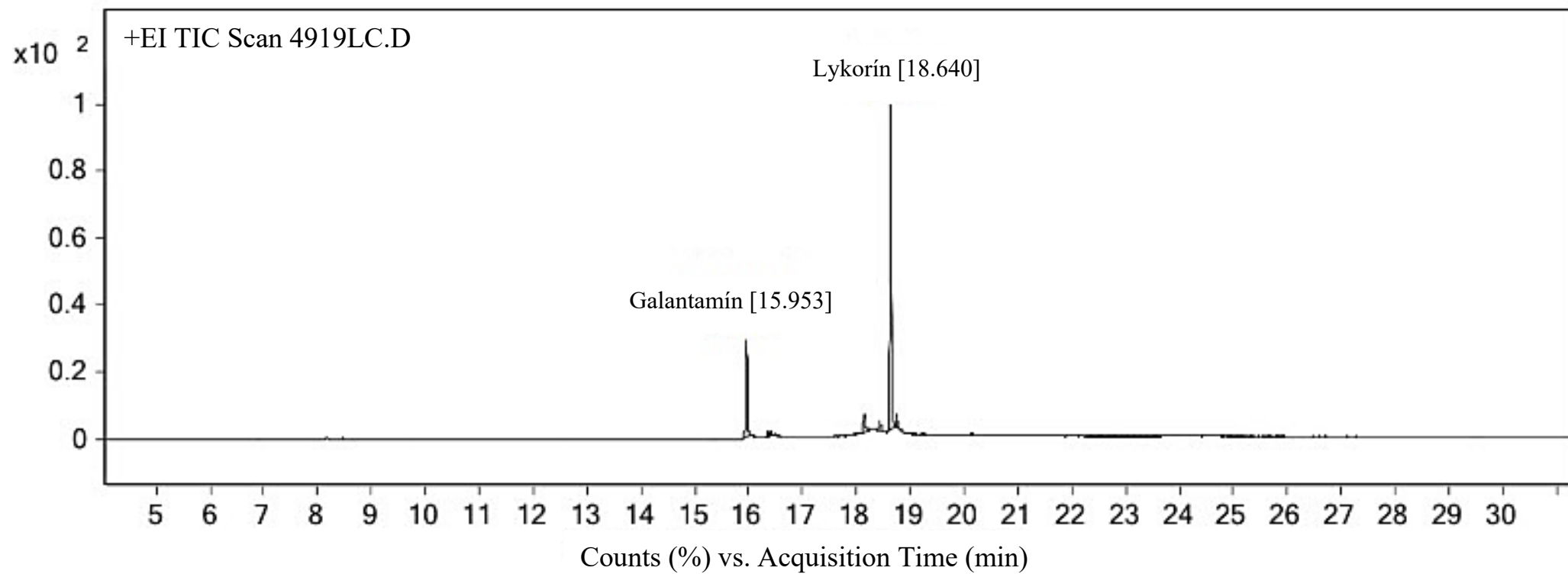
Obrázok 22 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-463



Obrázok 23 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-467

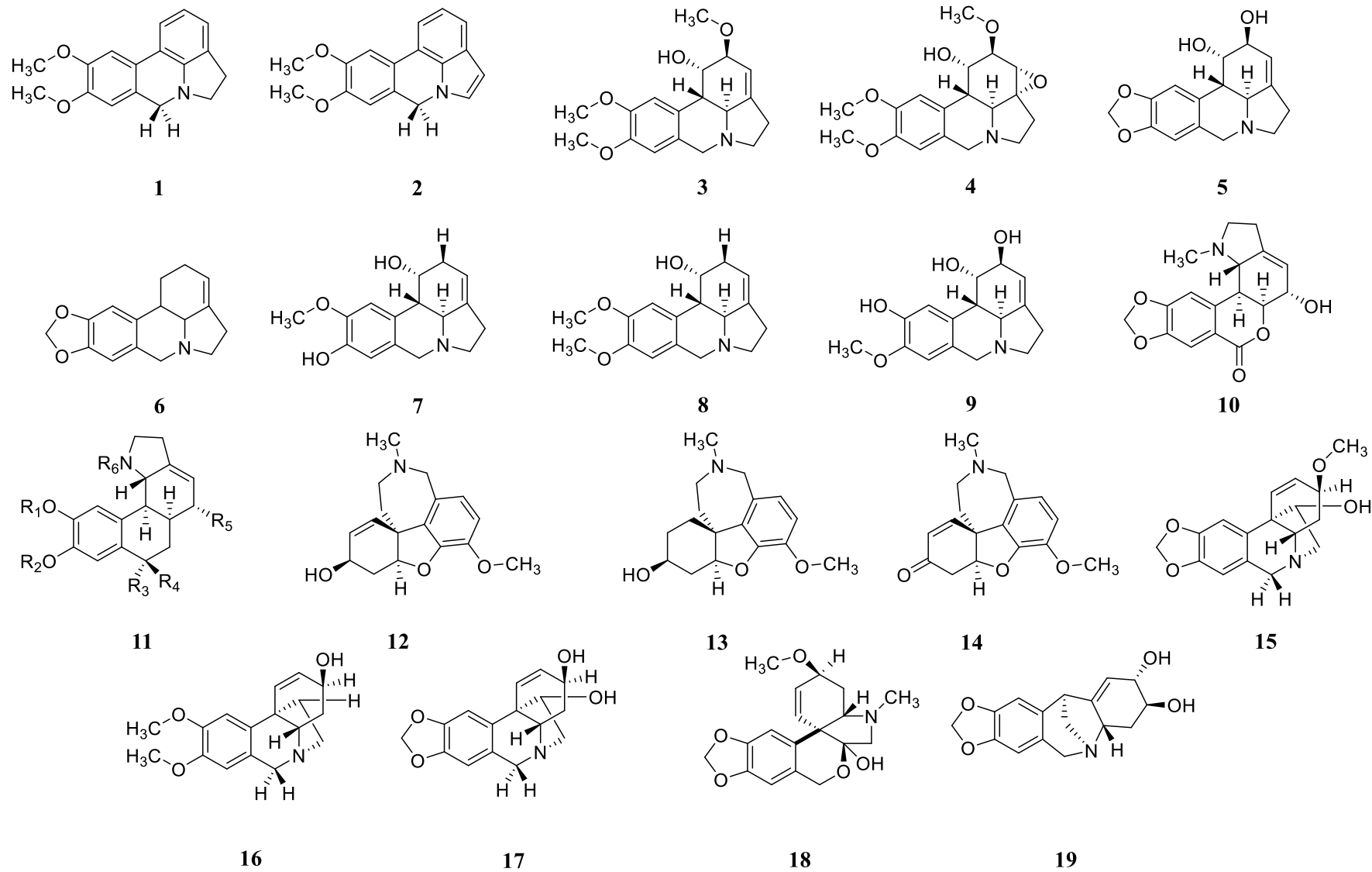


Obrázok 24 – Chromatogram sumárneho extraktu AL-508



Tabuľka 11 – Percentuálne zastúpenie jednotlivých alkaloidov prítomných v sumárnych extraktoch

Štruktúrny typ	Číslo obrázku	Alkaloid	Obsah alkaloidov v sumárnom extrakte [%]					
			AL-450	AL-457	AL-460	AL-463	AL-467	AL-508
Lykorínový	1	Assoanín	-	4	-	-	-	-
	2	Dehydroassoanín	-	6	-	-	-	-
	3	Galantín	9	26	-	-	-	-
	4	Inkartín	-	3	-	-	-	-
	5	Lykorín	44	-	2	80	4	66
	6	11,12-dehydroanhydrolykorín	< 1	-	< 1	?	-	-
	7	Norpluvín	-	-	3	-	-	-
	8	Pluvín	-	3	-	-	-	-
	9	Pseudolykorín	-	-	1	-	-	-
Homolykorínový	10	Hippeastrín	-	< 1	< 1	-	-	-
	11	Alkaloid homolykorínového typu	3	2	6	-	81	-
Galantamínový	12	Galantamín	1	13	64	15	?	19
	13	Lykoramín	1	< 1	11	-	-	-
	14	Narwedín	-	-	1	-	-	-
Hemantamínový	15	Hemantamín	-	14	-	-	13	-
	16	Maritidín	< 1	-	-	-	-	-
	17	3-O-demetylmartidín	2	-	-	-	-	-
Tazettínový	18	Tazettín	-	-	-	3	-	-
Montanínový	19	Pankracín	9	-	-	2	-	-



Obrázok 25 – Prehľad štruktúr izolovaných alkaloidov [49]

6. Diskusia a záver

Jedným z hlavných problémov súčasnosti sú chronické neprenosné ochorenia ako AD a onkologické ochorenia, ktoré po kardiovaskulárnych ochoreniach predstavujú druhú najčastejšiu príčinu úmrtí v ČR. Za účelom ich liečby je podrobovaných výskumu mnoho prírodných látok. Predmetom aktívneho výskumu, trvajúceho už viac než 200 rokov, je farmaceuticky významná čeľaď Amaryllidaceae, vďaka obsahu špecifickej skupiny alkaloidov, známych ako AmA. Mnoho týchto alkaloidov bolo izolovaných (viac než 500) a testovaných na rôzne biologické aktivity. Medzi známe aktivity poskytované týmito alkaloidmi patrí antibakteriálna, antimikróbna, antifungálna, antimalarická, antiflogistická a analgetická, pričom k tým najvýznamnejším patrí inhibičná aktivita voči humánnym cholinesterázam, ktorá je kľúčová v liečbe AD a aktivita protinádorová.

Jedným z hlavných cieľov tejto diplomovej práce bolo získanie sumárnych alkaloidných extraktov z cibúľ piatich kultivárov rodu *Narcissus* L. (*Narcissus* cv. Acropolis, Delta, White Marvel, Kedron, Scarlet Gem) a jednej variety (*Narcissus albus* var. *plenus odoratus*), pod označením AL-450, AL-457, AL-460, AL-463, AL-467 a AL-508. Zo sumárnych extraktov boli následne pripravené vzorky pre prevedenie GC-MS analýzy a stanovenie ich biologickej aktivity, konkrétne schopnosti inhibovať *hAChE*, *hBuChE* a cytotoxickej aktivity.

Alkaloidy boli identifikované prevedením GC-MS analýzy, na základe porovnávania ich hmotnostných spektier so spektrami dostupnými v literatúre, pričom celkovo bolo identifikovaných 18 alkaloidov. Prehľad výsledkov GC-MS analýzy sa nachádza v podkapitole 5.3. K identifikovaným alkaloidom lykorínového štruktúrneho typu patria alkaloidy 11,12-dehydroanhydrolykorín, assoasín, dehydroassoanín, galantín, inkartín, lykorín, norpluvín, pluvín a pseudolykorín, pričom zároveň sa jedná o najviac zastúpenú skupinu identifikovaných alkaloidov v sumárnych extraktoch. Medzi ďalšie identifikované alkaloidy patrí hippeastrín (homolykorínový štruktúrny typ), galantamín, lykoramín, narwedín (galantamínový štruktúrny typ), hemantamín, maritidín, 3-*O*-demetylmaritidín (hemantamínový štruktúrny typ), tazettín (tazettínový štruktúrny typ) a pankracín (montanínový štruktúrny typ). Prehľad štruktúr identifikovaných alkaloidov je možné nájsť na Obrázok 25. U bližšie nedefinovaných alkaloidov, uvedených ako „homolykorínový typ“, ktorých hmotnostné spektrá obsahovali charakteristický ión s hodnotou *m/z* 109, nebolo možné bližšie určiť štruktúru na základe prevedenia GC-MS analýzy a k ich bližšej identifikácii

by bolo potrebné previesť elektrosprejovú ESI-MS analýzu, nakoľko sa jedná o šetrnejšiu ionizačnú techniku. Ďalšie alkaloidy sa mi bližšie určiť nepodarilo, u niektorých (A₂, A₅, A₇, A₈, A₁₀, A₁₆, A₁₈, A₁₉) sa ale na základe porovnávania ich hmotnostných spektier môže jednať o acetylované deriváty, kvôli prítomnosti charakteristických iónov s hodnotou *m/z* 315, 329 a 341, alkaloidy doposiaľ neidentifikované alebo o nečistoty.

Prostredníctvom Ellmanovej spektrofotometrickej metódy bolo u sumárnych alkaloidných extraktov prevedené screeningové stanovenie (*c* = 50 µg/ml) cholinesterázovej inhibičnej aktivity voči *hAChE* a *hBuChE*. Alkaloidné extrakty AL-457, AL-460, AL-463 a AL-508 vykazovali inhibičnú aktivitu voči *hAChE* dosahujúcu viac než 60 %. U týchto extraktov bolo zároveň prevedené stanovenie hodnoty IC₅₀. Prehľad spracovania výsledkov inhibičnej aktivity testovaných extraktov voči *hAChE* a *hBuChE* je možné nájsť v Tabuľka 3. Výsledky stanovenia boli následne porovnávané s hodnotami štandardných látok (v µg/ml) galantamínom, Huperzínom A a eserínom. Na základe porovnania bol ako najúčinnjší vyhodnotený extrakt AL-463, s hodnotou IC₅₀ (*hAChE*) = 2,53 ± 0,61 µg/ml, ktorá môže byť spojená s vyšším obsahom galantamínu a prítomnosťou tazettínu, u ktorého bola inými štúdiami taktiež preukázaná určitá inhibičná aktivita [56]. Všeobecne sa uvádza, že schopnosť inhibovať *hAChE* je daná predovšetkým obsahom alkaloidov galantamínového a lykorínového štruktúrneho typu [99]. Extrakt AL-457 vykazoval z vyššie zmienených aktívnych extraktov najnižšiu aktivitu voči *hAChE* (IC₅₀ = 9,69 ± 1,24 µg/ml), čo môže súvisieť s nízkym obsahom galantamínu a obsahom alkaloidov lykorínového štruktúrneho typu, ktoré sú všeobecne slabšími inhibítormi cholinesteráz. K zvýšeniu schopnosti inhibovať *hAChE* však môže prispievať aj obsah assoanínu, ktorý v porovnaní s galantamínom vykazuje štvornásobne nižšiu aktivitu [10]. Druhú najúčinnjšiu inhibičnú aktivitu voči *hAChE* z testovaných extraktov vykazoval extrakt AL-460 (IC₅₀ = 3,34 ± 0,49 µg/ml), ktorý má zo zmienených extraktov najvyšší obsah galantamínu, približne 64 %. Prehľad percentuálneho zastúpenia identifikovaných alkaloidov v jednotlivých alkaloidných extraktoch je možné nájsť v Tabuľka 11. Kultiváry *Narcissus* cv. Acropolis, *Narcissus* cv. Kedron a varieta *Narcissus albus* var. *plenus odoratus*, by zároveň mohli byť využité, vďaka vysokému obsahu galantamínu a lykorínu v ich sumárnych extraktoch, k izolácii týchto alkaloidov, za účelom ďalšieho výskumu či prípravy polosyntetických derivátov.

Ďalšou, aktívne sledovanou aktivitou AmA, je ich schopnosť inhibovať rast nádorovo transformovaných buniek. Jednou z výrazných výhod týchto alkaloidov je ich pomerne vysoká selektivita k nádorovo transformovaným bunkám a nízka toxicita voči bunkám zdravým

a kľudovým. Najvýznamnejšou cytotoxickou aktivitou sa vyznačujú alkaloidy lykorínového, pankratistatínového, hemantamínového a krininového štruktúrneho typu [4,87]. Prevedením screeningu cytotoxickej aktivity *in vitro* ($c = 50 \mu\text{g/ml}$), prostredníctvom WST-1 metódy, vykazovali všetky testované extrakty veľmi sľubnú cytotoxickú aktivitu voči použitému panelu 10 bunčných línií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2). Z dôvodu stanovenia toxicity testovaných alkaloidných extraktov voči zdravým bunkám, bola pri screeningu využitá bunčná línia zdravých pľúcnych fibroblastov (MRC-5). Prehľad výsledkov cytotoxického pôsobenia testovaných alkaloidných extraktov voči bunkám nádorových línií je možné nájsť v Tabuľka 4. Táto vysoká cytotoxická aktivita testovaných extraktov je pravdepodobne daná obsahom alkaloidov vyznačujúcich sa pomerne významnou protinádorovou aktivitou ako je lykorín, pseudolykorín, hemantamín či pankracín. Práve alkaloid lykorín, ktorý bol identifikovaný v piatich testovaných extraktoch, u troch (AL-450, AL-463, AL-508) s pomerne vysokým percentuálnym zastúpením, vykazuje sľubné protinádorové účinky voči širokému spektru nádorových línií a jeho derivát pseudolykorín, ktorý sa podarilo identifikovať v jednom extrakte (AL-460), bol navrhnutý ako prototyp v terapii metastázujúcich multi-drug rezistentných nádorových buniek. Schopnosťou inhibovať rast a indukovať apoptózu nádorových buniek sa vyznačuje alkaloid hemantamín [11], ktorý bol identifikovaný v dvoch testovaných extraktoch (AL-457 a AL-467). V alkaloidom extrakte AL-463 sa podarilo identifikovať alkaloidy tazettín a pankracín, ktorý dokázal, testovaním na paneli nádorových bunčných línií zhodných s panelom použitým v tejto práci, inhibovať rast všetkých línií, s výnimkou línie PANC-1, s hodnotami IC_{50} od $2,20 \mu\text{M}$ (SAOS-2) do $5,15 \mu\text{M}$ (MRC-5) [100]. Prevádzaním štúdií zameraných na protinádorovú aktivitu AmA bolo zistené, že tazettín vykazuje iba slabú protinádorovú aktivitu a cennejší je jeho biosyntetický prekursor pretazettín [4], ktorý v testovaných extraktoch nebol identifikovaný. Ako už bolo uvedené v predchádzajúcich častiach tejto práce, kultiváry rodu *Narcissus* sú aktívne podrobované testovaniu na ich biologické aktivity. Za účelom stanovenia biologických aktivít bol na našej katedre podrobený výskumu aj kultivár *Narcissus* L. cv. Professor Einstein, ktorý vykazoval na paneli bunčných línií zhodným s panelom použitým v tejto práci, pomerne sľubnú cytotoxickú aktivitu [100].

V závere je možné zhrnúť, že kultiváry rodu *Narcissus* L. sú bohatým zdrojom biologicky cenných alkaloidov, vyznačujúcich sa širokým spektrom poskytovaných biologických aktivít, pričom niektoré z nich sú nevyhnutné pre liečbu chronických neprenosných ochorení, predstavujúcich jeden z najzložitejších problémov súčasnosti. Zároveň sa tieto kultiváry stávajú

zdrojom k izolácii jednotlivých alkaloidov v množstvách, ktoré sú potrebné pre prevádzanie podrobnejších biologických štúdií a prípravy semisyntetických látok, s cieľom získať ďalšie látky, ktoré by bolo možné využiť v terapii týchto ochorení.

7. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Ústav: Katedra farmaceutické botaniky (16-16130)

Riešiteľ: Tkáčová Beáta

Školiteľ: PharmDr. Kateřina Breiterová, Ph.D.

Názov práce: Alkaloidy kultivárov rodu *Narcissus* a ich biologická aktivita I.

Kľúčové slová: *Narcissus*, alkaloidy, biologická aktivita, Alzheimerova choroba.

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo získanie sumárnych alkaloidných extraktov z cibúľ piatich kultivárov (*Narcissus* cv. Acropolis, Delta, White Marvel, Kedron, Scarlet Gem) a jednej variety (*Narcissus albus* var. *plenus odoratus*), pod označením AL-450, AL-457, AL-460, AL-463, AL-467, AL-508, z ktorých boli následne pripravené vzorky pre GC-MS analýzu a screeningové stanovenie biologických aktivít (inhibícia cholinesteráz a cytotoxicita).

Na základe GC-MS analýzy bolo identifikovaných celkovo 18 alkaloidov porovnávaním ich hmotnostných spektier. Medzi identifikované alkaloidy patria 3-*O*-demetylmartidín, 11,12-dehydroanhydrolykorín, assoanín, dehydroassoanín, galantamín, galantín, hemantamín, hippeastrín, inkartín, lykoramín, lykorín, martidín, narwedín, norpluvín, pankracín, pluvín, pseudolykorín a tazettín.

Vzorky kultivárov AL-457, AL-460, AL-463 a AL-508 vykazovali pri screeningovom stanovení ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) pomerne sľubnú inhibičnú aktivitu voči *hAChE*, pravdepodobne vďaka vyššiemu obsahu galantamínu. U týchto extraktov bolo zároveň prevedené stanovenie hodnoty IC_{50} . Výsledky boli porovnávané s hodnotami štandardných látok galantamínom, Huperzínom A a eserínom. Na základe porovnania, bol ako najúčinnjší, vyhodnotený extrakt kultiváru AL-463 s hodnotou $IC_{50} (hAChE) = 2,53 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$. Pri screeningu cytotoxickej aktivity ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) vykazovali všetky testované extrakty veľmi sľubnú cytotoxickú aktivitu voči použitému panelu 10 bunčných línií. Táto vysoká aktivita môže byť daná obsahom známych cytotoxických alkaloidov, ako je hemantamín, lykorín či pseudolykorín.

8. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Botany (16-16130)

Author: Tkáčová Beáta

Supervisor: PharmDr. Kateřina Breiterová, Ph.D.

Title of thesis: Alkaloids of *Narcissus* species cultivars and their biological activity I.

Key words: Narcissus, alkaloids, biological activity, Alzheimer's disease.

The main aim of this diploma thesis was to obtain summary alkaloid extracts from bulbs of five species cultivars (*Narcissus* cv. Acropolis, Delta, White Marvel, Kedron, Scarlet Gem) and one variety (*Narcissus albus* var. *plenus odoratus*), labeled as AL-450, AL-457, AL-460, AL-463, AL-467 and AL-508, from which samples were subsequently prepared for GC-MS analysis and screening of biological activities (cholinesterase inhibitory activity and cytotoxicity).

Totally, 18 alkaloids were identified by GC-MS analysis, comparing their mass spectra. Identified alkaloids include 3-*O*-demethylmaritidine, 11,12-dehydroanhydrolycorine, assoanine, dehydroassoanine, galanthamine, galanthine, haemanthamine, hippeastrine, incartine, lycoramine, lycorine, narwedine, norpluvine, pancracine, pluvine, pseudolycorine and tazettine.

Samples of cultivars AL-457, AL-460, AL-463 and AL-508, showed relatively promising *hAChE* inhibitory activity in screening assay ($c = 50 \mu\text{g/ml}$), presumably due to the higher content of galanthamine. The IC_{50} determination was also performed in these extracts. The results were compared with the values of standard substances galanthamine, Huperzine A and eserine. Based on the comparison, the cultivar extract AL-463 with $\text{IC}_{50}(\textit{hAChE}) = 2,53 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$, was evaluated as the most effective. By performing cytotoxic activity screening ($c = 50 \mu\text{g/ml}$), all tested extracts showed very promising cytotoxic activity against the panel of 10 cell lines used. This high activity may be given due to the content of known cytotoxic alkaloids, such as haemanthamine, lycorine and pseudolycorine.

9. Použitá literatura

1. Dohnal, F. (2014). *Studijní texty k dějinám farmacie*. Praha: Karolinum.
2. Bauer Petrovska, B. (2012). Historical Review of Medicinal Plants usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6, strany 1-5. doi:doi.org/10.4103/0973-7847.95849
3. Šafratová, M., Hošťálková, A., Hulcová, D., et. al. (2018). Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*, 41, strany 208-218. doi:doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4
4. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., et. al. (2013). Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 107, strany 701-708. Stiahnuté z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/614/614>
5. Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., et. al. (2016). Alkaloidy. V *Farmakognozie*, strany 193-255. Praha: Karolinum.
6. Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., et. al. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. V *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (strany 66-100). Kerala: Transworld Research Network.
7. Fürst, R. (2016). Narciclasine - an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica*, 82, strany 1389-1394. doi:doi.org/10.1055/s-0042-115034.
8. *Zdravotnická ročenka České republiky 2018*. (2019). Stiahnuté 31. Máj 2020, z ÚZIS: <https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdrroccz-2018.pdf>
9. Hulcová, D., Maříková, J., Korábečný, J., et. al. (2019). Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 165. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.11205
10. López, S., Bastida, J., Viladomat, F., et. al. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Science*, 71, strany 2521-2529. doi:doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9

11. Torras-Claviera, L., Berkov, S., Codina, C., et. al. (2014). Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC–MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops and Products*, 56, strany 211-222. doi:doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.008/
12. Tarakemeh, A., Azizi, M., Rowshan, V., et. al (2019). Screening of Amaryllidaceae alkaloids in bulbs and tissue cultures of *Narcissus papyraceus* and four varieties of *N. tazetta*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, strany 230-237. doi:doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.043
13. Jahodář, L. (2012). *Farmakobotanika: Semenné rostliny*. Praha: Karolinum.
14. Grulich, V. (2020). *Botany*. Stiahnuté 10. Marec 2020, z Amaryllidaceae J. St.-Hil. - amarylkovitě: <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/>
15. Zhong, J. (2013). Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Products Reports*, 6, strany 849-868. doi:doi.org/10.1039/C3NP70005D
16. Havelek, R., Muthna, D., Tomsik, P., et. al. (2017). Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions*, strany 121-132. doi:doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.018
17. Grulich, V. (2013). *AMARYLLIS BELLADONNA L. – zornice*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/amaryllis-belladonna/>
18. Hoskovec, L. (2018). *CLIVIA CAULESCENS R. A. Dyer – klívie*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/clivia-caulescens/>
19. Svobodová, V. (2011). *CRINUM ASIATICUM L. – křín*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/crinum-asiaticum/>
20. Rencová, E. (2011). *NARCISSUS BULBOCODIUM L. – narcis*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/narcissus-bulbocodium/>
21. Hoskovec, L. (2017). *GALANTHUS ELWESII Hook. f. – sněžienka Elwesova/snežienka*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/galanthus-elwesii/>

22. Kovář, L. (2007). *LEUCOJUM AESTIVUM L.* – *bledule letní / bleduľa letná*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Botany: <https://botany.cz/cs/leucojum-aestivum/>
23. Graham, S. W., Barrett, S. C. (2004). Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*, 91, strany 1007-1021. doi:doi.org/10.3732/ajb.91.7.1007
24. Štěpánková, J. (2011). *Květena České republiky 8*. Praha: Academia.
25. Kaplan, Z. (2019). *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia.
26. Bryan, J. (2010). *Cibuloviny - Kapesní atlas*. Praha: Knižní klub.
27. Hanks, R. G. (2002). The biology of *Narcissus*. V *Narcissus and Daffodil* (strany 1-18). Taylor & Francis, London.
28. *The American Daffodil Society*. (nedatované). Stiahnuté 17. Jún 2020, z <https://daffodilusa.org/daffodil-info/daffodil-divisions-cultivars/>
29. Zicha, O., Hroneš, M. (2013). *Rod Narcissus L.* Stiahnuté 14. Máj 2020, z Biolib: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id42016/>
30. *Acropolis*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detailpage/?cultivar=Acropolis>
31. *Narcissus Acropolis*. (nedatované). Stiahnuté 15. Jún 2020, z Farmergracy: <https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-acropolis-bulbs-uk>
32. *Delta*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Delta&pagenum1=1&which=hist1>
33. Koníček, J. (nedatované). *Narcis DELTA*. Stiahnuté 18. Máj 2020, z Lukon-Glads: <http://www.lukon-glads.cz/narcis-delta-p-877>
34. Louise. (nedatované). *Daffodil Bicolor Delta*. Stiahnuté 15. Jún 2020, z Sierraflowerfinder: <http://www.sierraflowerfinder.com/en/d/daffodilbicolordelta/9882>
35. *White Marvel*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=White%2520Marvel>

36. Koníček, J. (nedatované). *Narcis WHITE MARVEL*. Stiahnuté 18. Máj 2020, z Lukon-Glads: <http://www.lukon-glads.cz/narcis-white-marvel-p-897>
37. *Daffodil White Marvel*. (nedatované). Stiahnuté 15. Jún 2020, z Tuliplovers: <https://www.tuliplovers.com/daffodils/21380--daffodil-white-marvel.html>
38. *Kedron*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Kedron&auto=1>
39. *Daffodil Kedron*. (nedatované). Stiahnuté 15. Jún 2020, z Dutchgrown: <https://www.dutchgrown.com/products/daffodil-kedron>
40. *Scarlet Gem*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Scarlet%20Gem&auto=1>
41. Koníček, J. (nedatované). *Narcis SCARLET GEM*. Stiahnuté 18. Máj 2020, z Lukon-Glads: <http://www.lukon-glads.cz/narcis-scarlet-gem-p-911>
42. *Narcissus Scarlet Gem*. (nedatované). Stiahnuté 15. Jún 2020, z Farmergracy: <https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-scarlet-gem-bulbs-uk>
43. *Plenus*, (nedatované). Stiahnuté 18. Máj 2020, z Daffseek: <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Plenus&pagenum1=1&which=hist1>
44. *NARCISSUS ALBUS PLENUS ODORATUS*. (nedatované). Stiahnuté 15. Jún 2020, z Johnscheepers: <https://www.johnscheepers.com/narcissus-albus-plenus-odoratus.html>
45. Berkov, S., Martínez-Francés, V., Bastida, J., et. al. (2014). Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*, 99, strany 95-106. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.11.002
46. Dweck, A. (2002). The folklore of *Narcissus*. V *Narcissus and Daffodil* (strany 19-29). London: Taylor & Francis.
47. Koutová, D., Maafi, N., Havelek, R., et. al. (2020). Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules*, 25. doi:doi.org/10.3390/molecules25102337
48. Desgagné-Penix, I., Singh, A. (2014). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*, 1, strany 114-120. doi:doi.org/10.14719/pst.2014.1.3.41

49. Berkov, S., Osorio, E., Viladomat, F., et. al. (2020). Chapter Two - Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. V *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (strany 113-185). London: Academic Press. doi:doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002
50. Reis, A., Magne, K., Massot, S., et. al. (2019). Amaryllidaceae alkaloids: indentification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Scientific Reports*, 9. doi:doi.org/10.1038/s41598-019-44746-7
51. Hotchandani, T., Desgagné-Penix, I. (2017). Heterocyclic Amaryllidaceae Alkaloids: Biosynthesis and Pharmacological Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17, strany 418-427. doi:doi.org/10.2174/15680266166666160824104052
52. Pigni, N., Ríos-Ruis, S., Luque, F., et. al. (2013). Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrane alkaloids. *Phytochemistry*, 95, strany 384-393. doi:doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.010
53. Bastida, J., Viladomat, J., Labres, J., et. al. (1989). *Narcissus* Alkaloids, VIII. Mesembrenone: An Unexpected Alkaloid From *Narcissus pallidulus*. *Journal of Natural Products*, 52, strany 478-480. doi:doi.org/10.1021/np50063a003
54. Zhong, J. (2009). Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 26, strany 361-381. doi:doi.org/10.1039/B718044F
55. Khalifa, M., Attia, E., Fahim, J., et. al. (2018). An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal Of Advance Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1, strany 41-49. doi:doi.org/10.21608/JABPS.2018.4088.1016
56. Elgorashi, E., Stafford, G., Staden, J. (2004). Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*, 70, strany 260-262. doi:doi.org/10.1055/s-2004-818919
57. Şener, B., Orhan, I., Satayavivad, J. (2003). Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*, 17, strany 1220-1223. doi:doi.org/10.1002/ptr.1346

58. Kang, J., Zhang, Y., Cao, X., et. al. (2012). Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *International Immunopharmacology*, 12, strany 249-256. doi:doi.org/10.1016/j.intimp.2011.11.018
59. Habartová, K., Cahlíková, L., Řezáčová, M. et. al. (2016). The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications*, 11, strany 1587-1594. doi:doi/pdf/10.1177/1934578X1601101038
60. Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. (2006). Chapter 3 – Chemical and Biological Aspects of *Narcissus* alkaloids. V *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, strany 87-179. London: Academic Press. doi:doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63003-4
61. Goietsenoven, G., Andolfi, A., Lallemand, B., et. al. (2010). Amaryllidaceae Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 73, strany 1223-1227. doi:doi.org/10.1021/np9008255
62. Fürst, R. (2016). Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta*, 82, strany 1389-1394. doi:doi.org/10.1055/s-0042-115034
63. Mátl, O., Mátlová, M., Holmerová, I. (2016). *Zprávy o stavu demence*. Stiahnuté 9. Júl 2020, z <http://www.alzheimer.cz/res/archive/004/000480.pdf?seek=1492589048>
64. Dvořák, K. *Degenerativní onemocnění mozku a míchy*. Stiahnuté 9. Júl 2020, z Atlases: https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+degenecns.html#degenerpatol+degenerkura+alz
65. Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., et. al. (2017). Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurología*, 32, strany 523-532. doi:doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016
66. Holmerová, I., Jarolímová, E., Nováková, H. (2008). *Edukativní brožury - Alzheimerova choroba v rodině*. Pfizer, Praha 2004

67. Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15, strany 321-387. doi:doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010
68. Koudelková, M. (2009). Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, fosfo-tau proteinu a beta amyloidu v likvoru. *Neurologie pro praxi*, 10, strany 290-293. Stiahnuté z https://www.solen.cz/artkey/neu-200905-0005_Prakticke_zkusenosti_s_laboratorni_diagnostikou_Alzheimerovy_nemoci_pomoci_tau_proteinu_fosfo-tau.php
69. Jiráček, R. (2008). Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 9, strany 240-244. Stiahnuté z https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200804-0010_Diagnostika_a_terapie_Alzheimerovy_choroby.php
70. GE Healthcare Announces European Union Approval of VIZAMYL™ (Flutemetamol (18F) Solution for Injection) for PET Imaging of Beta Amyloid Plaque in Suspected Alzheimer's Disease. (2014). Stiahnuté 14. Júl 2020, z Businesswire: <https://www.businesswire.com/news/home/20140901005048/en/GE-Healthcare-Announces-European-Union-Approval-VIZAMYL%E2%84%A2>
71. Magalinam, K., Radhakrishnan, A., Ping, N., et. al. (2018). Current Concepts of Neurodegenerative Mechanisms in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, strana 12. doi:doi.org/10.1155/2018/3740461
72. Jiráček, R. (2009). Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencií. *Neurologie pro praxi*, 10, strany 384-389.
73. Jiráček, R. (2009). Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, 5, strany 176-178. Stiahnuté z https://www.solen.cz/artkey/lek-200904-0006_Farmakoterapie_Alzheimerovy_choroby.php
74. Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., et. al. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*, 51, strany 1-9. doi:doi.org/10.5114/fn.2013.34190
75. Korabečný, J., Zemek, F., Soukup, O., et. al. (2014). Chapter 1 - Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives. V *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, strany 3-39. London: Elsevier. doi:doi.org/10.1016/B978-0-12-803959-5.50001-5

76. Čechová, L., Bartoš, A., Doležil, D., et. al. (2011). Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 12, stránky 175-180.
77. Doležal, M., Opletalová, V., Miletín, M., et. al. (2016). *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum.
78. Wightman, E. (2017). Potential benefits of phytochemicals against Alzheimer's disease. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 76, strany 106-112. Stiahnuté z https://www.researchgate.net/publication/313239396_Potential_benefits_of_phytochemicals_against_Alzheimer%27s_disease
79. Jiráček, R. (2014). Extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 v léčbě organických psychických poruch Extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 v léčbě organických psychických poruch. *Remedia*, strany 479-482. Stiahnuté z <http://www.remédia.cz/Okruh-temat/Psychiatrie/Extrakt-z-Ginkgo-biloba-EGb-761-v-lecbe-organicky-psychicky-poruch/8-1n-1N5.magarticle.aspx>
80. Turner, L., Balasubramaniam, R., Hersh, E., et. al. (2008). Drug therapy in Alzheimer disease: an update for the oral health care provider. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106, strany 467-476. doi:doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.009
81. Yiannopoulou, K., Parageorgiou, S. (2012). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, strany 19-33. doi:doi.org/10.1177/1756285612461679
82. *Cancer*. (2018). Stiahnuté 1. August 2020, z World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
83. Hofmanová, J. (2013). *Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy*. Stiahnuté 1. August 2020, z Genotoxicita a Karcinogeneze: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html
84. Vyzula, R., Sláma, O., a kol. (2016). *Klinická onkologie pro mediky: solidní nádory a nádory dětského věku*. Stiahnuté 1. August 2020, z MEFANET MUNI MED: <https://portal.med.muni.cz/clanek-661-klinicka-onkologie-pro-mediky-solidni-nadory-a-nadory-detskeho-veku.html>

85. Doležalová, L. (2015). Cílená léčba v onkologii solidních nádorů. *Praktické lékárenství, 11*, strany 194-196. Stiahnuté z https://www.solen.cz/artkey/lek-201506-0003_Cilena_lecba_v_onkologii_solidnich_nadoru.php
86. Greenwell, M., Rahman, P. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research, 6*, strany 4103-4112. doi:doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12
87. Nair, J., Rárová, L., Strnad, M., et. al. (2015). Mechanistic insights to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural product communications, 10*, strany 171-182. doi:doi.org/10.1177/1934578X1501000138
88. Ding, Y., Qu, D., Zhang, K.-M., et. al. (2016). Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research, 19*, strany 53-100. doi:doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332
89. Hu, M., Peng, S., He, Y., et. al. (2015). Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget 6*, strany 15348-15361. doi:doi.org/10.18632/oncotarget.3610
90. Wang, J., Xe, J., Xing, G. (2017). Lycorine inhibits the growth and metastasis of breast cancer through the blockage of STAT3 signaling pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 49*, strany 771-779. doi:doi.org/10.1093/abbs/gmx076
91. McLachlan, A., Kekre, N., McNulty, J., et. al. (Máj 2005). Pancratistatin: A natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis, 10*, strany 619-630. doi:doi.org/10.1007/s10495-005-1896-x
92. Griffin, C., McNulty, J., Pandey, S. (2011). Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International Journal of Oncology, 38*, strany 1549-1556. doi:doi.org/10.3892/ijo.2011.977
93. Siedlakowski, P., McLachlan-Burgess, A., Griffin, C., et. al. (2008). Synergy of pancratistatin and tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biology & Therapy, 7*, strany 376-384. doi:doi.org/10.4161/cbt.7.3.5364

94. Xiong, Y., Xiong, Y.-J., Liu, D.-Y., et. al. (2019). Pancratistatin Inhibits the Growth of Colorectal Cancer Cells by Inducing Apoptosis, Autophagy, and G2/M Cell Cycle Arrest. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 25, strany 6015-6020. doi:doi.org/10.12659/MSM.916116
95. Havelek, R., Seifrtová, M., Kralovec, K., et. al. (2014). The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, 21, strany 479-490. doi:doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.005
96. Luchetti, G., Johnston, R., Mathieu, V., et. al. (2012). Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *Chem Med Chem*, 7, strany 815-822. doi:doi.org/10.1002/cmdc.201100608
97. Shammari, L., Mamun, A., Koutová, D., et. al. (2020). Alkaloid Profiling of Hippeastrum Cultivars by GC-MS, Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids and Evaluation of Their Cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 14, strany 154-159. doi:doi.org/10.25135/rnp.147.19.06.1302
98. Cortes, N., Alvarez, R., Osorio, et. al. (2015). Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, strany 222-228. doi:doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.022
99. Cahlíková, L., Ločárek, M., Benešová, et. al. (2013). Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of Narcissus Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Natural Product Communications*, 8, strany 781-785. doi:doi.org/10.1177/1934578X1300800625
100. Breiterová, K., Koutová, D., Maříková, J., et. al. (2020). Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. *Plants*, 9. doi:doi.org/10.3390/plants9020137