

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus sp.* I
Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus sp.* I

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

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

Hradec Králové, květen 2022

Komendová Karolína

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Diplomová práce vznikla za podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 550.

Tímto prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala sama, pod odborným dohledem a vedením PharmDr. Daniely Hulcové, Ph.D.

Veškeré zdroje a literatura, které jsem použila při vypracování, jsou uvedené v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně ocitovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, květen 2022

Karolína Komendová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou velmi poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D., za poskytnuté rady a informace, odborné vedení, materiály a zejména trpělivost a čas strávený nad touto diplomovou prací. Dále bych chtěla poděkovat také celé katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky za veškeré poskytnuté technické i věcné vybavení a veškeré poskytnuté materiály.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce	9
3	Čeleď Amaryllidaceae (Amarylkovité)	10
3.1	Bledule (<i>Leucojum</i>)	11
3.2	Sněženka (<i>Galanthus</i>).....	11
3.3	Řemenatka (<i>Clivia</i>).....	12
3.4	Narcis (<i>Narcissus</i>)	13
3.4.1	Historie narcisů	13
3.4.2	<i>Narcissus poeticus</i> a <i>Narcissus pseudonarcissus</i>	15
3.5	Šlechtění a pěstování narcisů.....	16
3.5.1	Kultivary použité v experimentální části	17
3.6	Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	21
3.6.1	Lykorinový typ.....	23
3.6.2	Homolykorinový typ	24
3.6.3	Haemanthaminový a krininový typ.....	25
3.6.4	Tazettinový typ	26
3.6.5	Pankratistatinový typ	26
3.6.6	Galanthaminový typ.....	27
3.7	Demence	29
3.7.1	Alzheimerova choroba	29
3.7.2	Terapie Alzheimerovy choroby	34
3.7.3	Příklady nově testovaných látek v klinických studiích.....	37
4	Experimentální část.....	43
4.1	Všeobecné postupy	43
4.1.1	Destilace.....	43
4.1.2	Příprava Mayerova činidla	43

4.2	Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení.....	43
4.2.1	Rozpouštědla, chemikálie a pomocný materiál	43
4.2.2	Přístrojové vybavení	43
4.2.3	Databáze použité k vyhodnocování výsledků.....	44
4.3	Rostlinný materiál.....	44
4.4	Příprava sumárních extraktů	44
4.4.1	Extrakce cibulí narcisů pomocí ethanolu.....	44
4.5	Příprava sumárního alkaloidního extraktu.....	45
4.6	GC/MS analýza a identifikace jednotlivých alkaloidů	46
4.7	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE	47
4.7.1	Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení	47
4.7.2	Rekombinantní enzymy	48
4.7.3	Stanovení inhibiční aktivity	48
5	Výsledky	50
5.1	Přehled chromatogramů jednotlivých sumárních extraktů.....	50
5.2	Přehled obsažených alkaloidů v jednotlivých extraktech.....	57
5.3	Inhibiční aktivita vůči humánní AChE a humánní BuChE	58
6	Diskuze a závěr	59
7	Abstrakt.....	62
8	Abstract.....	63
9	Použitá literatura	64

Seznam zkratek

AA	Amarylkovité alkaloidy
A β	β -amyloid
ABAD	Alkoholdehydrogenasa vázající amyloid β
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloidový prekurzorový protein
BACE 1	β -sekretasa 1
Bcl-2	Lymfom B buněk 2
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CNS	Centrální nervová soustava
CSF	Cerebrospinální tekutina
CT	Počítačová tomografie
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GIT	Gastrointestinální trakt
GSK-3	Glykogensyntasa kinasa 3
HEB	Hematoencefalická bariéra
LMTK	Primární buňky myších fibroblastů
LMTM	Leukomethylenthyonium bis hydromethanesulfonát
MAO-B	Monoaminoxidasa B
MRI	Magnetická rezonance
NFT	Neurofibrilární uzlíčky
NGF	Nervový růstový faktor
NHF buňky	Normální buňky lidských fibroblastů
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
RA	Scavenger receptor
RAGE	Receptor for advanced glycation and products
ROS	Reaktivní kyslíkové částice
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa

1 Úvod

Rostliny patří mezi základní formy života na Zemi, které provázejí člověka již od nejprimitivnějších forem lidské společnosti. Jsou klíčovým zdrojem potravy, průmyslového materiálu i léčivých látek, některé ale mohou obsahovat i účinné jedy. Je všeobecně známo, že účinky jedovatých a léčivých rostlin jsou na lidský nebo živočišný organismus podmíněny přítomností fyziologicky účinných látek, které jsou dodnes intenzivně studovány¹.

Nejstarší stupeň vývoje farmacie nazýváme pravěkým empirickým léčitelstvím. V tomto období se člověk živil výhradně lovem a sběrem. Při těchto aktivitách byl člověk neustále ohrožován predátory, nepřízní počasí i různými onemocněními. O přítomnosti nemocí máme poznatky z paleopatologie, pomocí které je možné zaznamenat onemocnění, která se projevila změnami na dochovaných kostech. V té době se lidé učili léčit zkušeností, pomalu odhalovali léčivé vlastnosti látek živočišného a především rostlinného původu. Někteří jedinci, tzv. šamani, se přímo specializovali na léčení, znali byliny a dokázali z nich připravovat léčivé obklady či odvary².

Rostliny ale byly využívány nejen pro své léčivé, ale i toxické účinky. Jed může být v rostlině zastoupen jedinou, ale i více jedovatými látkami. Mezi historicky nejznámější rostlinné jedy patří například sklerocium paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*), náměl, která parazituje na žitě. Mouka z takto napadeného žita obsahuje vysoce biologicky aktivní alkaloidy, které ve středověku způsobovaly rozsáhlé epidemie ergotismu. Dalšími příklady mohou být ricin obsažený v rostlině skočec obecný (*Ricinus communis*) nebo jeden z nejprudších jedů akonitin obsažený v rostlině oměj šalamounek (*Aconitum callybotryon*)³.

Látky zodpovědné za účinky rostlin jsou většinou produkty sekundárního metabolismu, jejichž biosyntéza logicky navazuje na metabolismus primární. Primárními metabolity rozumíme hlavně sacharidy, lipidy a bílkoviny. Ačkoliv mnoho ze sekundárních metabolitů může působit smrtelně, řada se používá v terapii nejruznějších nemocí, nebo jsou předlohou pro polosyntetická a syntetická léčiva. Mezi příklady významných rostlinných látek používaných v dnešní době jako léčiva můžeme uvést: alkaloidy (atropin), kardioaktivní glykosidy (digoxin), fenolické glykosidy (arbutin), flavonoidní glykosidy (rutin), enzymy (papain), silice (borneol) a další. Asi nejvýznamnější skupinou, jak z toxikologického, tak i terapeutického hlediska, jsou právě alkaloidy⁴.

Struktury alkaloidů jsou velice rozmanité, ale spojují je některé společné vlastnosti: dusík je v nich vázán převážně v heterocyklu, někdy i v postranním řetězci a převážná většina má aminový charakter, který dává látkám bazické vlastnosti. Z hlediska jejich biosyntézy je lze

zařadit do několika skupin. Jednou z možných dělení je na protoalkaloidy, pseudoalkaloidy a pravé (vlastní) alkaloidy. Do první ze skupin patří látky odvozené od aminokyselin, kde dusík není vázán heterocyklicky. Druhá skupina se vyznačuje tím, že ačkoliv se nesyntetizuje z aminokyselin, obsahuje v molekule heterocyklický dusík. Pseudoalkaloidy se mohou dále dělit na steroidní alkaloidy a terpenické alkaloidy. Poslední skupina pravých alkaloidů je odvozena od aminokyselin a obsahuje heterocyklický dusík⁴.

Alkaloidy jsou obsaženy převážně ve vyšších rostlinách, přičemž byly prokázány také v kaprad'orostech či přesličkách a houbách. Je odhadováno, že alkaloidy obsahuje asi 10–20 % všech rostlin. Poměrně velké množství alkaloidů obsahují rostliny patřící do čeledí makovité, pryskyřníkovité, lilkovité, amarylkovité a některé další. U živočichů se alkaloidy vyskytují vzácně a mohou to být strukturní modifikace látek přijatých rostlinnou potravou, anebo si je živočišný organismus sám syntetizuje z jednoduchých prekursorů. Je tomu tak například v exkretách žláz mloka (*Salamandra salamandra*) či exkretách stonožky (*Glomeris marginata*). Kvalitativní a kvantitativní rozdíly v obsahu alkaloidů mohou být způsobeny vnějšími podmínkami, za kterých je rostlina pěstována (prostředí, klima, složení půdy). Změny v obsahu účinných látek lze také dosáhnout šlechtěním léčivých rostlin, čímž mohou vznikat tzv. chemovariety dané rostliny. Dosažení vysokého obsahu účinných látek je také často cílem šlechtění těchto rostlin. Alkaloidy se v terapii uplatňují například jako antitusika (kodein), antineoplastika (paklitaxel, vinka alkaloidy), inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) (galanthamin), antiparazitika (arekolin), uterotonika (ergometrin), mydriatika (atropin)⁴.

Významnou skupinu alkaloidních látek obsahuje čeleď amarylkovité (*Amaryllidaceae*), náležející mezi jednoděložné krytosemenné rostliny z řádu chřestotvaré (*Asparagales*). Do této čeledi patří různé druhy rodu narcis (*Narcissus*), které jsou hlavním předmětem této práce. Dalšími zástupci jsou například rody sněženka (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*), řemenatka (*Clivia*) a další. Látky izolované z čeledi Amaryllidaceae jsou dosud pečlivě studované mimo jiné i pro svou aktivitu vůči AChE či butyrylcholinesterase (BuChE), která hraje důležitou roli v léčbě Alzheimerovy choroby (AD).

2 Cíl práce

Tato diplomová práce je součástí rozsáhlejší studie rostlin čeledi Amaryllidaceae na katedře farmakognosie a farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

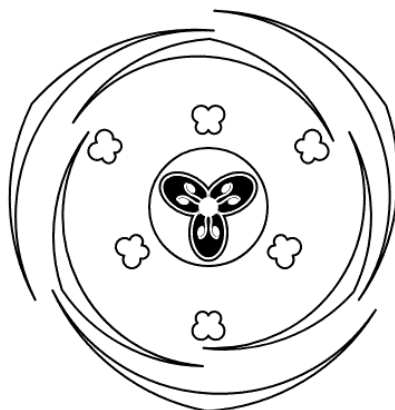
Cíle diplomové práce:

- Příprava sumárních alkaloidních extraktů 7 vybraných kultivarů rostlin rodu *Narcissus*
- GC/MS analýza extraktů a vyhodnocení obsahu alkaloidních látek na základě získaných dat
- Stanovení inhibiční aktivity sumárních alkaloidních extraktů vůči lidským cholinesterasám
- Zpracování literární rešerše na zadané téma, vyhodnocení výsledků a vlastní sepsání diplomové práce

3 Čeleď Amaryllidaceae (Amarylkovité)

Rostliny čeledi amarylkovité jsou rozšířeny téměř po celém světě. V současné době je rozlišováno 73 rodů a více než 6750 druhů. Nejvíce jich roste v sušších oblastech Ameriky, Afriky a Austrálie, zatímco v mírném pásu severní polokoule se objevují mnohem méně. Na území chladného klimatu se v podstatě neobjevují. Velmi mnoho druhů čeledi amarylkovitých má zejména okrasný význam⁵.

Rostliny čeledi amarylkovité jsou vytrvalé byliny s oddenky, hlízkami nebo cibulemi. Listy mají čárkovité, buď jen přízemní, nebo také lodyžní. Stonek má nejčastěji podobu stvolu. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem, jsou jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Někdy se z okvětních lístků vychlipuje nápadná pakorunka (*Narcissus*). Plody jsou obvykle pouzdrosečné tobolky, jen zřídka jsou to nažky nebo bobule. Hlavními obsahovými látkami této čeledi, jsou specifické tzv. amarylkovité alkaloidy (AA) z nichž nejvýznamnější je inhibitor AChE galanthamin. Čeleď zahrnuje řadu rodů: *Leucojum* (bledule), *Galanthus* (sněženka), *Narcissus* (narcis), *Crinum* (krinum), *Amaryllis* (amarylka), *Clivia* (klívie), *Allium* (česnek) a další⁶. Nejprve si představíme některé významné rody z čeledi amarylkovité, přičemž hlavním tématem této práce jsou právě narcisy, na které se více zaměřím.



☑, * slabě↓, P 3+3 n. (3 + 3), A 3+3, $\bar{G}(3)$

Obr. 1 - Květní diagram a vzorec čeledi amarylkovité

3.1 Bledule (*Leucojum*)

Rod bledule se na našem území vyskytuje ve dvou druzích. První a nejdůležitější zástupce je bledule jarní (*Leucojum vernum*), u níž z cibule vyrůstají 3–4 čárkovité, široké listy a přímý, ze stran stlačený stvol. Na jeho konci vyrůstá v paždí listenu květ (zřídka 2–3 květy) světle žlutavé barvy s nazelenalými skvrnami. Plodem je dužnatá tobolka. Roste ve stinných a vlhkých lesích i na mokrých loukách⁷.



Obr. 2 - *Leucojum vernum*⁸

Rostlina obsahuje toxické alkaloidy jako galanthamin, lykorin, izotazenin a další. Nejvyšší koncentrace se nachází v cibuli. Otravy se projevují sliněním, nevolností, zvracením, průjmem a celkovou slabostí. V zahrádkách se bledule pěstuje jako okrasná trvalá rostlina, na vlhčích a teplejších stanovištích v polostínu vytváří během několika let rozsáhlý porost. Na Moravě roste obsahově méně významná a zároveň kriticky ohrožená bledule letní (*Leucojum aestivum*), jejíž stvol nese až pět květů. Má pouze okrasný význam⁷.

3.2 Sněžěnka (*Galanthus*)

Sněžěnka podsněžník (*Galanthus nivalis*) se začíná na zahrádkách objevovat brzy na jaře. Je to vytrvalá, cibulovitá rostlina. Z cibule vyrůstají dva čárkovité sytě zelené listy a mezi nimi stvol, který nese bílý květ s vnitřními listy na konci opatřenými zeleným lemem. Dosahuje velikosti 10–30 cm. Někdy vykvétá i na zasněžené půdě již koncem února. Plodem je tobolka. Roste ve vlhčích smíšených lesích, v křovinách i na loukách. Dříve se objevovala u nás ve volné přírodě sněžěnka hojněji, částečně však byla vyhubena prodejem na trzích i přenášením vyrýpaných cibulí do zahrádek. Nejvíce alkaloidů jakožto účinných látek je obsaženo v cibuli. Bylo z ní izolováno kolem 20 alkaloidů např. lykorin, nivalin, galanthamin,

tazenin aj. Jejich obsah závisí na podmínkách stanoviště, ve kterém je sněžinka pěstována. Pěstuje se hlavně na zahrádkách často jako symbol jara, přičemž roste často planě⁷.

Existují také plnokvěté formy. Těmto formám se daří pod listnatými stromy v půdě obsahující humus, kde je dostatek vlhkosti. Patří k nim druh sněžinka Elwésova (*Galanthus elwesii*). Je pěstována méně, dosahuje velikosti okolo 30 cm a má květy až dvakrát větší než má *Galanthus nivalis*. Vnitřní okvětní lístky nesou dvě oddělené zelené kresby. Uplatňuje se jako okrasná rostlina, ale v některých zemích nachází své místo i v tradiční medicíně⁷.



Obr. 3 - *Galanthus nivalis*⁹ a *Galanthus elwesii*¹⁰

3.3 Řemenatka (*Clivia*)

Řemenatka oranžová nebo též klívie (*Clivia miniata*) je vytrvalá rostlina běžně užívaná v Jihoafrické oblasti v humánní alternativní medicíně na různé druhy chorob, léčení zranění po hadím kousnutí nebo dokonce i k usnadnění porodu. Řemenatka nese na houževnatém tmavě zeleném stonku pestrobarevné zvonkovité či nálevkovité květy, které mohou být zbarveny od oranžové až po čistě žlutou. Květy mohou někdy i lehce a zároveň velmi sladce vonět. Klívie roste v trsech až do výšky okolo 80 centimetrů. Je to rostlina s typicky úzkými, dlouhými (i půl metru), řemenovitými, tuhými a temně lesklými listy sestavenými ve dvou řadách. Listy se vyvíjejí z podzemní části stonku. Na rozdíl od většiny ostatních druhů mají klívie v podzemní části kompaktní masové kořeny. Jejich plody jsou bobule obsahující zhruba 10 semínek. Klívie můžeme nalézt široce rozptýlené napříč Jižní Afrikou. Dále se údajně vyskytují na území Mexika, Nového Zélandu, Austrálie, Číny, Japonska a USA ve stinných oblastech. Jako planě rostoucí rostlina se stala klívie ohroženým druhem díky častým sklízním a kolonizaci jejich přirozeného prostředí^{7,12}.

Několik studií potvrdilo, že celá rostlina je zdrojem látek s toxickými i terapeutickými vlastnostmi. Ke zpracování se využívají listy, oddenky, kořeny, přičemž největší množství alkaloidů se nachází v oddencích a kořenech. Klívie obsahují specifické alkaloidy jako lykorin, klivonin, klivonidin, klivimin, klivatin, hippeastrin, haemanthamin a další. Mezi biologické aktivity těchto rostlin patří uterotonický účinek, který je zprostředkovaný stimulací hladké svaloviny uteru. Přítomností lykorinu mají klívie zejména cytotoxickou aktivitu, ale byla potvrzena také antivirotická i antibakteriální biologická aktivita. Lykorin inhibuje proteosyntézu a tím je aktivní vůči dětské obrně způsobené poliovirem, Cocksackie viru, spalničkám i virům *Herpes simplex*. Byly u něj zjištěny také antidiabetické účinky. Obsahová látka lykorin umožňuje nejen terapeutické využití, ale je i zdrojem toxicity rostliny. Při intoxikaci se obvykle dostavuje slinění, zvracení a průjem, ve větších dávkách může způsobit až ochrnutí a kolaps^{7,12}.



Obr. 4 - *Clivia miniata*¹¹

3.4 Narcis (*Narcissus*)

Narcisy jsou významnou skupinou rostlin, která je studována botaniky a přírodovědci po celém světě díky jejich kráse, diverzitě a schopnosti hybridizace. Objevují se v obrovském množství barevných variant a kultivarů.

3.4.1 Historie narcisů

Ve starověkém Egyptě a zejména v řecké mytologii byl narcis považován za květ patřící bohům podsvětí. Byl označen květinou klamu a byl údajně vkládán do hrobů zemřelých. Dílo Ovidia Proměny zmiňuje příběh o jeho stvoření. První narcis měl vykvést na místě, kde zemřel krásný mladík Narkissus (lat. *Narcissus*), který byl potrestán bohy za svou pýchu a zamiloval se do svého vlastního obrazu na vodní hladině. Tak dlouho se nakláněl k hladině ke svému

odrazu, až do vody spadl a proměnil se v narcis. Měl budoucím věkům připomínat nepříznivý vliv přílišné sebelásky, nazývané dnes také jako narcisismus^{13,14}.

Většina druhů narcisů je domácí v Evropě a ve Středomoří, proto se jedná o jednu z nejdéle pěstovaných okrasných a léčivých rostlin, jež se užívaly také v tradiční medicíně k léčení různých zdravotních neduhů. Narcisy se v zahradách pěstují pravděpodobně již od roku 300 př. n. l. Ve středoevropském regionu je to především druh *N. pseudonarcissus*. Například Petr Ondřej Matthioli popisoval již ve třetím svazku svého herbáře devět různých narcisů a nazýval je narcisky čili narcisové růžičky. Popisoval zde vnitřní použití, které se tehdy prakticovalo jen zřídka za účelem navození dávení a vnější užití, kdy utlučené cibule nebo listy doporučoval přikládat na otoky, popáleniny, kožní problémy a rány^{13,14,15}.

V druhé polovině 16. století se ve střední Evropě již pěstovaly i další druhy jako narcis bílý *N. poeticus*, *N. tazetta* nebo narcis okolíkatý *N. jonquilla* a další. Velmi oblíbenými se staly především druhy a odrůdy s více květy na stonku¹³.

V druhé polovině 19. století se velkou měrou zasloužil o značnou oblibu narcisů zahradník William Robinson (1838-1935). Ve své knize Divoká zahrada z roku 1870 zmiňuje často výsadby žlutých narcisů v travnatých plochách jako jeden ze svých nejoblíbenějších prvků v zahradě¹³.

Botanické druhy narcisů se dnes pěstují jen velmi zřídka. V nabídce jsou tisíce zahradních odrůd od jednotlivých skupin. Naše klimatické podmínky dovolují pěstovat nejspolehlivější odrůdy ze zahradnických skupin: Trubkovité, Velkokorunné a Krátkokorunné narcisy. Vznikly hybridizací především nejznámějších druhů *N. pseudonarcissus* a *N. poeticus*¹³.

Jak tedy můžeme vidět, jedná se obecně o jednu z nejdůležitějších cibulovin i v dějinách zahradního umění.

Říše (Regnum)	Rostliny	Plantae
Podříše (Phyllum)	Cévnaté rostliny	Tracheophyta
Oddělení (Divisio)	Krytosemenné	Magnoliophyta
Třída (Classis)	Jednoděložné	Liliopsida
Řád (Ordo)	Asparágotvaré	Asparagales
Čeleď (Familia)	Amarylkovité	Amaryllidaceae
Rod (Genus)	<i>Narcissus</i>	Narcis

Tabulka č. 1 - Taxonomie Narcisu

3.4.2 *Narcissus poeticus* a *Narcissus pseudonarcissus*

Rod *Narcissus* patří mezi vytrvalé jarní kvetoucí rostliny. Carl Linné v roce 1753 původně definoval 6 druhů rodu *Narcissus*, přičemž *N. poeticus* byl prvním popsáním druhem v jeho knize *Species Plantarum*. Dnes je známo, že rod zahrnuje přibližně 80 druhů a 27 000 kultivarů. V této kapitole je věnována pozornost dvěma nejvýznamnějším a nejrozšířenějším druhům rodu *Narcissus*. Narcis bílý (*N. poeticus*) je jedním z druhů *Narcissus* rostoucí mimo jiné i v České republice. Z cibule vyrůstá 4-6 úzkých sivozelených listů a mezi nimi dutý, ze stran zploštělý stvol s vrcholovým vonným květem. Dorůstá velikosti 20–40 cm a vykvétá později na jaře (duben–květen). Okvětí je čistě bílé, nízká pakorunka žlutá s karmínově červeným kadeřavým okrajem. Plodem je tobolka. Listy a stonky obsahují především alkaloid scilain, v květech a v cibulích se nacházejí účinné alkaloidy tazenin, lykorin aj. Narcis bílý je původní rostlinou jižní Evropy. Dnes je rozšířen po celé Evropě, konkrétněji ve Francii, Španělsku a jižní Itálii. U nás se s oblibou pěstuje v zahradách, předzahrádkách atp. jako nenáročná trvalka, která někdy též zplaňuje. Díky svým vonným složkám obsaženým v květech je také používán v parfémovém průmyslu^{7,16}.

Dalším a nejvíce známým druhem rostoucím nejen v České republice je narcis žlutý (*Narcissus pseudonarcissus*). Z cibule tvořené z šupin vyrůstá opět 4–6 úzkých, řemenovitých, bilaterálně symetrických, lehce šedozelených listů a mezi nimi ze stran stlačený, vzpřímený, dutý stvol s květem. Dorůstá výšky 20–40 cm. Vykvétá běžně na začátku či uprostřed jara (záleží na kultivaru). Uprostřed vonných zářivě žlutých okvětních lístků nápadně vyčnívá pohárkovitá, na okraji vlnitá pakorunka. Plodem narcisu je tobolka. Podobně jako narcis bílý obsahuje tento druh (především cibule) terapeuticky důležité alkaloidy a nesčetně mnoho dalších aktivních látek. V literatuře bylo popsáno celkově asi 76 strukturně odlišných alkaloidů obsažených v cibulích *N. pseudonarcissus*. Mezi ostatní obsahové látky patří například flavonoidy, terpenoidy, třísloviny, aminokyseliny, alifatické karboxylové kyseliny, fytoalexiny aj. Při otravě cibulemi se objevují již zmíněné příznaky jako silné zvracení, nevolnost a průjem. Zaznamenány byly otravy osob po požití 4–6 cibulí. U vepřů, skotu a jiných zvířat postačilo k otravě pozření několika cibulí vyrytých z půdy. Druh pochází z jihozápadní Evropy a běžně se pěstuje, včetně plnokvětých forem, v zahradách a sklenicích. Občas zplaňuje a vyskytuje se na okrajích lesů, na vlhkých loukách a kyselých, nevápnitých a humózních půdách. Pěstován je také terapeuticky méně významný narcis taceta (*N. tazetta*) s bílým okvětím a žlutou až oranžovou pakorunkou, původem ze Středozeří^{7,17}.



Obr. 5 - *Narcissus poeticus*¹⁸ a *Narcissus pseudonarcissus*¹⁹

3.5 Šlechtění a pěstování narcisů

Narcisy se dělí podle tvaru a postavení květů do 13 základních skupin a několika podskupin. Rozmanitost květů poskytuje bezpočet variací a druhů, kterých již bylo vyšlechtěno přes 27 000. Šlechtěním narcisů rozumíme cílené zachování určitých charakteristik kultivaru nebo cílené vytváření nových kultivarů s lepšími vlastnostmi za využití pravidel dědičnosti. Vlastnosti kultivaru získané šlechtěním jsou stálé a dědičné. K okrasným a zahradnickým účelům je hlavním cílem vypěstovat nový vzhled, barvu atd. Cílem šlechtění může být také zachování určité obsahové látky či dokonce zvýšení jejího obsahu a zajištění větší odolnosti vůči nepříznivým podmínkám při pěstování (mraz, sucho, choroby). Šlechtitelské metody mohou být buď klasické (výběr, křížení čili hybridizace, heterozní šlechtění, mutační a polyploidní šlechtění), nebo netradiční (techniky *in vitro*, buněčné i genové manipulace). Vyšlechtění nového kultivaru je dlouhodobý a náročný proces, který může trvat i více než 10 let. Kultivary jsou označovány zkratkou cv. z anglického cultivated variety^{20,21}.

Cibule narcisů jsou sázeny od konce září do konce října do hloubky okolo 20 cm podle velikosti cibulí, aby byly dostatečně ochráněny před mrazem. Narcisům vyhovuje chráněné i lehce osluněné stanoviště, kde netrpí tolik nepřízní počasí. Snášejí rovněž polostín i stín a mohou se proto sázet i pod stromy a keře. Květy většinou špatně snášejí silné větry a sluneční úpal. Daří se jim dobře i v těžších půdách. Během vegetace jim vyhovuje vlhko, které je zajišťováno častější závlávkou nebo tzv. mulčováním, díky kterému se nastele povrch půdy odumřelým organickým materiálem a vytvoří se úrodný humus. Na jaře jsou záhony provzdušňovány a přihnojovány. Záhony se nechávají několik let na stejném místě. Jako okrasné rostliny jsou narcisy vhodné v řezané podobě především do všech druhů vazeb i květinových úprav. Rovněž mohou být sázeny přímo do předzahrádek či záhonů, do trávníků či skalek. Po odkvětu běžně napadají cibule larvy velké narcisové mouchy „pestřenky“ podobné

čmeláku, díky kterým mohou cibule hynout. Do hustých výsadeb nebo do porostů v trvalkách a trávníků tyto škůdci nenalétávají. Lze je ošetřit tzv. HWT metodou, což znamená moření vodou o teplotě 43,5 °C proti larvám narcisové mouchy a háďátku zhoubnému s přidáním fungicidu, který zamezuje infekci fuzáriovou hnilobou cibulí. Dobu sklizně je důležité vždy pečlivě zvážit, aby nebyla časná nebo pozdní. Počasí je zde hlavním faktorem rozhodování^{20,22,23}.

3.5.1 Kultivary použité v experimentální části

3.5.1.1 *Narcissus* cv. Apotheose

Kultivar Apotheose patří mezi plnokvěté narcisy, které mají buď plnou trubku či korunku a nebo ve většině případů jde o kultivary se zmnoženými okvětními plátky (petály) a rozčleněnou pakorunkou (petaloidy). Na stvolu je většinou jeden květ, některé druhy i voní. Narcis Apotheose má petály jasně žluté, petaloidy oranžově žluté. Dorůstá výšky 30–45 cm²⁰.

Za autora hybridizace se považuje Oregon Bulb Farms, Oregon, USA a registrován byl v roce 1975. Vznikl hybridizací neznámého kultivaru s *Narcissus* cv. Double Fortune²⁴.



Obr. 6 - *Narcissus* cv. Apotheose^{25,26}

3.5.1.2 *Narcissus* cv. Chromacolor

Kultivar Chromacolor patří mezi velkokorunné narcisy. Je to nejrozšířenější skupina narcisů. Zahrnuje druhy s korunkami ve tvaru trubek, kalíšků, pohárků apod., které jsou však kratší než okvětní lístek. Je jedním z nejtmavších růžových narcisů²⁰.

Okvěti je sněhově bílé, tuhé a hezky překrývané s dobrou stavbou. Korunka je válcová, vlnitá, velmi tmavě a sytě růžová s karmínovým odstínem, uvnitř s patrným nádechem bronzu. Dosahuje výšky 50 cm²⁰.

Za autora hybridizace se považuje William G. Pannill, Virginia, USA a registrovaný byl v roce 1976. Vznikl hybridizací kultivarů *Narcissus* cv. Carita a *Narcissus* cv. Accent²⁸.



Obr. 7 - *Narcissus* cv. Chromacolor²⁷

3.5.1.3 *Narcissus* cv. Hungarian Rhapsody

Kultivar Hungarian Rhapsody patří mezi exotické orchideokvěté narcisy neboli koláry. Mají dělenou pakorunku, hluboce členěnou a přiléhavou nebo střídavě prokládanou okvětními lístky. Tento rozmanitý počet úkrojků, většinou však šest, vytváří zdánlivě dvojitě okvěti (koláry). Mají čistě mléčně bílé okvěti, které je z větší části překryto velmi zvlňným a skládaným kolárem v temně lososově růžové barvě. Dosahuje výšky až 50 cm²⁰.

Za autora hybridizace se považuje Grant E. Mitsch, Oregon, USA a registrovaný byl v roce 1997. K hybridizaci byl použit kultivar *Narcissus* cv. Phantom³⁰.



Obr. 8 - *Narcissus* cv. Hungarian Rhapsody²⁹

3.5.1.4 *Narcissus* cv. Mon Cheri

Kultivar Mon Cheri patří mezi velkokorunné narcisy obdobně jako kultivar Chromacolor. Vyznačuje se širokým, čistě bílým okvětím s voskovitými prvky. Široce rozevřený kalich má jemně oranžově růžové zbarvení a je hluboce dělený, patrně zvlněný a na konci krepovaný. Dosahuje výšky 45 cm²⁰.

Za autora hybridizace je považován P.Q.M. Pennings, the Netherlands a je registrován od roku 1983³¹.



Obr. 9 - *Narcissus* cv. Mon Cheri³²

3.5.1.5 *Narcissus* cv. Peach Cobbler

Kultivar Peach Cobbler se řadí mezi krásné plnokvěté narcisy podobně jako kultivar Apotheose. Je to velký jarní narcis s četnými vrstvami okvětních máslově žlutých lístků uspořádaných do jakýchsi mašliček, vyplněných broskvově oranžovými petaloidy vytvářejícími perfektní dvojtónový efekt. Příjemně voní a žádný jiný narcis se mu nepodobá. Dorůstá výšky 40 cm²⁰.



Obr. 10 - *Narcissus* cv. Peach Cobbler³³

Za autora hybridizace se považuje Karel J. van der Veek, the Netherlands a je registrován od roku 2014³⁴.

3.5.1.6 *Narcissus* cv. Pink Pride

Kultivar Pink Pride se řadí mezi velkokorunné narcisy podobně jako kultivary Chromacolor a Mon Cheri. Vyznačuje se sněhově bílým okvětím a jemně narůžovělou válcovitou korunkou s bílou bází. Dosahuje výšky 45 cm²⁰.

Za autora hybridizace je považován P.B. van Eeden, the Netherlands a je registrován od roku 1970. Vznikl hybridizací kultivarů *Narcissus* cv. Pink Rim a *Narcissus* cv. Lady Kesteven³⁵.

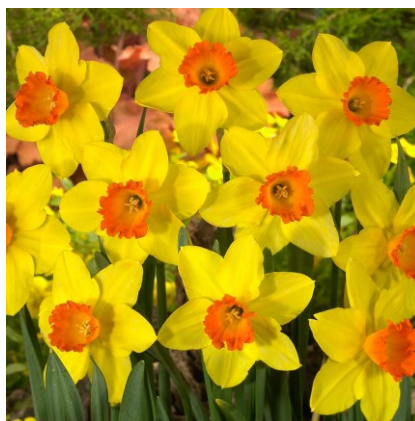


Obr. 11 - *Narcissus* cv. Pink Pride³⁶

3.5.1.7 *Narcissus* cv. Red Devon

Mezi velkokorunné narcisy patří i kultivar Red Devon. Vyznačuje se velkým, tmavě žlutým okvětím zdobeným načervenalou korunkou s jemně zdobenými okraji, což vytváří dobrý kontrast. Dorůstá výšky 40–45 cm²².

Za autora hybridizace je považován E.B. Champernowne, England, UK a byl registrován ještě před rokem 1943. Vznikl hybridizací kultivarů *Narcissus* cv. Fortune a *Narcissus* cv. Killigrew³⁷.

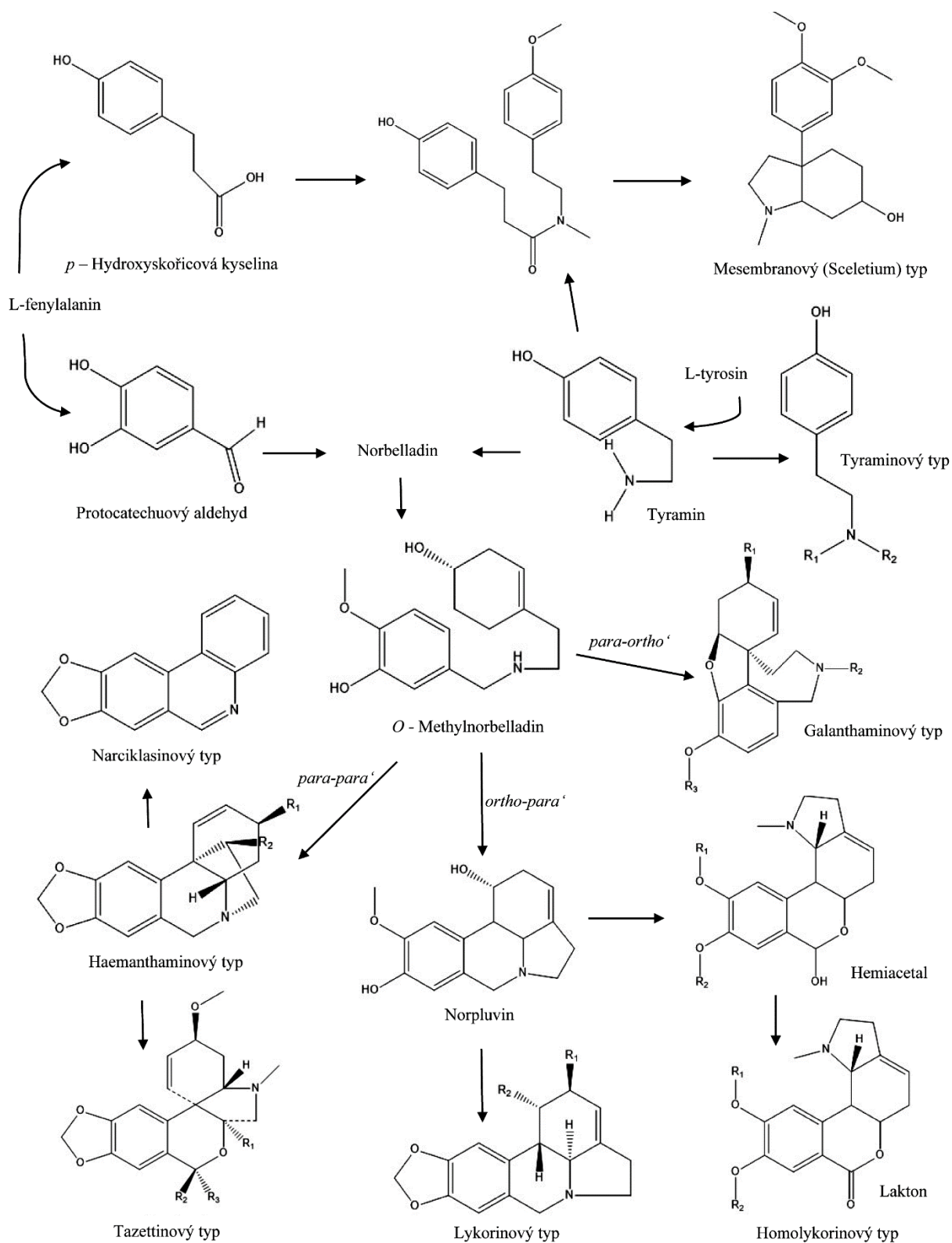


Obr. 12 - *Narcissus* cv. Red Devon³⁸

3.6 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

V poslední době se čeleď Amaryllidaceae a obzvláště podčeleď Amaryllidoideae těší pozornosti široké vědecké komunity. To je dáno jejich obsahem biologicky velmi cenných alkaloidů. Tyto alkaloidy se vyznačují obrovskou různorodostí jejich chemických struktur, biologických účinků a rovněž terapeutického využití. První dochované záznamy o terapeutickém využití této čeledi rostlin se datuje do klasického období za působení Hippokrata z Kóu (4. století př.n.l.) a Dioscorida (1. století n.l.), autora pětidílné encyklopedie *De materia medica*. Ti již ve své době používali extrakt z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze k terapii neduhů spojených s oblastí dělohy. O používání extraktů z rodu *Narcissus* se objevují zmínky také v Bibli. Extrakty byly pravděpodobně používány k léčbě chorob, dnes označovaných jako rakovina. Prvním z izolovaných alkaloidů byl lycorin, získaný z druhu *Narcissus pseudonarcissus* v roce 1877 Alfredem W. Gerrardem. Od té doby bylo identifikováno a strukturně popsáno na 600 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě či ve skupinách napříč celou čeledí Amaryllidaceae^{39,40}.

AA se vyskytují v celé rostlině, avšak jejich největší množství se nachází v cibuli. Řada z izolovaných alkaloidů má výrazné biologické účinky a ovlivňují i katalytickou aktivitu enzymů. Byla prokázána aktivita antifungální, antivirová a antibakteriální, včetně inhibiční aktivity vůči cholinesterasám. Prokázány byly účinky i analgetické a antimalarické. Některé alkaloidy vykazují cytotoxické účinky na eukaryotické buňky založené na indukci apoptózy. Tyto účinky se projevují hlavně vůči buňkám nádorově transformovaným, zatímco vůči buňkám zdravým jsou jen minimální. Díky náročnosti izolace těchto alkaloidů je stále větší zájem o přípravu syntetických analogů s terapeuticky podobnými, nebo dokonce lepšími vlastnostmi^{40,41}.



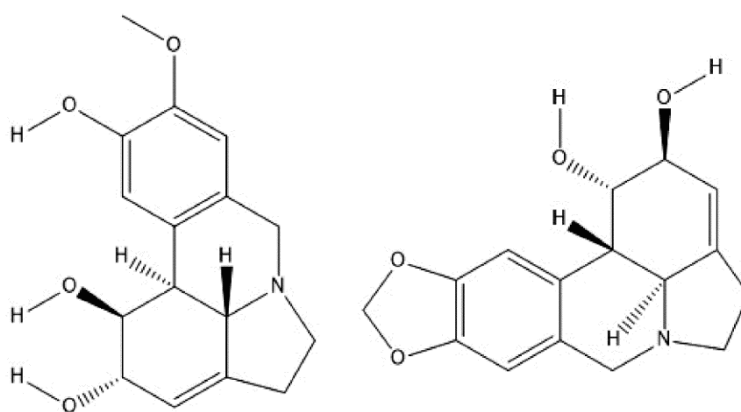
Obr. 13 - Biosyntetická cesta hlavních alkaloidů rodu *Narcissus*⁴²

Z chemického hlediska je specifickou biosyntetickou cestou AA tzv. norbelladinová cesta (obr. 13), vycházející z aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu. Po několika reakčních stupních vzniká klíčový intermediát *O*-methylnorbelladin, od kterého jsou odvozeny hlavní strukturní typy AA. Tyto alkaloidy jsou klasifikovány do devíti hlavních strukturních typů dle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení. Jsou pojmenovávány zpravidla podle svého hlavního zástupce. Náleží sem belladinový (*O*-methylbelladin), lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin), montaninový (montanin) a krinanový (krinin) strukturní typ. V nedávné době byly identifikovány také další méně důležité strukturní typy jako cheryllin, ismin, plicamin, mesembrin atp. Například plicaminový typ alkaloidů byl získán z *Narcissus broussonetii*^{40,41}.

3.6.1 Lykorinový typ

Prvním izolovaným alkaloidem čeledi Amaryllidaceae byl v roce 1877 lykorin získaný z cibulí a listů *Narcissus pseudonarcissus*. Jeho struktura byla objasněna výzkumnou skupinou Nagakawy a kol. v roce 1956. Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější, nejrozmanitější a nejhojněji se vyskytující strukturní typy. Z pohledu toxicity patří pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavní zástupce lykorin je pyrollofenanthridinový cyklický alkaloid. Při zjišťování biologické aktivity lykorinu bylo objeveno hned několik zajímavých účinků na zvířecí či lidský organismus jak *in vitro*, tak *in vivo*. Byly prokázány antiangiogenní, cytotoxické, protinádorové, antiparasitické, antimalarické, protizánětlivé, imunosupresivní, antioxidační a další účinky. Lykorin je rovněž účinný proti celé řadě virů z čeledi Flaviviridae, poliovirus, vaccinia virus pravých neštovic a SARS-asociovaný coronavirus^{40,41}.

Nicméně nejdůležitější vlastností lykorinu je právě jeho protinádorová aktivita. Lykorin působí selektivně na nádorové buňky tak, že indukuje jejich programovanou buněčnou smrt neboli apoptózu. Tato aktivita byla ve významné míře pozorována u leukemické buněčné linie HL-60. Lykorin byl rovněž první studovanou látkou z čeledi Amaryllidaceae, u níž byla objevena protinádorová aktivita^{40,41}. Do skupiny alkaloidů lykorinového typu spadají i další látky se zajímavou aktivitou. Z biologicky nejzajímavějších jsou to karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbellisin a galanthin. Všechny uvedené látky mají prokázaný protinádorový účinek a z nich největší vykazuje amarbellisin a pseudolykorin^{40,41}.

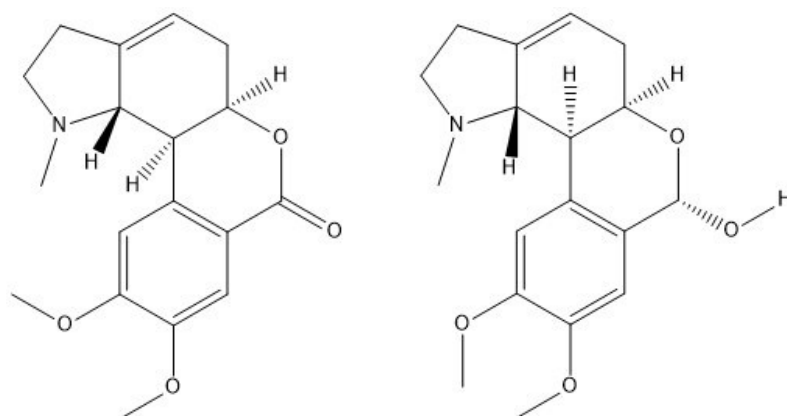


Obr. 14 - Pseudolykorin a lykorin

3.6.2 Homolykorinový typ

Tato strukturální skupina obsahuje celou řadu alkaloidů, ale jen někteří zástupci mají výraznou biologickou aktivitu. Homolykorinový typ alkaloidů je odvozen od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu vzniklého restrukturalizací lykorinového typu alkaloidů. Tyto alkaloidy se překvapivě neobjevují u všech rostlin čeledi Amaryllidaceae. Objeveny byly zejména u druhů *N. pseudonarcissus* a *N. poeticus*^{40,43}.

Hlavními zástupci jsou homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin, hippeastrin a jejich další deriváty. Zejména alkaloidy lykorenin a hippeastrin vykazují slibnou inhibiční aktivitu růstu vůči mnoha nádorovým buňkám *in-vivo/in-vitro*, například u lidského jaterního

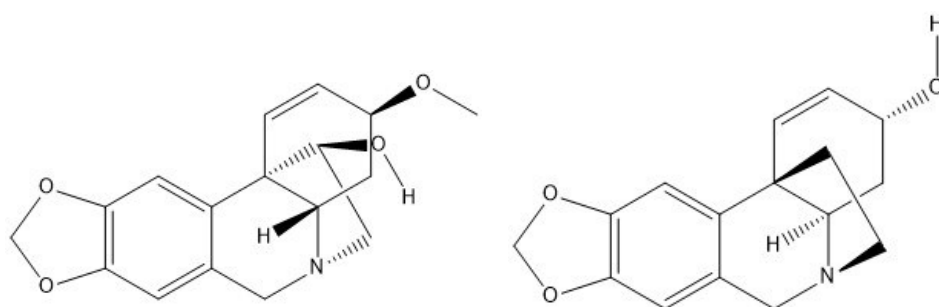


Obr. 15 - Homolykorin a lykorenin

karcinomu, karcinomu prostaty, a leukemických buněk. Homolykorinový typ alkaloidů naneštěstí vykazuje také cytotoxický efekt k nenádorové linii primárních buněk myších fibroblastů (LMTK). Mezi další zajímavé biologické účinky patří aktivita hippeastrinu proti *Herpes simplex* a antimykotický účinek zejména proti *Candida albicans*^{40,44}.

3.6.3 Haemanthaminový a krininový typ

Haemanthaminové a krininové strukturální typy se v některé literatuře označují také jako α - nebo β -krininový typ, neboť jsou si velmi podobné. Liší se pouze v prostorové konfiguraci ethanového můstku. Jedná se tedy o enantiomery a jsou odvozeny od struktury ethanofenanthridinu. Zástupci patřící do skupiny haemanthaminového typu jsou haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin. Mají rozdílnou schopnost inhibovat růst odlišných typů nádorových buněk. Nejúčinnějšími zástupci této skupiny jsou právě haemanthamin, haemathidin a krinamin, které působí cytotoxicky na nádorové buňky. Speciálně u haemanthaminu bylo prokázáno, že způsobuje apoptózu rakovinných buněk, které jsou jinak

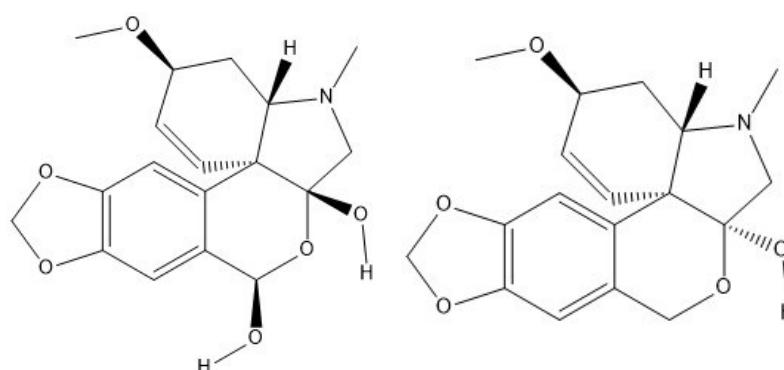


Obr. 16 - Haemanthamin a krinin

proti apoptóze resistantní. Haemanthamin pravděpodobně cílí na struktury ribozomu a inhibuje proteosyntézu. Alkaloidy haemanthamin a haemathidin jsou velmi zajímavé i z hlediska dalších biologických účinků, neboť u hydroxyderivátu haemanthaminu haemathidinu byly prokázány účinky antiparazitické, protizánětlivé a analgetické s aktivitou vyšší než u samotné kyseliny acetylsalicylové. Nedávné studie rovněž prokázaly, že haemanthamin, haemathidin a zejména krinamin vykazují selektivní inhibiční účinky vůči monoaminoxidase B (MAO-B), která je důležitá v léčbě Parkinsonovy choroby. Mezi zástupce krininového typu patří například krinin a epimaritidin.^{40,45,46}

3.6.4 Tazettinový typ

Do této strukturní skupiny patří deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Hlavním zástupcem této skupiny je tazettin, který má jen mírné cytotoxické účinky vůči primární buněčné linii LMTK a leukemickým buňkám. Mnohem účinnější a nadějnější látkou než tazettin se ukázal jeho biosyntetický prekurzor pretazettin. Kromě slibné aktivity proti leukemickým buňkám, buňkám adenokarcinomu a lymfomu vykazuje pretazettin účinky proti viru *Herpes simplex* a flavivirům. Ty jsou zprostředkovány inhibicí RNA-dependentní DNA polymerázy. Pretazettin naneštěstí rovněž jako tazettin vykazuje aktivitu vůči nenádorové buněčné linii LMTK^{40,47}.



Obr. 17 - Pretazettin a tazettin

3.6.5 Pankratistatinový typ

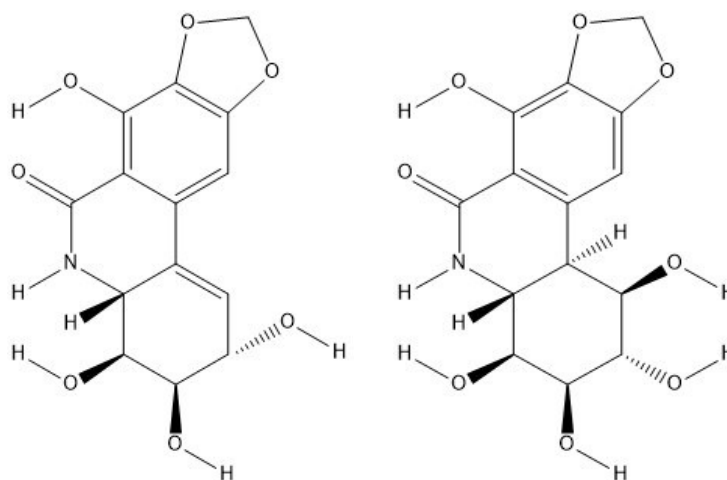
Do této skupiny patří alkaloidy odvozené od molekuly fenanthridinu. Z pohledu cytotoxické aktivity se jeví nejvíce slibnými zástupci narciklasin a pankratistatin.

Alkaloid narciklasin, známý také jako lykoricidinol, byl poprvé objeven v roce 1967 v cibulích rodu *Narcissus*. Jeho silné cytotoxické účinky byly zjištěny zejména *in vitro* vůči široké škále nádorových buněk, zatímco *in vivo* byla potvrzena jeho efektivita zejména vůči nádorům mozku. Cytotoxicita je způsobena hned několika mechanismy. Například antimitotickými účinky podobnými kolchicinu, indukci apoptózy a navázáním se na podjednotku ribozomu, čímž dochází k inhibici proteosyntézy. Jeho aktivita byla více než 250krát větší vůči nádorovým buňkám než vůči normálním buňkám lidských fibroblastů (NHF). Dále je důležité zmínit i další biologicky významné účinky narciklasinu. Patří sem baktericidní aktivita proti *Corynebacterium fascians* napadajícím rostliny, antigunfální aktivita proti *Candida albicans*, antivirotická aktivita proti RNA virům hemoragické horečky, která je způsobena flaviviry nebo bunyaviry a dále ještě protizánětlivá aktivita zprostředkovaná

například potlačením produkce tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) i prozánětlivých cytokinů. V roce 2015 byly objeveny výzkumnou skupinou Kima a kol. také inhibiční účinky na tvorbu patologického amyloidu β při onemocnění Alzheimerovou chorobou (AD)^{40,48}.

Alkaloid pankratistatin byl poprvé izolován v roce 1984 z cibule havajské lilie *Pancreatum littorale*. Roku 1993 byly Pettitem a kol. zdokumentovány první poznatky o jeho cytotoxické aktivitě. Experimentálně bylo zjištěno, že pankratistatin je cytotoxický vůči leukemickým buňkám a vůči různým solidním nádorům se špatnou prognózou. Studie potvrdily, že pankratistatin je cytotoxický selektivně vůči buňkám nádorově transformovaným a působí mechanismem indukce apoptózy. Apoptóza je pravděpodobně indukována zvýšenou tvorbou reaktivních kyslíkových částic (ROS) v nádorových buňkách, což vyústí v mitochondriální dysfunkci těchto buněk a jejich zánik. Při působení pankratistatinu buňky NHF dle studií nevykazují známky poškození^{40,49}.

Dalšími zástupci tohoto strukturního typu alkaloidů objevujícími se v rostlinách čeledi Amaryllidaceae v minoritním množství jsou například *cis*-dihydronarciklasin, *trans*-dihydronarciklasin, trisferidin a ismin⁴⁰.



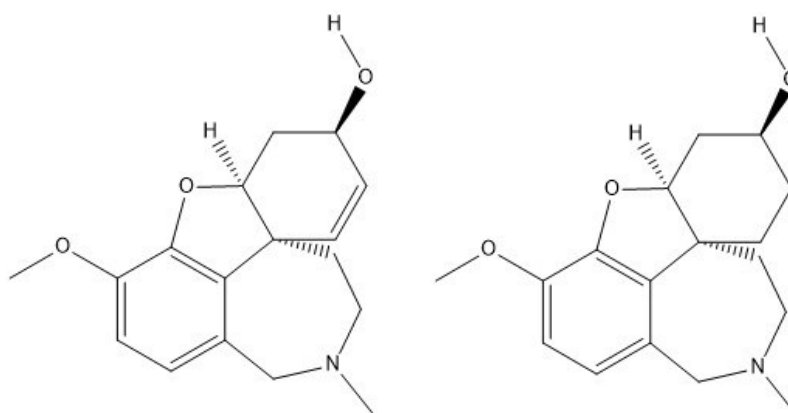
Obr. 18 - Narciklasin a pankratistatin

3.6.6 Galanthaminový typ

Posledními a zároveň nejdůležitějšími zástupci zmíněnými v této práci jsou alkaloidy náležející do skupiny galanthaminového typu. Mají jako strukturní základ dibenzofuran. Z terapeutického hlediska je nejdůležitějším zástupcem galanthamin, neboť je jedním ze základních léčiv Alzheimerovy choroby⁴⁰. Pro terapeutické účely je galanthamin získáván zejména z různých druhů a kultivarů rodu *Narcissus*, např. *Narcissus* cv. Carlton. Synteticky je vyráběn v menším množství. Od předchozích alkaloidů se liší zejména svým biologickým

účinkem. Proskurina a Yakovleva jej poprvé izolovaly v roce 1952 z cibule sněženky *Galanthus woronowii* a později i z jiných rostlin čeledi Amaryllidaceae⁵⁰. Na počátku 50. let minulého století byla náhodně objevena bulharskými farmakology jeho významná biologická aktivita. Díky tomu byl od té doby galanthamin experimentálně využíván k terapii neurologických poruch jako je myasthenia gravis, dětská obrna, různé typy demence nebo paralytické poliomyelitidy. Jeho nejvýznamnější schopností je reverzibilní kompetitivní inhibice acetylcholinesterasy, čehož se využívá zejména v terapii AD⁴⁰. Kromě toho allostericky moduluje presynaptické i postsynaptické nikotinové receptory, čímž je zároveň zvyšována nabídka acetylcholinu (ACh). Má rovněž neuroprotektivní působení proti poruše membránové fluidity, mitochondriálního membránového potenciálu a nedostatku glutathionu^{51,52}. Dále bylo prokázáno, že galanthamin snižuje tvorbu ROS jednak právě inhibicí mozkových AChE, jednak alosterickou modulací α -7 podjednotek nikotinových acetylcholinergních receptorů, čímž dochází ke stimulaci fosfoinozitin-3-kinasy a tím ke zvýšení exprese antiapoptického faktoru lymfomu B buněk 2 (Bcl-2). Galanthamin působí i protizánětlivě imunomodulací a snížením uvolňování prozánětlivých cytokinů. Snižuje též tvorbu inducibilní syntasy oxidu dusnatého a tím i samotnou produkci oxidu dusnatého⁵². Ukázalo se, že terapie AD galanthaminem vede k celkovému zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. Galanthamin má velkou výhodu, že vykazuje 53x větší selektivitu k AChE než k BuChE a zcela postrádá cytotoxickou aktivitu. Dnes je klinicky využíván k terapii lehké až středně těžké AD ve formě hydrobromidu^{40,51}.

Další zástupci náležející do této skupiny jsou například *O*-demethyllykoramin, memogain (proléčivo galanthaminu), acetylleukovernin a lykoramin. U těchto alkaloidů byla rovněž prokázána slibná inhibiční aktivita vůči AChE⁵³.



Obr. 19 - Galanthamin a lykoramin

3.7 Demence

Demence je název pro klinický syndrom, jehož součástí je nejméně 50 různých onemocnění. Přibližně 80 % demenčních pacientů trpí Alzheimerovou nemocí (AD). Další možné příčiny demence jsou zastoupeny primárním degenerativním onemocněním centrální nervové soustavy (CNS) jako je Huntingtonova nemoc, Parkinsonova nemoc a další, velkou skupinou různorodých poškození mozku. K nim patří například metabolická onemocnění, změny na cévách, hypoxie, nádory, posttraumatické stavy, hydrocefalus, stavy po encefalitidách, poškození mozku toxiny a léky a další onemocnění⁵⁴.

Při AD dochází k poškození vyšších korových funkcí, včetně paměti, myšlení, orientace, schopnosti řeči, učení úsudku, přitom vědomí není zastřeno. Poškození uvedených funkcí je provázeno zhoršením kontroly emocí, sociálního chování nebo motivace. Diagnózu demence lze určit na základě klinického obrazu a to psychiatrického (neuropsychiatrického) a psychologického vyšetření. K určení diagnózy nestačuje pouze patologický nález pomocí zobrazovacích technik, neboť rozsah atrofie či funkčního postižení se nemusí v každém případě shodovat se stupněm demence⁵⁵.

Celosvětově trpí demencí 47,5 milionů lidí. Je očekáváno, že výsledný počet lidí trpících demencí dosáhne v roce 2030 počtu 75,5 milionů a v roce 2050 dosáhne počtu 135,5 milionů⁵⁶.

3.7.1 Alzheimerova choroba

AD je progresivní neurodegenerativní proces spojený s charakteristickými neuropatologickými změnami. Postihuje velké procento populace zejména ve věku nad 65 let. AD je spojena s deficitem a poruchami řady neurotransmiterových systémů, zejména systému cholinergního. Jako terapeuticky nejslibnější látky se v současné době jeví právě inhibitory AChE a BuChE, neboť zejména AChE je aktivní až příliš, což vyústí v nízkou hladinu ACh v mozku⁵⁷.

V roce 1907 popsal německý psychiatr Alois Alzheimer charakteristické symptomy provázející degenerativní onemocnění mozku, dnes všeobecně známého pod jménem AD. Zjednodušeně se jedná o postupné odumírání a rozpad nervových buněk, které se na samotném počátku projevuje jako porucha krátkodobé paměti, ztráta iniciativy, ztráta zájmu o okolí, horší orientace a neschopnost rozhodování. Dále se s postupnou degenerací struktur v mozku objevuje porucha řeči, změna osobnosti a chování, porucha i dlouhodobé paměti, neschopnost vykonávat běžné rutinní úkony atp. V pokročilejší fázi onemocnění může dojít i k částečné nebo úplné ztrátě pohybových schopností, neovládání vylučování moči a stolice, nastává

porucha příjmu potravy, úplná zmatenost, nerozpoznávání osob (prozopagnózie – pacienti nejsou schopni rozpoznat obličeje), zapomínání jmen svých nejbližších a nechápání okolního dění⁵⁷.

AD má svůj individuální průběh, nicméně v průměru toto onemocnění trvá 9 let (uvádí se rozmezí 2 – 12 let). Má tři stadia: časně (mírné), střední a těžké (hluboké). Preklinické (asymptomatické) stádium může trvat až 20 let před objevením se prvních příznaků. Nejčastěji se AD vyvíjí pomalu a plíživě, trvale progreduje a končí smrtí pacienta⁵⁵. Pacienti s AD umírají díky neurodegeneraci na bronchopneumonie, úrazy a další bezprostřední příčiny, na které by stejně starý zdravý člověk běžně nezemřel. Pravděpodobně dochází k selhání neurohumorálního řízení homeostázy a k selhání adaptace organismu a imunitní odpovědi⁵⁸.

Diagnózu AD nelze stanovit pouze jediným klinickým vyšetřením, ale je nutné ji potvrdit rovněž i amnestickými údaji a testovým vyšetřením. Jako screeningový test je u nás používán nejčastěji MMSE neboli tzv. „Mini Mental State Exam“, avšak tento test není vždy spolehlivý. Test kreslení hodin (Clock – drawing test) je pro AD specifitější. Užitečné jsou též složitější testy kognitivních funkcí, především ADAS – cog (AD assessing test – kognitivní složka), ale existují i další. Diagnóza AD je následně potvrzena pomocí tzv. biomarkerů choroby. Hlavními biomarkery AD jsou přítomné atrofie mediálních temporálních struktur mozku (hippokampu, amygdaly) s rozšířením komorového systému, především temporálních rohů postranních komor. Tyto změny jsou diagnostikovány zobrazovacími metodami počítačové tomografie (CT) a magnetické rezonance (MRI). Dalším důležitým biomarkerem je změna poměrů některých proteinů v cerebrospinální tekutině (CSF) charakteristických pro AD jako například zvýšená hladina proteinu tau a snížená hladina β -peptidu₁₋₄₂^{58,59}.

AD je primárně onemocněním šedé kůry mozkové⁵⁵. Dochází k následujícím změnám struktury mozku: redukcii počtu neuronů, změně neurofibril, objevují se senilní plaky, granulovakuolární tělíska v cytoplasmě neuronů (vakuoly o velikosti 3–5 μ m s centrálním jemně granulovaným útwarem) a Hiraniho tělíska. Dále bývá potvrzena amyloidóza drobných cév pia mater a kůry mozkové. Tyto uvedené změny nejsou pro AD charakteristické, vyskytují se i v mozku starších osob bez klinické odezvy a jsou součástí i jiných degenerativních onemocnění. Pro diagnózu AD je charakteristické, že výše uvedené změny jsou velmi početné a charakteristicky rozložené⁵⁴.

Ve spojení s AD byla dokumentována autozomálně recesivní dědičnost s genetickým defektem na 21. chromozomu, kdy je přítomný genetický defekt bílkovinného prekurzoru β -amyloidu. Je to jeden z rizikových faktorů, kdy dochází k tomu, že fragment amyloidového prekurzorového proteinu (APP), nazývaný monomer β -amyloidu, vzniká patologicky

změněným štěpením APP a následným shlukováním až do vzniku proteinových vláken vytvářejících dále nerozpustné tzv. senilní plaky⁶⁰. Tyto molekuly jsou velmi neurotoxické. Samotný APP je přirozeně se vyskytující dlouhý neuronální transmembránově uložený protein s extracelulárními doménami, normálně fyziologicky produkovaný metabolismem. Napomáhá při růstu a obnově neuronu při jeho případném poškození. Za normálních podmínek je štěpen enzymem α -sekretasou na krátké, plně rozpustné fragmenty nazývané β -peptid₁₋₄₀ o délce 26 aminokyselin, procházející fyziologicky skrz buněčné membrány. Při patofyziologii AD se však uplatňují enzymy β - a γ -sekretasa, štěpící APP na delší fragmenty β -peptidu o 42 a více aminokyselinách, tedy monomery amyloidu β ($A\beta$)⁵⁸. Ke koagulaci monomerů $A\beta$ dochází v extracelulárním prostoru mozkové kůry. Poté dochází k jejich polymeraci, a tak dochází ke vzniku extracelulárního patologického proteinu β -amyloidu. Společně s apolipoproteinem E4 (ApoE4), proteoglykany a α_1 -antichymotrypsinem tato amyloidová vlákna mohou agregovat v senilní plaky o průměru desítky až stovky μm . Tyto útvary jsou detekovatelné pomocí metody pozitronové emisní tomografie (PET) při použití látek vážících se na β -amyloid, například ¹⁸fluorodeoxyglukózy. V důsledku toxicity $A\beta$ pak dochází k aktivaci některých proteinkinás, například glykogensyntasy kinasy 3 (GSK-3)^{60,58}.

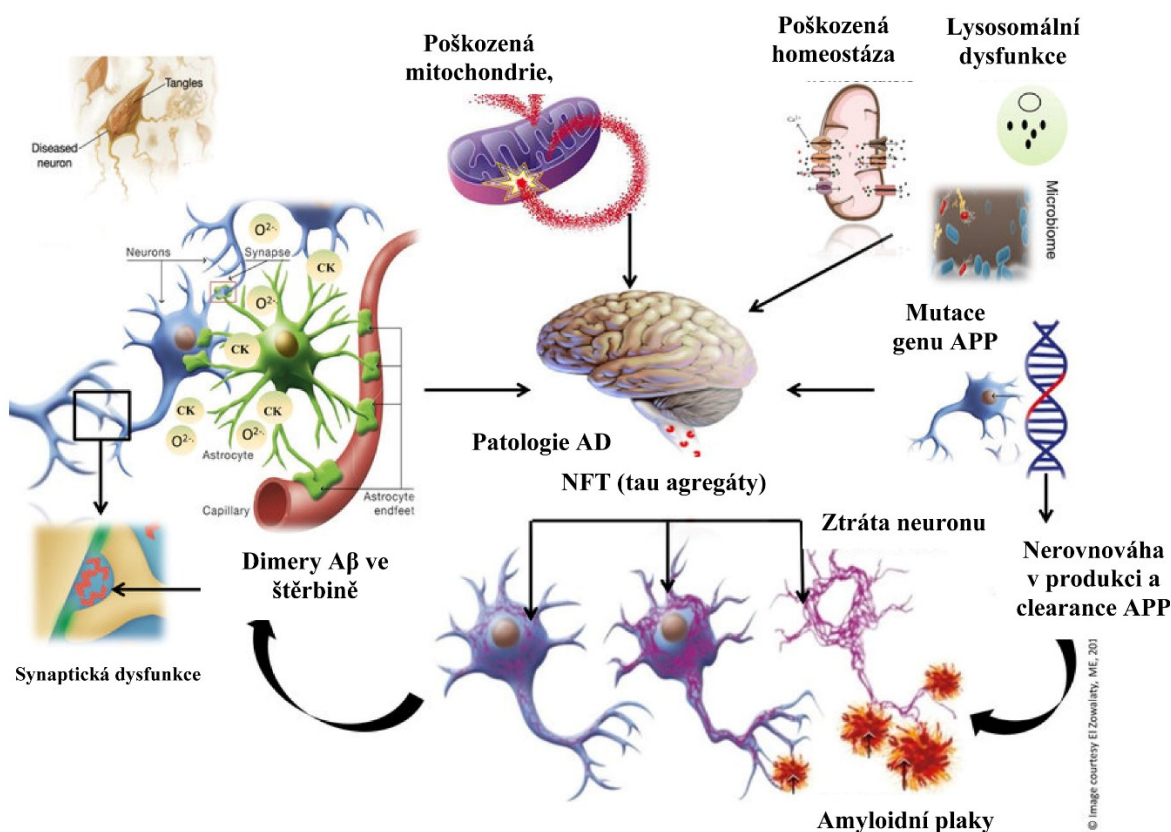
Výše zmíněné procesy zapříčiní, že peptidy β -amyloidu reagují s receptory na povrchu buněk, jako je receptor for advanced glycation and products (RAGE) a scavenger receptor (RA). Následně vznikají ROS, které mohou prostřednictvím depolarizace buněčné membrány a aktivace receptorů NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) zvyšovat neuronální intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Kyslíkové radikály a vysoká koncentrace Ca^{2+} podporují buněčnou smrt neuronů. V mikrogliových buňkách stimuluje aktivace RAGE a RA tvorbu, popř. postupné uvolňování: NO, prostaglandinů, excitotoxinů, cytokinů, TNF- α a dalších. Tím se indukuje zánětlivá odpověď, díky které rovněž dochází k odumírání neuronů a další neurotoxicitě. Zvýšená koncentrace osmolytu inozitolu pak svědčí o poruše celkové regulace buněčného objemu. Zánik neuronů může být akcelerován deficitem nervového růstového faktoru (NGF) nebo NGF-receptorů, a tak může být dodáním NGF tento proces zpomalen^{60,61}.

Fyziologická funkce proteinu tau spočívá ve formování a stabilizaci mikrotubulů, které jsou součástí cytoskeletu neuronu a zprostředkovávají transport důležitých látek. Fosforylace cytoskeletálního proteinu tau (katalyzovaná GSK-3) způsobuje vznik hyperfosforylovaného rozpustného proteinu tau, což dále vede k tvorbě intracelulárních neurofibrilárních uzlíčků (NFT). K aktivaci GSK-3 dochází výše zmíněnou kaskádou spojenou s toxicitou $A\beta$. V důsledku toho dochází k destrukci mikrotubulů a takto postižené neurony pak podléhají apoptóze. U AD se celkově apoptóza značně zvyšuje a dochází tak ke kortikosubkortikální

atrofii mozku. Snižuje se též synaptická plasticita, nastává snížená produkce některých růstových faktorů mozku a dochází k dalším degenerativním změnám^{58,61}.

Dalším onemocněním, při kterém se objevují depozity amyloidu, je Downův syndrom (trizomie 21. chromozomu), který je rovněž spojen s vyšším rizikem demencí a u kterého je u osob nad 40 let věku Alzheimerova choroba pravidlem. Stejně tak řada dalších genetických defektů (např. ApoE, presenilin 1 a 2) společně s vlivem zevních faktorů (faktory životního prostředí, toxiny) mohou vyústit právě v tvorbu a depozity amyloidu. V postižených oblastech mozku byla biochemicky prokázána kromě deficience ACh i deficience cholin-acetyltransferasy (až o 90 %), což je enzym důležitý pro tvorbu acetylcholinu. Klesají také koncentrace dalších neurotransmiterů, jako noradrenalinu, serotoninu, neuropeptidu Y, substance P a kortikotropin releasing hormonu (CRH)⁶⁰.

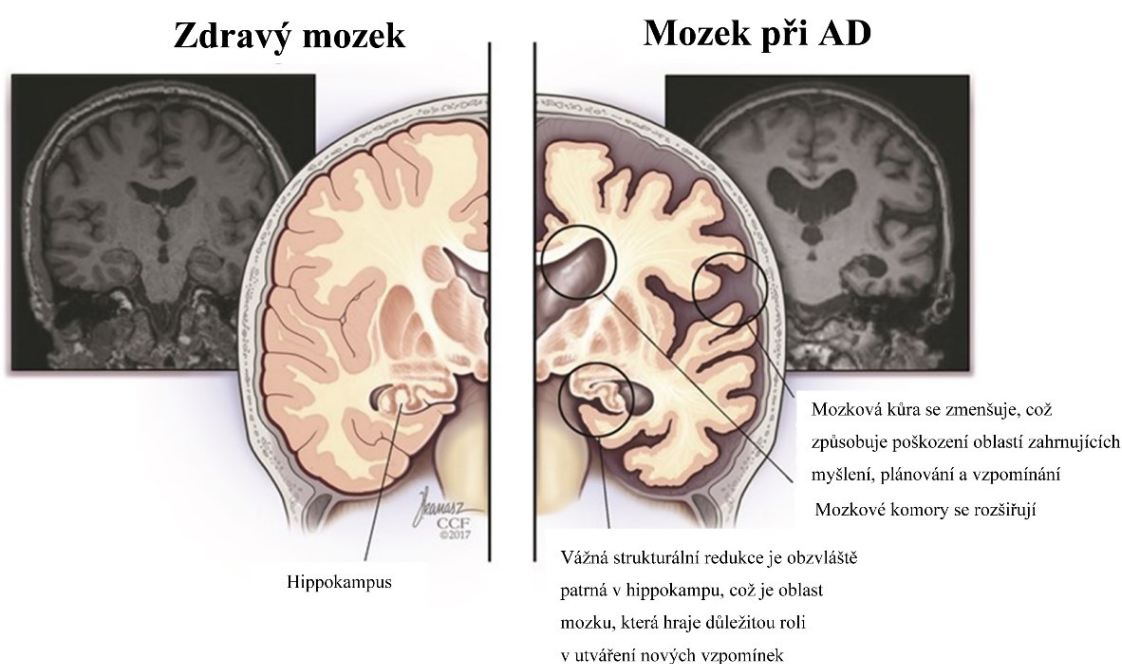
Na obrázku č. 20 můžeme vidět schéma patofyziologie AD. K zániku neuronů, atrofii mozku a vzniku AD vede poškození mitochondrií oxidativním stresem, porušená homeostáza vápníku, lysosomální dysfunkce, produkce amyloidních plaků, tvorba neurofibrilárních uzlíčků zahrnující poruchu přenosu vzruchů a poškození neuronů volnými radikály.



Obr. 20 – Schéma patofyziologie AD⁶²

Je známo, že existují dvě formy Alzheimerovy choroby, které se liší dle skutečnosti, v jakém věku choroba započne a také dle jejího genetického základu. V případě časného záchytu choroby se symptomy objevují do 65 let. Forma s časným začátkem (presenilní forma) je poměrně vzácná. Mezi ní se často vyskytují familiární formy (s hereditárním podmíněním, fAD). V případě pozdního záchytu, známém také jako senilní nebo sporadická forma (sAD), je zde větší genetická predispozice, ale individuálně je zde menší dopad. Tato forma se vzácně objevuje ve věku nižším než 65 let a je výrazně častější. Ačkoliv je rozsah a komplexnost faktorů u sAD větší než u fAD, choroba progreduje obdobně pro obě formy a má velmi podobnou symptomatologii a neuropatologii^{56,58}.

Mozek zasažený AD je celkově zmenšený, váha může být redukována až pod 900 g. Pro představu mozek zdravého člověka průměrně váží 1 300 g u žen a 1 400 g u mužů; váha dosahuje maxima mezi 30–40 lety, v dalším období se přirozeně snižuje. Jak je patrné z obrázku č. 21, závitky na mozku jsou zúžené, rýhy rozšířené a maximum změn bývá v okcipitálních a ve frontálních lalocích. Atrofie postihuje také bílou hmotu, hippocampus a bazální ganglia. Mozeček a mozkový kmen zůstávají většinou nezměněny. Atrofii provází rozšíření postranních komor (hydrocefalus e vacuo)⁵⁴.



Obr. 21 – Rozdíl mezi mozkem zdravého člověka a mozkem zasaženým Alzheimerovou chorobou⁶³

Do 85 let je incidence AD pro ženy i muže srovnatelná. Nad 85 let je incidence u mužů nižší, ačkoliv incidence vaskulárního typu demence roste. Ve výsledku jsou ženy ve vyšším

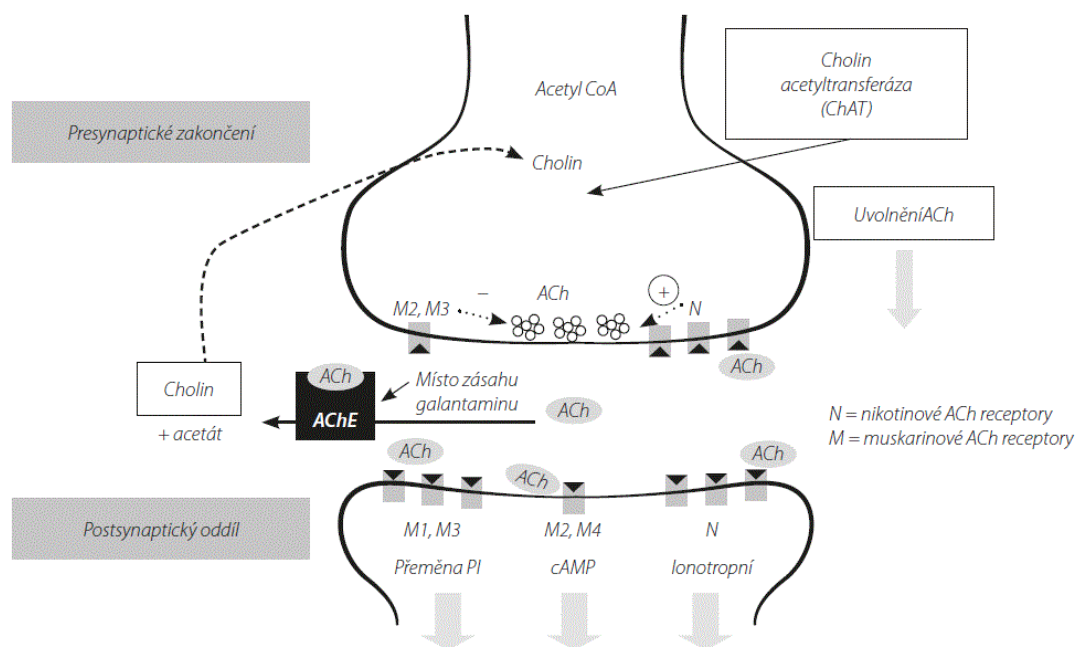
věku postiženy AD častěji než muži. Komplexní etiopatogeneze AD zatím známa není, a proto nejsme schopni tuto nemoc kauzálně léčit^{54,56}.

3.7.2 Terapie Alzheimerovy choroby

Terapie AD používaná v současné době je limitována na podávání léčivých přípravků ovlivňujících symptomatologii. Je tedy schopna progresi choroby pouze modulovat či zpomalovat. Jejím hlavním cílem je oddálení těžkého stádia choroby, která zahrnuje nesoběstačnost a institucionalizaci pacientů. V průběhu terapie je též snaha zlepšit kvalitu života těchto pacientů^{58,64}.

Farmakoterapie je rozdělována na terapii kognitivní, kterou je možné ovlivnit postižené kognitivní funkce, a na farmakoterapii nekognitivní, která zahrnuje ovlivnění především postižených behaviorálních a psychologických příznaků demence. U poruch chování nebo u přidružených psychotických příznaků se používají léčivé přípravky ze skupiny antipsychotik. U přidružených depresí jsou v terapii používána moderní antidepresiva⁵⁸.

Farmakoterapie zlepšující kognitivní funkce je rovněž označována jako terapie modulující klinický obraz choroby. Zatím existují pouze dva terapeutické přístupy, které jsou široce doporučovány a které jsou také podloženy experimentálními důkazy (tzv. „evidence-based approach“)^{58,59}.



Obr. 22 – Cholinergní synapse v CNS⁵²

Použití inhibitorů mozkových cholinesteras (AChE, BuChE) je základem prvního terapeutického přístupu. Jejich užití v léčbě demence vychází z prokázaného deficitu neurotransmiteru ACh v mozku u nemocných s Alzheimerovou chorobou, ale i u jiných demencí, což naznačuje abnormální aktivitu AChE. AChE se vyskytují v neuromuskulárních spojích, synapsích cholinergních neuronů CNS a také v červených krvinkách, kde způsobují rychlou hydrolyzu ACh na acetát a cholin. Díky tomu je působení ACh na postsynaptických receptorech zastaveno a cholinergní neurony se vrátí do inaktivovaného stavu. U Alzheimerovy choroby se navíc uplatňuje další enzym BuChE, který je za normálních podmínek v mozku naprosto minoritní, ale v průběhu AD se jeho aktivita zvyšuje. Enzym BuChE je rovněž schopen stejným způsobem inaktivovat acetylcholin na acetyl a cholin. Je produkován játry, detekován v plasmě a také exprimován v neuronech CNS^{65,55}.

Inhibicí AChE, eventuálně i BuChE, se zvyšuje nabídka ACh v cholinergních synapsích a účinek ACh na postsynaptickém receptoru je tak prodloužen. Bylo též prokázáno, že inhibice cholinesteras snižuje toxicitu i tvorbu β -amyloidu a zasahuje tak do neurodegenerativních mechanismů AD⁶⁶. Inhibitory AChE představují léky první volby především u lehkých a středně těžkých forem AD, u nichž ještě existuje naděje na zpomalení rozvoje demence. Tyto látky musí dobře procházet hematoencefalickou bariérou, nesmějí výrazněji ovlivňovat periferní cholinesterasy. Je vhodné zahájit léčbu co nejdříve po stanovení diagnózy zvolna zvyšujícími se dávkami léčivé látky. Jsou všeobecně dobře tolerovány. Nejčastějšími nežádoucími účinky, zvláště při zahájení léčby a při zvyšování dávky, jsou zažívací potíže (nauzea, zvracení, bolesti břicha, průjem), anorexie a úbytek hmotnosti. Tyto nežádoucí účinky léčbu limitují. Inhibitory AChE prokazatelně pomáhají prodloužit období lehčího stadia demence, v jehož průběhu je pacient relativně soběstačný nebo alespoň méně závislý na péči okolí. Oddalují vznik těžkého stadia poškození kognitivních funkcí, kdy je naopak postižený plně vázán na péči okolí a často institucionalizován⁶⁷.

V současnosti jsou klinicky schválené 3 léčivé přípravky, které se liší svou afinitou k cholinesterasám, farmakokinetikou i farmakodynamikou^{58,68}.

Donepezil (*Aricept, Yasnal, Alzil*) působí jako velmi čistý nekompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE. Z těchto 3 léčivých látek má nejdelsí biologický poločas, více než 70 hod., což umožňuje podávání 1x denně. Počáteční dávka je 5 mg/den, při dobré toleranci se může po měsíci zvýšit na 10 mg/den. Je dobře tolerován, má malý výskyt nežádoucích účinků^{58,64,59}.

Galanthamin (*Galantamin Mylan*) je čistý inhibitor AChE a mimo jiné vykazuje i allosterickou modulaci nikotinových receptorů, jak již bylo uvedeno. Má kratší biologický poločas, je podáván 1x denně (retardovaná forma) nebo 2x denně (neretardovaná forma).

Dávkování je 1x 8 mg/den (2x 4 mg/den) 4 týdny, poté zvýšení na 1x 16 (2x 8) mg/den další 4 týdny a nejvyšší dávkou je 2x 12 (1x 24) mg/den. Galanthamin je zpravidla dobře snášen, jeho nežádoucí účinky jsou minimální^{58,59}.

Rivastigmin (*Exelon, Nimvastid*) inhibuje mozkovou AChE, ale i BuChE. Z tohoto důvodu se u něho objevuje více nežádoucích gastrointestinálních účinků, které ale bývají přechodné. Tento přípravek působí rovněž velmi dobře na psychotické příznaky. Je jediným inhibítorem mozkových cholinesteras, který má také schválenou indikaci demence při Parkinsonově chorobě. Rivastigmin je užíván perorálně první 2 týdny 2x 1,5 mg/den, při dobré toleranci může být dávka zvýšena na 2x 3 mg/den, minimálně po 2 týdnech s dobrou tolerancí je možno zvýšení na 2x 4,5 mg/den a po dalších minimálně 2 týdnech při dobré toleranci lze dávku zvýšit až na maximální dávku 2x 6 mg/den. Existuje také rivastigmin v náplast'ové formě (*Exelon Patch*), která se aplikuje 1x za 24 hodin a nezpůsobuje nežádoucí účinky GIT^{59,58}.

Druhý terapeutický přístup při AD je založen na použití blokátorů receptorů NMDA glutamanerčního systému. U nás jsou schváleny léčivé přípravky obsahující jedinou používanou léčivou látku s tímto mechanismem účinku, což je memantin (*Ebixa, Cognomem, Mantomed*). Účinkuje jako napět'ově závislý, středně afinitní antagonist glutamátových receptorů NMDA a zároveň blokuje i přemíru aktivity těchto receptorů. Umožňuje ale při tom jejich fyziologickou funkci, nezbytnou pro tvorbu pamět'ových stop. Memantin má silné ochranné působení proti excitotoxickému působení glutamátu na neurony a inhibuje proteinkinasu GSK-3 β , která spouští degeneraci neuronálního proteinu tau^{58,64,68}.

Memantin je podáván perorálně v neretardované formě 2x denně 10 mg (začíná se 1x 5 mg/den a každý týden se přidává 5 mg). Je to látka s příznivým bezpečnostním profilem a obecně je dobře snášen. Pokud se vyskytnou nežádoucí účinky, projevují se nejčastěji jako zmatenost, závratě, zácpa, bolest hlavy a somnolence. Může být užíván jak v monoterapii, tak rovněž v kombinaci s inhibitory AChE. Kombinace memantinu a inhibitorů AChE vykazuje vyšší účinnost a bezpečnost v porovnání s monoterapií. Pozitivně ovlivňuje především střední a těžkou formu AD^{58,59,68}.

Léčba AD se neskládá pouze z farmakoterapie. Jsou rovněž vyžadovány psychoterapeutické a socioterapeutické přístupy. Důležitou roli zde hrají reedukační terapie, kdy je nutno procvičovat s postiženými ty funkce, které stále zůstaly zachovány, nikoli se snažit učit je funkce, které již zapomněli. Významnou složkou léčby pacientů s AD je práce s jejich pečovateli a nejbližšími příbuznými. Tyto osoby jsou pravidelně vystavovány silné zátěži jak psychické, tak fyzické i ekonomické. Významné místo v edukaci pečovatelů má Česká alzheimerská společnost⁵⁸.

Některé studie poukazují na terapeutický účinek a výbornou toleranci purifikované formy extractum ginkgo biloba EGb 761. Standardizovaný extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 je považován za méně účinný než inhibitory cholinesteras a memantin. Je však v současné době uváděn v doporučeních neuropsychiatrických společností pro léčbu AD jako alternativa při nesnášenlivosti inhibitorů cholinesteras nebo k adjuvantní léčbě^{64,69}.

3.7.3 Příklady nově testovaných látek v klinických studiích

V důsledku nedostatečné efektivity současně schválených léků existuje velká snaha o objevení nových molekul s potenciálem výrazně změnit průběh nemoci. V březnu roku 2020 probíhalo až 226 klinických zkoušek ve fázi I. až III. intervenčních studií⁷⁰. Vývoj nových léčiv se strategicky mění, přičemž se vychází ze současných aktuálních poznatků patofyziologie AD. Účinné látky s potenciálním využitím ovlivňují cholinerní deficit, tvorbu a eliminaci patologických proteinů β -amyloidu ($A\beta$) a proteinu tau, zánětlivé procesy, nedostatek neurotrofních faktorů, mitochondriální dysfunkce, inzulinovou rezistenci a další patofyziologické procesy AD⁶⁴.

3.7.3.1 Inhibitory AChE

Mezi prvními používanými látkami se v klinických studiích objevil inhibitor cholinesteras takrin. Použití takrinu v klinické praxi bylo komplikováno jeho toxicitou (hepatotoxicita, GIT dyskomfort), proto byl z trhu stažen. V současnosti probíhá intenzivní výzkum a vývoj jeho nových derivátů a derivátů 7-methoxytakrinu se zachovanou účinností, ale menší toxicitou⁶⁴.

3.7.3.2 Látky snižující tvorbu β -amyloidu

Největší skupina v současnosti vyvíjených látek cílí na patologický $A\beta$. Hypotéza amyloidní kaskády byla formulována již v roce 1992 Hardym a Higginsem, ačkoliv potenciálně slibné látky v pozdních klinických studiích neukázaly dostatečnou účinnost^{64,70}.

Novými látkami redukujícími tvorbu patologického $A\beta$ jsou inhibitory β -sekretas, inhibitory a modulátory γ -sekretas a také aktivátory (enhancery) α -sekretas. Vyvíjené inhibitory β - a γ -sekretas jsou omezeny nutností přestupu přes hematoencefalickou bariéru a rovněž faktem, že sekretasy štěpí i jiné fyziologicky důležité substráty než $A\beta$. Jedním z těchto substrátů je Notch protein regulující buněčnou proliferaci, diferenciaci a růst buněk. Narušená funkce Notch proteinu zapříčinila přerušování klinických studií neselektivních inhibitorů

γ -sekretas vykazujících mnoho nežádoucích účinků včetně hematotoxicity, GIT potíží, kožních reakcí a změn barvy vlasů⁶⁴.

Ačkoliv byla vyvinuta druhá generace selektivních inhibitorů γ -sekretas s lepším bezpečnostním profilem, tzv. „Notch šetřící“ inhibitory (např. begacestat), výsledky klinických studií těchto inhibitorů/modulátorů nejsou příliš nadějně⁶⁴.

Inhibitory β -sekretas se prokázaly jako zajímavější látky. Prvními látkami ze skupiny inhibitorů β -sekretas byla perorálně podávaná antidiabetika pioglitazon a rosiglitazon. Jejich mechanismem účinku je stimulace jaderného receptoru PPAR γ , který vykazuje určité protizánětlivé účinky, snižuje toxicitu A β a zvyšuje tvorbu antiapoptického faktoru Bcl-2⁶⁴.

III. fáze klinického zkoušení dosáhlo pět inhibitorů β -sekretasy 1 (BACE1) jako je verubecestat, lanabecestat, atabecestat, umibecestat a elenbecestat. Všechny tyto látky působily na efektivní snížení hladin A β v cerebrospinnální tekutině u pacientů s AD. Nicméně všechny tyto látky byly z klinického zkoušení vyřazeny z důvodu nedostatečného kognitivního a funkčního zlepšení. Bylo dokonce zpozorováno i zhoršení kognitivních funkcí a vyšší incidence nežádoucích účinků⁷⁰.

V klinických studiích jsou zkoušeny i látky, které brání agregaci A β peptidů v oligomery, které jsou považovány za nejvíce neurotoxické. Tyto látky se naváží na rozpustné peptidy A β a inhibují jejich agregaci v oligomery a předcházejí tak neurotoxicitě a odumření neuronů. Byly studovány dvě látky: scyllo-inositol a tramiprosat (3-amino-1-propanesulfonic acid; 3-APS)⁷⁰.

Scyllo-inositol byl velice slibný u pacientů s lehkou až středně závažnou AD, ačkoliv jeho efektivita nebyla dostačující. V nejvyšších dávkách pak měl závažné nežádoucí účinky způsobující infekce i smrt. Scyllo-inositol je z hlediska efektivit dále prozkoumáván⁷⁰.

Tramiprosat ve III. fázi klinického hodnocení u pacientů s lehkou až středně závažnou AD neukázal významné rozdíly ve zlepšení kognice. Nicméně jeho proléčivo, ALZ – 801, je v současnosti intenzivně studováno⁷⁰.

S vědomím, že akumulace A β a jeho agregace je hlavní příčinou neurodegenerace při AD, je představa o zvýšení jeho odstraňování pomocí specifických anti-A β protilátek velmi rozumnou a nadějnou strategií⁷⁰.

Aktivní imunizace neboli stimulace imunitního systému pacienta k produkci protilátek pomocí intramuskulární vakcíny s A β nebo jeho fragmenty proti A β , vedla k nedostatečné imunologické odpovědi a řadě nežádoucích účinků. Proto klinická studie zahrnující aktivní imunizaci byla zastavena z důvodu výskytu aseptické meningoencefalitidy způsobené aktivací T-lymfocytů. Je dále zkoušena u pacientů s prodromálními symptomy AD. V současnosti je ve II./III. fázi klinického hodnocení látka s dobrým bezpečnostním profilem bez schopnosti

aktivace T-lymfocytů, amilomotid. Další nadějnou látkou se jeví vakcína ABvac40, která jako jedna z prvních cílí na A β ₄₀ peptid. Skládá se z několika opakujících sekvencí krátké verze syntetického peptidu A β ₄₀. Při aplikaci této vakcíny dochází ke vzniku imunitní odpovědi a produkci specifických protilátek proti peptidu A β ₄₀⁷¹. V I. fázi byla zkoušena u pacientů s lehkou až středně těžkou formou AD. Je dobře tolerována s dobrou odpovědí imunitního systému. Ve II. fázi je zkoušena i na pacientech s prodromální AD. Tato studie by měla být dokončena pravděpodobně v prosinci roku 2022. Zkoušeny jsou ještě další vakcíny obsahující syntetické peptidy specifických sekvencí A β jako AD02, V950 a UB-311⁷⁰.

Oproti tomu pasivní imunizace je založena na administraci monoklonálních či polyklonálních protilátek namířených proti A β či jeho agregovaným formám. III. fáze klinického hodnocení dosáhlo 6 monoklonálních protilátek (bapineuzumab, solanezumab, crenezumab, gantenerumab, aducanumab a BAN2401). Ačkoliv je zde výhodou menší výskyt nežádoucích účinků, tato terapie vyžaduje opakované podávání protilátek v infuzích, přesný výběr cílů pro antigeny, vyvolání imunitní reakce po aplikaci protilátky a přestup přes HEB. Ačkoliv byl patrný pokles A β plaků a CSF biomarkerů, u těchto monoklonálních protilátek nebyla zatím prokázána dostatečná efektivita^{64,70}.

Jediná monoklonální protilátka aducanumab (Aduhelm®) byla schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) po 3. fázi klinického hodnocení 7. června 2021 zrychleným procesem jako první terapie AD od roku 2003. Je to plně humánní IgG1 monoklonální protilátka, která se váže selektivně na agregované fibrily A β a snižuje výskyt A β senilních plaků v mozku pacientů s AD. U této velmi nadějně protilátky proběhla i 3. fáze klinického hodnocení, a to pod vedením firmy Biogen® (2015–2019), kde byla hodnocena zejména její efektivita a bezpečnost. Během této fáze se projevila výrazná redukce A β plaků v mozku, a přestože měla trvat další tři roky, nakonec splnila 3. fázi klinického hodnocení dříve. Nicméně, Aduhelm® je registrovaným lékem pouze v USA a jeho užívání je FDA dále monitorováno. Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) poukázala na to, že další studie po schválení klinického hodnocení nepotvrdily dostatečnou prospěšnost v porovnání s rizikem vedlejších účinků jako otok a krvácení, které se objevily u některých pacientů. Proto EMA odmítá léku Aduhelm® udělit povolení k uvedení na evropský trh⁷².

Další slibnou protilátkou je lecanemab (BAN2401), humanizovaná monoklonální protilátka, jež se váže selektivně na rozpustné A β protofibrily. Ukázala dobrou toleranci a významnou redukci kognitivní dysfunkce i redukci akumulace A β v mozku. Plánované dokončení studie je v červenci roku 2024^{64,72}.

3.7.3.3 Terapie zaměřená na protein tau

Látky zaměřující se na patologický protein tau se snaží zabránit jeho hyperfosforylaci, agregaci a zlepšovat jeho degradaci. Role proteinu tau však zůstává stále neobjasněná, nicméně studie ukazují jeho důležitou funkci při shromažďování a stabilizaci cytoskeletálních mikrotubulů. V posledních letech je těmto látkám věnována větší pozornost než látkám ovlivňujícím A β ^{64,70}.

První z přístupů je založen na nevyvážené aktivitě proteinkinasy a fosforylasy, přičemž se v patologii proteinu tau jeví jako nejdůležitější kinasa GSK-3 β . Mezi inhibitory GSK-3 náleží látky používané v psychiatrii jako stabilizátory nálady, lithium či valproát. Tyto látky snižují fosforylaci proteinu tau a působí neuroprotektivně. Lithium bylo zkoušeno v malé studii a bylo podáváno pacientům s mírnou progresí AD, u nichž se projevil náznak zpomalení progresse kognitivní dysfunkce. K dostatečnému prokázání klinického prospěchu lithia je nezbytné provést další studie^{64,70}.

Derivát methylenové modři leukomethylthionium bis hydromethanesulfonát (LMTM) se také jeví jako slibná sloučenina, která se dostala do II. fáze klinických studií. LMTM účinkuje jako inhibitor hyperfosforylace proteinu tau a jeho agregace. Byla u ní prokázána dobrá biologická dostupnost a snášenlivost. Byla testována u pacientů s AD i u pacientů s frontotemporální demencí. Ve III. fázi klinického hodnocení látka zpočátku neukázala zpomalení progresse kognitivní a funkční dysfunkce, ale další analýza zaznamenala potenciální benefity dle velikosti dávky a studie by měla být dokončena v prosinci roku 2022^{64,70}.

V posledních letech se věnuje větší pozornost právě imunoterapii spojené s proteinem tau. Obě strategie, aktivní i pasivní imunizace, cílí na produkci protilátek, které se specificky naváží na patologické konformery proteinu tau bez toho, aniž by se navázaly na nepatologický protein tau. Tímto dochází k odstraňování abnormálního proteinu tau a tím také k redukci ztráty neuronů a dalších klinických symptomů s tím spojených⁷⁰.

Je známo, že agregáty proteinu tau se akumuluji nejčastěji uvnitř neuronu, proto zde nastaly obavy, aby protilátky byly schopné penetrace do neuronů. Nicméně studie ukázaly, že protilátky přestupují přes HEB i penetrují do neuronů. To je zajištěno zejména receptory zprostředkovanou endocytózou, ale může se objevovat rovněž penetrace celkovou endocytózou, tzn. hromadnou tvorbou synaptických váček na nervových zakončeních⁷⁰.

V aktivní imunoterapii jsou používány syntetické peptidy imitující patologické proteiny tau jako antigeny. Tím se v imunitním systému indukuje tvorba potřebných protilátek proti těmto antigenům. První anti-tau vakcínou byla AADvac1 obsahující syntetický peptid specifické sekvence proteinu tau. Tato vakcína ukázala dostatečnou bezpečnost v I. a II. fázi

klinického hodnocení u lehkých forem AD. Byl potvrzen signifikantní pokles biomarkerů CSF v krvi, což ukazuje potenciální zpomalení patologie proteinu tau. Látka se ukazuje jako dobře tolerovaná a pravděpodobně dosáhne III. fáze klinického hodnocení⁷⁰.

Pasivní imunoterapie využívá injekci monoklonálních protilátek namířených proti patologickému proteinu tau. Celkem čtyři anti-tau protilátky dosáhly II. fáze klinického hodnocení: Gosuranemab, Tilavonemab, Semorinemab a Zagotenemab. Všechny tyto látky se zdají být nadějně, bezpečné a dobře tolerované. Výsledky dosavadních studií zatím nebyly publikovány a studie dále pokračují⁷⁰.

3.7.3.4 Léčiva interagující s mitochondriálními enzymy

Dalším možným cílem terapie jsou mitochondriální enzymy. Díky nadměrné tvorbě A β dochází k poruše mitochondriálního metabolismu. Rozpustný A β je zodpovědný za zvýšenou tvorbu ROS (především peroxidu vodíku), které snižují výkonnost mitochondriálních enzymů, především cytochrom oxidasy. AD je ještě k tomu často doprovázena sníženou expresí mitochondriální superoxid dismutasy 2, neboli enzymu, který tyto volné kyslíkové radikály odstraňuje. Mimo jiné dochází i k nadměrné tvorbě enzymového komplexu alkoholdehydrogenasy vázající amyloid β (ABAD). Na něj se vážou oligomery A β a tím dochází k dalšímu zhoršování buněčného dýchání. Pro tyto účely jsou hledány potenciální blokátory tohoto komplexu⁷³.

Frentizol, známý také jako imunosupresivum a antivirotikum používané například k léčbě revmatické artritidy, byl identifikován jako blokátor A β – ABAD interakce. Jeho další deriváty a analoga jsou dále vyvíjeny a testovány. První syntetizované ABAD modulátory (ABAD-4a, ABAD-4b) vykazovaly ochranné účinky na mitochondriální funkci^{64,73}.

Ačkoliv bylo značnou snahou farmaceutického výzkumu nalézt nové potenciální látky k léčbě AD, od roku 2002 (registrace memantinu v Evropě) byl registrován zatím pouze v USA jediný nový léčivý přípravek určený k léčbě AD, který úspěšně prošel 3. fází klinického hodnocení (Aduhelm®). Více než 200 potenciálních léčiv skončilo v II. fázi klinických studií⁶⁴.

Pro další možné farmaceutické výzkumy je nutná pokročilejší a podrobnější znalost patofyziologie AD, jelikož nám stále nejsou známy přesné mechanismy neurodegenerace AD. Nadějí do budoucna se zdá být komplexní přístup, kdy cílem terapie přestává být pouze jeden protein. Nové látky by měly ovlivňovat více patofyziologických mechanismů, orgány a další buněčné cíle. Nejvíce slibnými se zdají právě kombinace léčiv s různým mechanismem účinku. Prozatím je možné kombinovat pouze inhibitor AChE a memantin⁶⁴. Novou potenciální

strategií by také mohlo být zacílení na gliové buňky, zejména astrocyty a mikroglie, jejichž funkce v patologii AD musí být ještě objasněna⁷⁰.

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace

Veškerá rozpouštědla využívaná během experimentální části, byla před použitím patřičně predestilována. Nejprve byl zachycen destilační předek, což činí asi 5 % původního objemu. Dále následovalo zachycení hlavní frakce, přičemž bylo predestilováno maximálně 90 % původního objemu rozpouštědla. Daná rozpouštědla byla poté uchovávána v souladu s předpisy ve správně označených širokohrdlých lahvích, chráněných před světlem.

4.1.2 Příprava Mayerova činidla

Mayerovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 g jodidu draselného ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g chloridu rtuťnatého (ve formě prášku). Nejprve se vytvořila sraženina jodidu rtuťnatého, která se po chvíli během míchání rozpustila na komplexní tetrajodortuťnan draselný. Objem činidla byl doplněn do 100 ml. Výsledný roztok byl čirý, nažloutlé barvy. Byl uchováván v chladničce při 4 °C. Zůstává stálý několik měsíců.

4.2 Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení

4.2.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomocný materiál

- Ethanol 96%, denaturovaný metanolem, (EtOH), (Penta a.s.)
- Destilovaná voda, (H₂O)
- Chloroform p.a., (CHCl₃), (Penta a.s.)
- Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru, (Et₂O), (Penta a.s.)
- Uhličitan sodný 10% roztok (w/w), (Na₂CO₃), (Lachema)
- 2% kyselina chlorovodíková, (HCl)
- Síran sodný bezvodý čistý, (Na₂SO₄), (Penta a.s.)
- Mayerovo činidlo

4.2.2 Přístrojové vybavení

- Vakuová odparka Heidolph – Hei-VAP Advantage G1
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)

- Plynový chromatograf Agilent Technologies 790 A s hmotnostním detektorem 5975C inert MSD, EI mód 70 eV, kolona 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 vyhodnocování výsledků

- Knihovna EI – MS spekter NIST Virtual Library 2011 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

4.3 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly použity čerstvé cibule různých kultivarů rostlin rodu *Narcissus*, které byly dodány firmou Lukon Glads. Cibule každého kultivaru byly po přijmutí zmrazeny a uchovávány v mrazícím boxu do doby zpracování.

4.4 Příprava sumárních extraktů

4.4.1 Extrakce cibulí narcisů pomocí ethanolu

Prvním krokem experimentální části bylo získání ethanolového extraktu z čerstvých cibulí sedmi kultivarů rodu *Narcissus*. Zmrazené cibule byly po vyjmutí z mrazícího boxu ponechány při laboratorní teplotě a po rozmrazení ihned zváženy a dále zpracovány. Nejprve byly cibule rozkrájeny nožem a poté rozmělněny mixérem na menší části, aby byly látky z cibulí lépe extrahovatelné. Rozsekané cibule byly v Erlenmeyerově baňce přelity ethanolom 96% (asi 1 l). Následně byl obsah baňky přiveden k varu pod zpětným chladičem na vařiči s vodní lázní. Tato extrakce probíhala třicet minut a po filtraci se cibule vařily ještě dvakrát. Po vychladnutí se filtrát odpařil na vakuové odparce Heidolph – Hei-VAP Advantage G1, při tlaku 1,33 kPa, s otáčkami mezi 80 a 90 za minutu a teplotě nepřevyšující 40-50 °C. Finální sumární extrakt byl odpařen do sucha, uchován v destilační baňce se zakrytým hrdlem pomocí hliníkové folie. V případě potřeby byl extrakt ještě dále dosušen v exsikátoru po dobu minimálně 24 hodin za vakua nad perlami silikagelu. Nakonec byly sumární extrakty zváženy a uchovány v lednici za teploty 2-8 °C, chráněny před světlem až do dalšího zpracování.



Obr. 23 - Zleva: čerstvé cibule, ethanolový extrakt před filtrací, přechištění extraktu
extrakcí kapalina – kapalina

4.5 Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Jednotlivé ethanolové extrakty byly rozpuštěny za pomoci ultrazvuku v 2% kyselině chlorovodíkové v množství dle potřeby k rozpuštění a přefiltrovány přes vlizelín do varné baňky. V této fázi vznikají ve vodě rozpustné soli alkaloidů. Kyselý filtrát (o pH 2-3) byl převeden z varné baňky do dělicí nálevky. Následovalo vytřepávání pomocí etheru (150 ml), kdy se extrakt zbavil neutrálních, lipofilních nečistot. Vytřepávání bylo provedeno celkem třikrát. Spojené vodné výtřepky byly vráceny do dělicí baňky a zalkalizovány pomocí 10% roztoku uhličitanu sodného na pH cca 10. V této fázi přešly alkaloidy zpět na bazické látky, které je možno vytřepat do organického rozpouštědla. Pro extrakci byl použit chloroform (200 ml). Extrakce opět byla provedena třikrát. Spojené chloroformové frakce byly následně vysušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány a odpařeny na vakuové odparce. Vodná fáze byla pro kontrolu přechodu alkaloidů monitorována pomocí Mayerova činidla, kdy v přítomnosti alkaloidů vzniká bílý zákal. Po odpaření rozpouštědla byl alkaloidní extrakt převeden do vialky a dosušen v exsikátoru za sníženého tlaku. Následně byl uzavřen zátkou a uchováván v lednici. Z každého alkaloidního sumárního extraktu byly připraveny vzorky pro analýzu pomocí plynového chromatografu s hmotnostním detektorem a rovněž pro stanovení inhibiční aktivity vůči humánní AChE a humánní BuChE.

Kód vzorku	Název kultivaru	Množství cibulí (g)	EtOH extrakt (g)	Alkaloidní extrakt (g)	Výtěžnost alkaloidů z cibulí (%)
AL - 718	<i>Narcissus</i> cv. Apotheose	319,4	22,7	0,3736	0,117
AL - 722	<i>Narcissus</i> cv. Chromacolor	343,2	23,2	1,0726	0,313
AL - 729	<i>Narcissus</i> cv. Hungarian Rhapsody	287,4	23,3	0,5099	0,177
AL - 736	<i>Narcissus</i> cv. Mon Cheri	258	22,2	0,3954	0,153
AL - 738	<i>Narcissus</i> cv. Peach Cobbler	330,4	19,5	0,6681	0,202
AL - 740	<i>Narcissus</i> cv. Pink Pride	335,7	27,3	0,5166	0,154
AL - 742	<i>Narcissus</i> cv. Red Devon	365,8	18,8	0,5341	0,146

Tabulka č. 2 – Přehled množství cibulí jednotlivých kultivarů použitých pro extrakci a přehled hmotností získaných extraktů včetně výtěžnosti

4.6 GC/MS analýza a identifikace jednotlivých alkaloidů

Odebrané vzorky z jednotlivých sumárních extraktů získaných z cibulí zástupců rodu *Narcissus* byly podrobeny analýze pomocí plynového chromatografu (Agilent Technologies 7890A) s ionizačním hmotnostním detektorem (Agilent Technologies 5975C), pracujícím při ionizační energii 70 eV. Separace probíhala za využití kolony HP-5MS, 30 m x 0,250 mm, při programu s teplotami: 100–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (5 °C/min), 300 °C (5 min). Helium bylo použito jako mobilní fáze s rychlostí průtoku 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C, přičemž byl použit 1 µl metanického roztoku analyzovaného vzorku o koncentraci 1 mg/ml, split 1:10. Rozsah měření hodnot byl od 40 do 600 m/z.

Získané jednotlivé chromatogramy byly porovnány s dostupnými spektry v komerční knihovně NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a také se spektry látek, které již byly dříve izolovány v laboratoři na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Jednotlivá spektra byla porovnána a díky tomu byly identifikovány jednotlivé alkaloidy. Pro přesnou identifikaci by ale bylo nutno látky izolovat.

4.7 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

4.7.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

4.7.1.1 Chemikálie

- Acetylthiocholin jodid p.a., (ATChI), (Sigma Aldrich s.r.o.)
- Butyrylthiocholin jodid p.a., (BuTChI), (Sigma Aldrich s.r.o.)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a., (KH_2PO_4), (Lach-Ner, Neratovice)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., (NaH_2PO_4), (ing. Švec – Penta, Praha)
- Dimethylsulfoxid p.a., (DMSO), (Sigma Aldrich, Německo)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$, (DTNB), (Sigma Aldrich, Praha)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p.a., (NaH_2PO_4), (ing. Švec – Penta, Praha)
- Galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)
- Huperzin A 95% (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- Eserin (Sigma Aldrich s.r.o.)

4.7.1.2 Činidla

- Roztok 5 mM DTNB
- Roztok 10 mM ATChI
- Roztok 10 mM BuTChI

4.7.1.3 Tlumivé roztoky (pufr)

- 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4)

4.7.1.4 Přístrojové vybavení a použité programy

- Reader SynergyTM HT Multi. Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- Třepačka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)

- Program pro vyhodnocení statistických dat GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.7.2 Rekombinantní enzymy

Enzymy použité pro změření biologické aktivity jednotlivých sumárních extraktů byly připravovány rekombinantní technologií na katedře chemie, přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100 mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak, aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08–0,15 a pro BuChE 0,15–0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby (dle vypočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření) do Eppendorf zkumavek. Následně je médium zamrazeno a uchováváno v mrazícím boxu při teplotě -22 °C do doby použití.

4.7.3 Stanovení inhibiční aktivity

4.7.3.1 Stanovení inhibiční aktivity enzymů

Ke stanovení vlastní inhibiční aktivity jednotlivých enzymů Ellmanovou spektrofotometrickou metodou bylo do 6 jamek mikrotitrační destičky napipetováno 8,3 μ l média a přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Vše bylo po dobu jedné minuty promícháváno na mikrotřepače a poté byla směs inkubována v komoře readeru Reader SynergyTM při teplotě 37 °C po dobu pěti minut. Po této inkubaci bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu. Jako substrát se využívají estery thiocholinu, konkrétně byl použit 10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI. Tyto substráty jsou štěpeny cholinesterasami na thiocholin a příslušnou kyselinu. Po uplynutí dvou minut byla při vlnové délce 412 nm proměřena absorbance výsledného produktu. Ke vzniku tohoto produktu dochází navázáním SH-skupiny z thiocholinu na DTNB. V průběhu analýzy byl sledován nárůst absorbance za jednu minutu. Výpočtem se spočítá rozdíl a stanoví se průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

4.7.3.2 Stanovení inhibiční aktivity extraktů

Stanovení inhibiční aktivity extraktů bylo provedeno téměř stejným způsobem jen místo čistého DMSO se přidává roztok vzorku v DMSO. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny extrakty měří při koncentraci 50 μ g/ml. U látek, které vykazovaly při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 60 %, byla dále stanovena hodnota IC₅₀. Pro měření IC₅₀ jsou vhodné koncentrace vybrané dle zjištěného screeningu. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami referenčních látek galanthaminem, huperzinem A a eserinem.

Do mikrotitrační destičky byly napipetovány stejné objemy činidel a roztoku substrátu jako u stanovení aktivity enzymů. Shodný je rovněž způsob měření. Jediným rozdílem je, že místo 8,3 µl DMSO se pipetuje roztok extraktu o příslušné koncentraci. Pro každou koncentraci bylo použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady byl pipetován DMSO (místo měřené látky), který slouží jako slepý vzorek.

4.7.3.3 Stanovení aktivity IC₅₀ u vybraných kultivarů

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla rovněž použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím DTNB. Pro měření IC₅₀ látky jsou dle zjištěného screeningu vybrány koncentrace, 500 – 50 – 5 – 0,5 – 0,05 µg/ml. Hodnoty IC₅₀ [µg/ml] jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Získané hodnoty inhibiční aktivity IC₅₀ humánní AChE a IC₅₀ humánní BuChE v µM byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteras galanthaminu, huperzinu A a eserinu jako referenčních látek.

Procenta inhibice (% I) jsou počítána dle uvedeného vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \right)$$

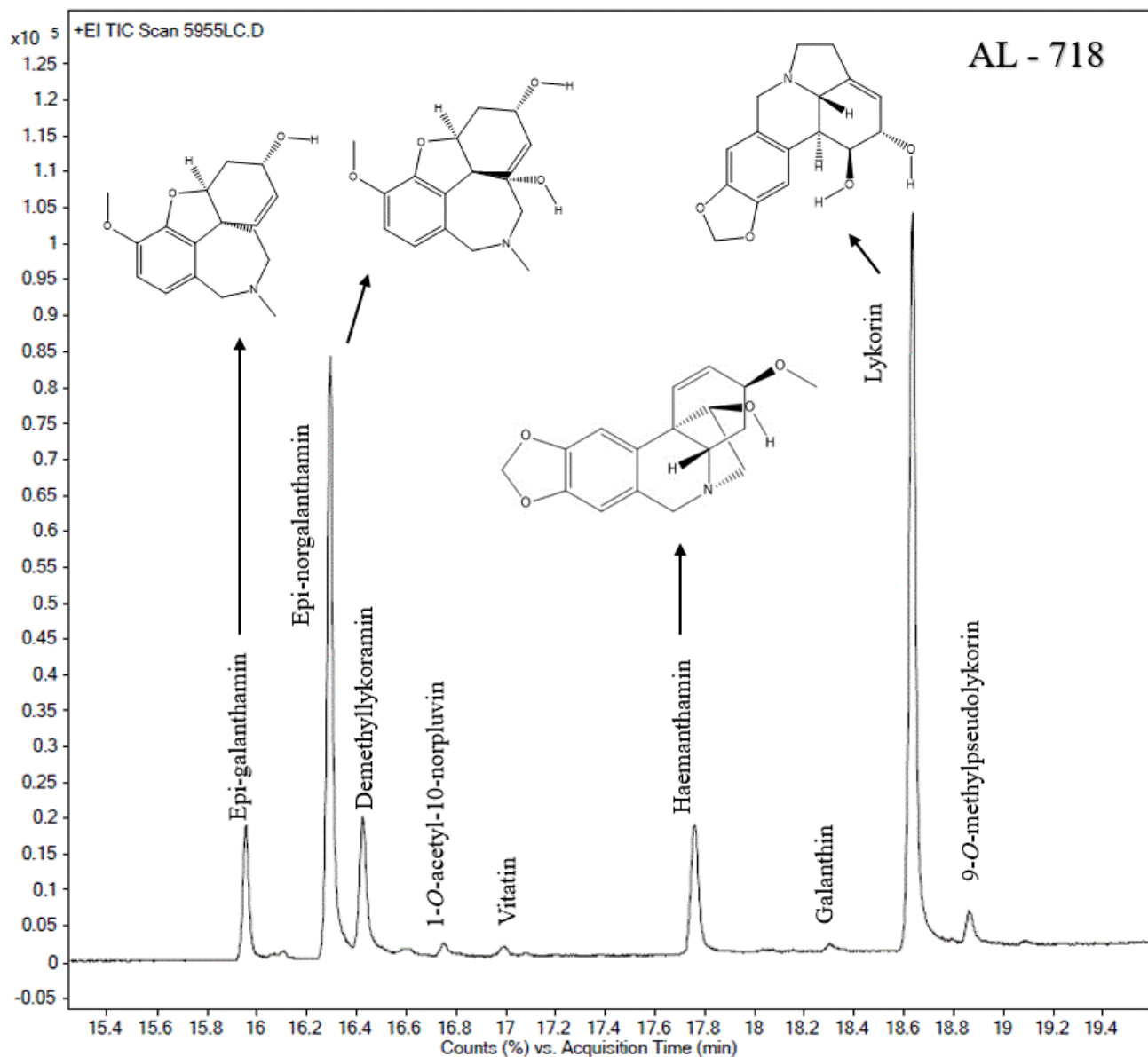
ΔABL – nárůst absorbance slepého vzorku během 1 minuty

ΔASA – nárůst absorbance měřeného vzorku během 1 minuty

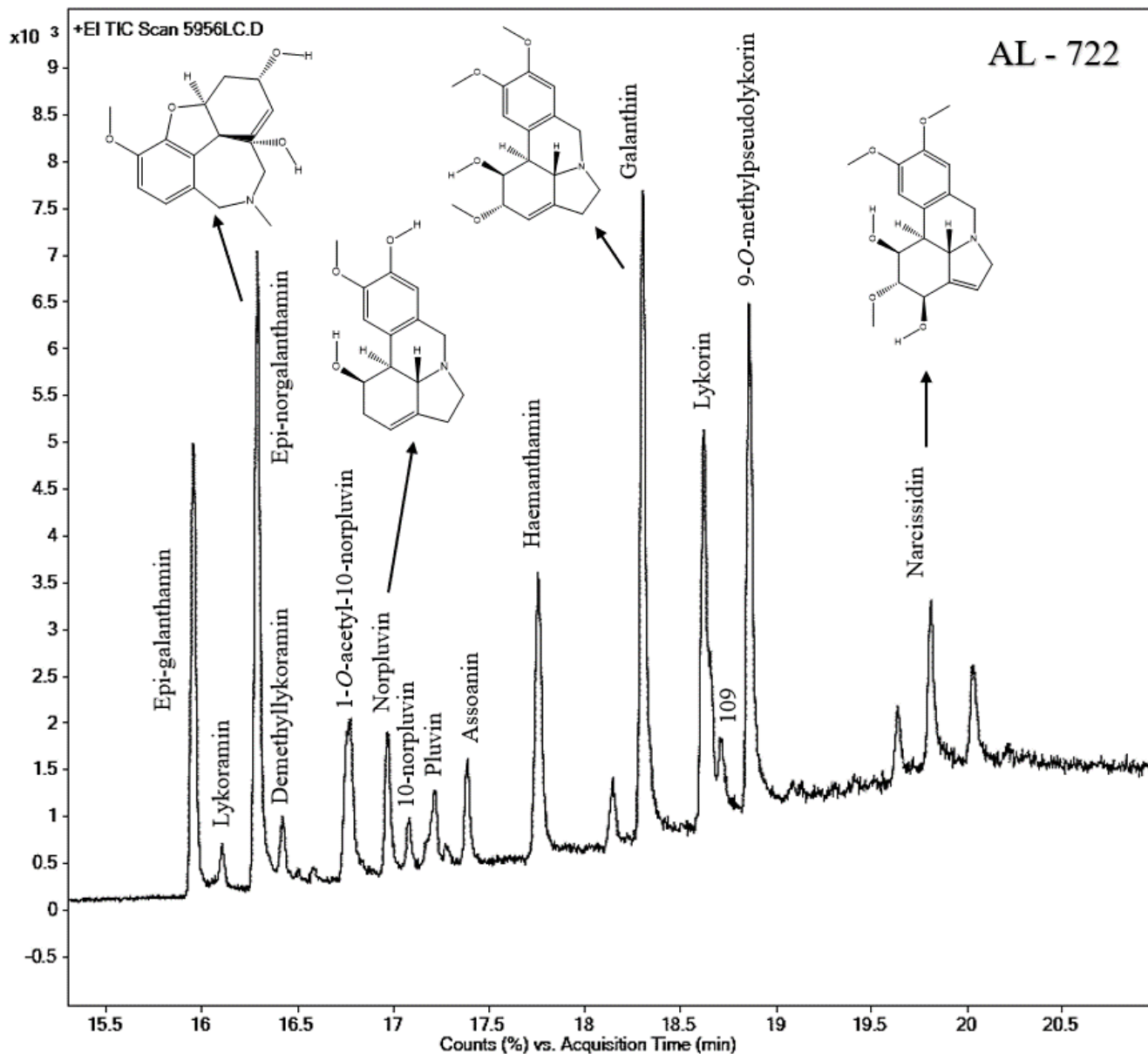
5 Výsledky

5.1 Přehled chromatogramů jednotlivých sumárních extraktů

V následující kapitole jsou uvedeny formou obrázků s popisky chromatogramy jednotlivých sumárních extraktů. Chromatogramy jsou řazené dle čísla sumárního extraktu.

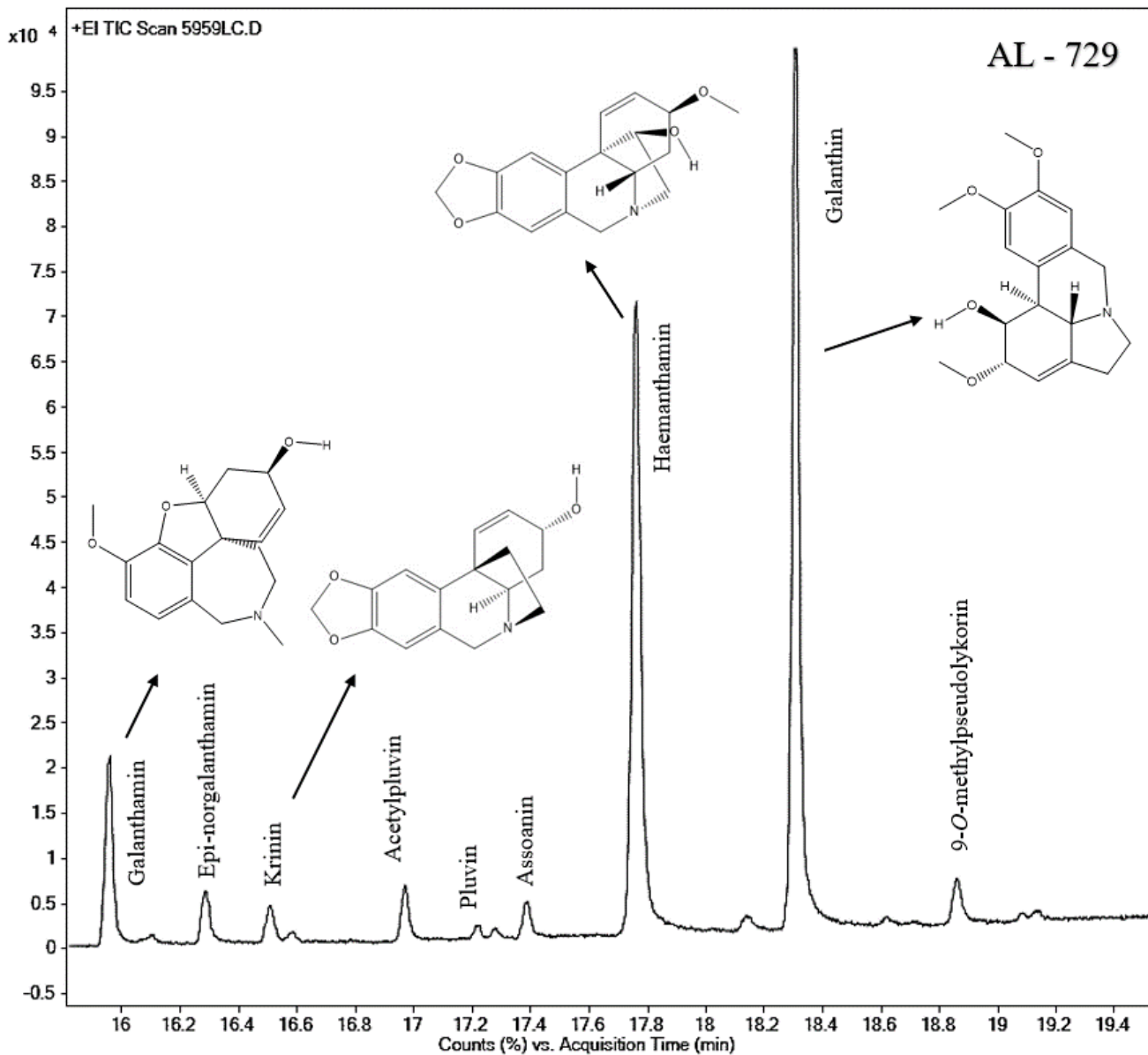


Obr. 24 – Chromatogram sumárního extraktu AL-718.

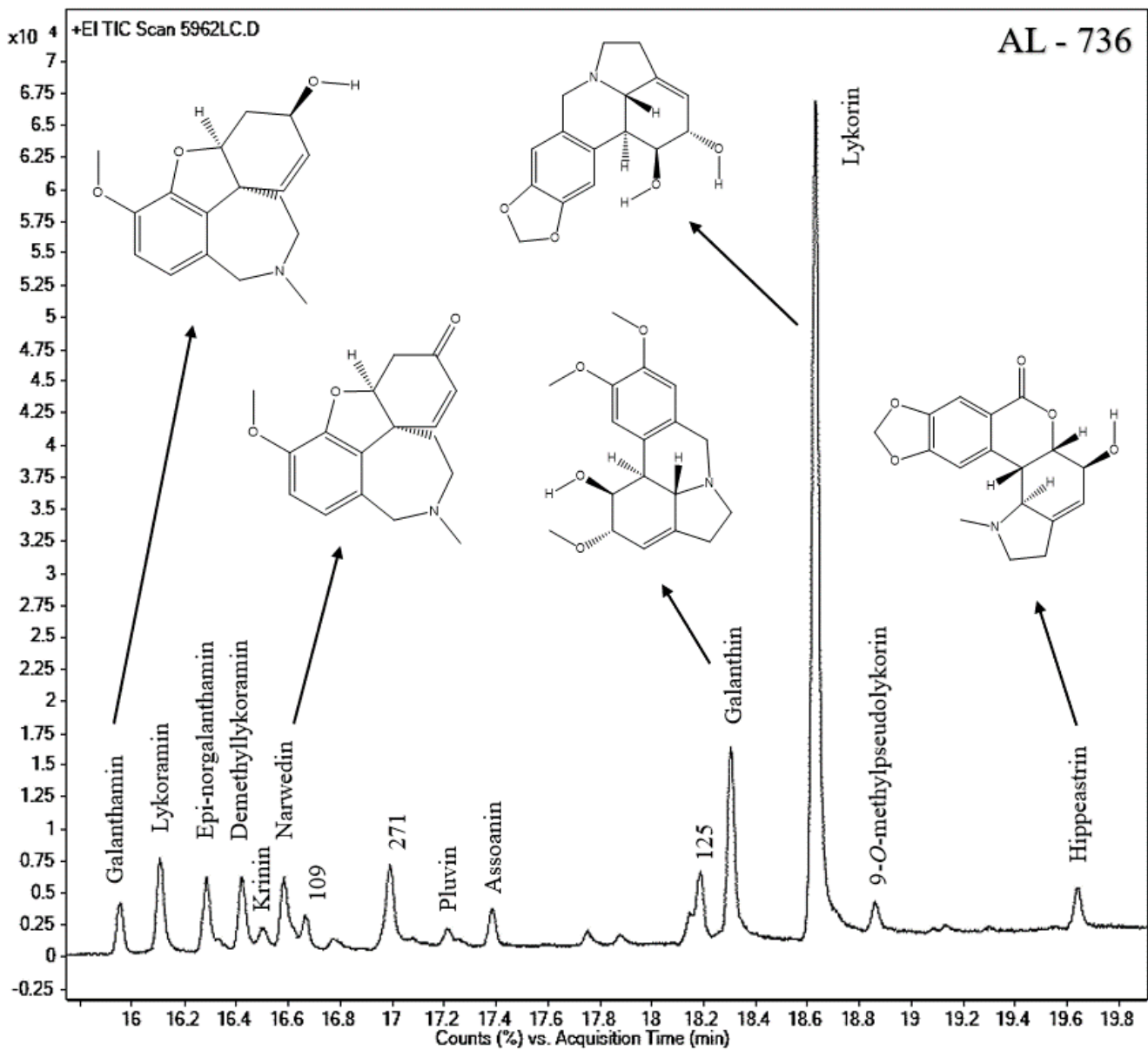


Obr. 25 – Chromatogram sumárního extraktu AL-722.

Čísla u některých píků označují m/z přítomných štěpů.

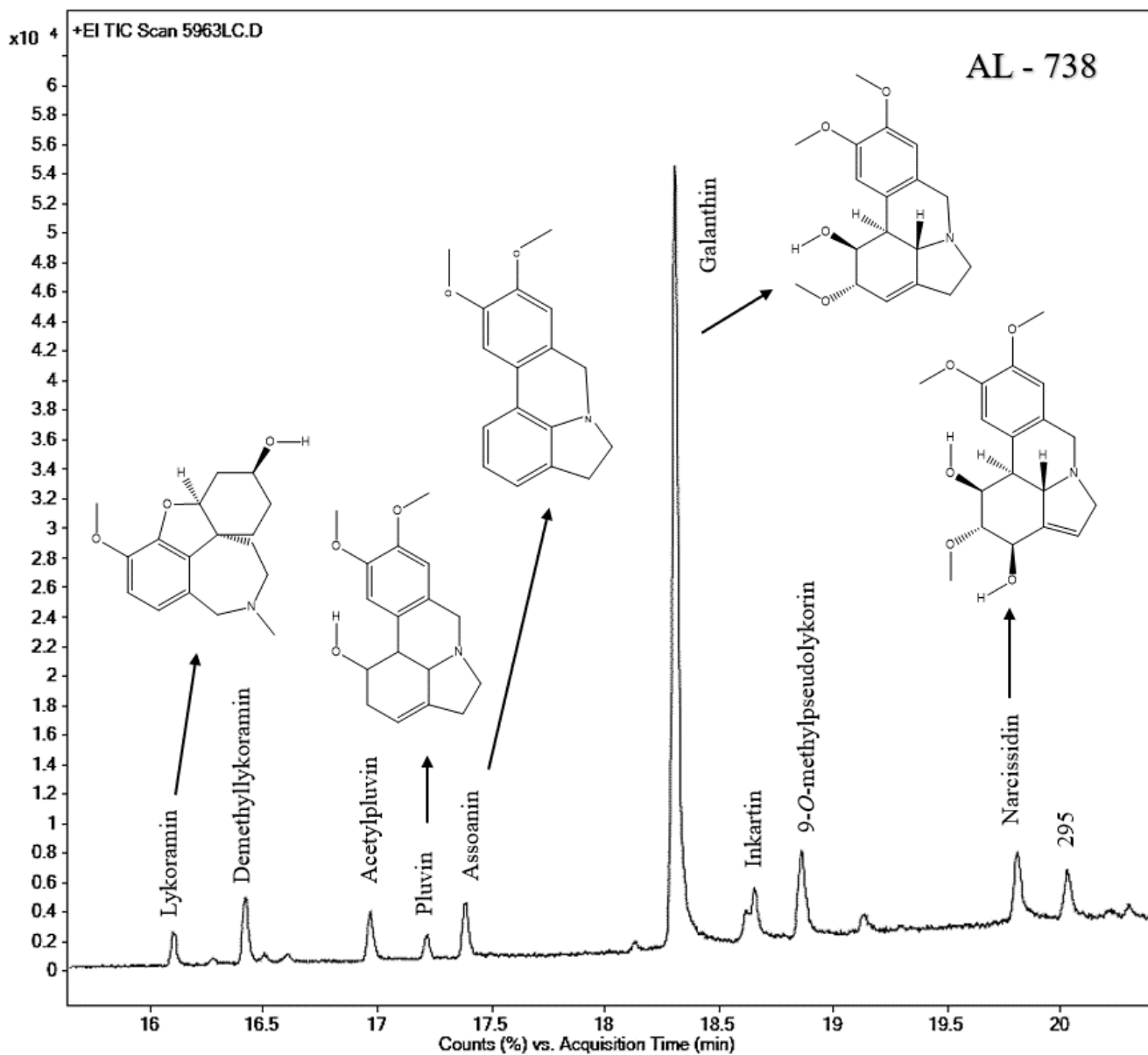


Obr. 26 – Chromatogram sumárního extraktu AL-729



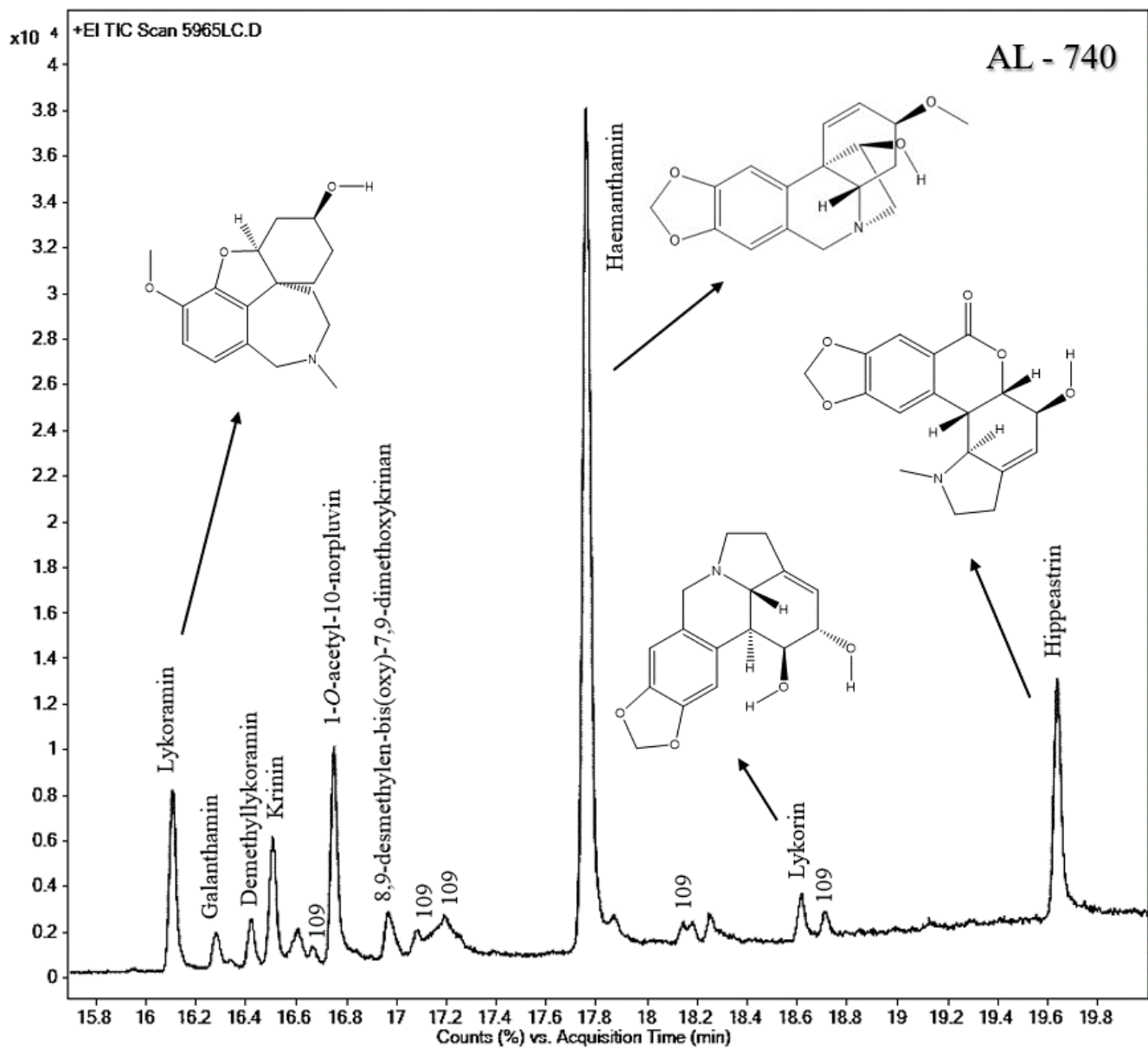
Obr. 27 – Chromatogram sumárního extraktu AL-736.

Čísla u některých píků označují m/z přítomných štěpů.



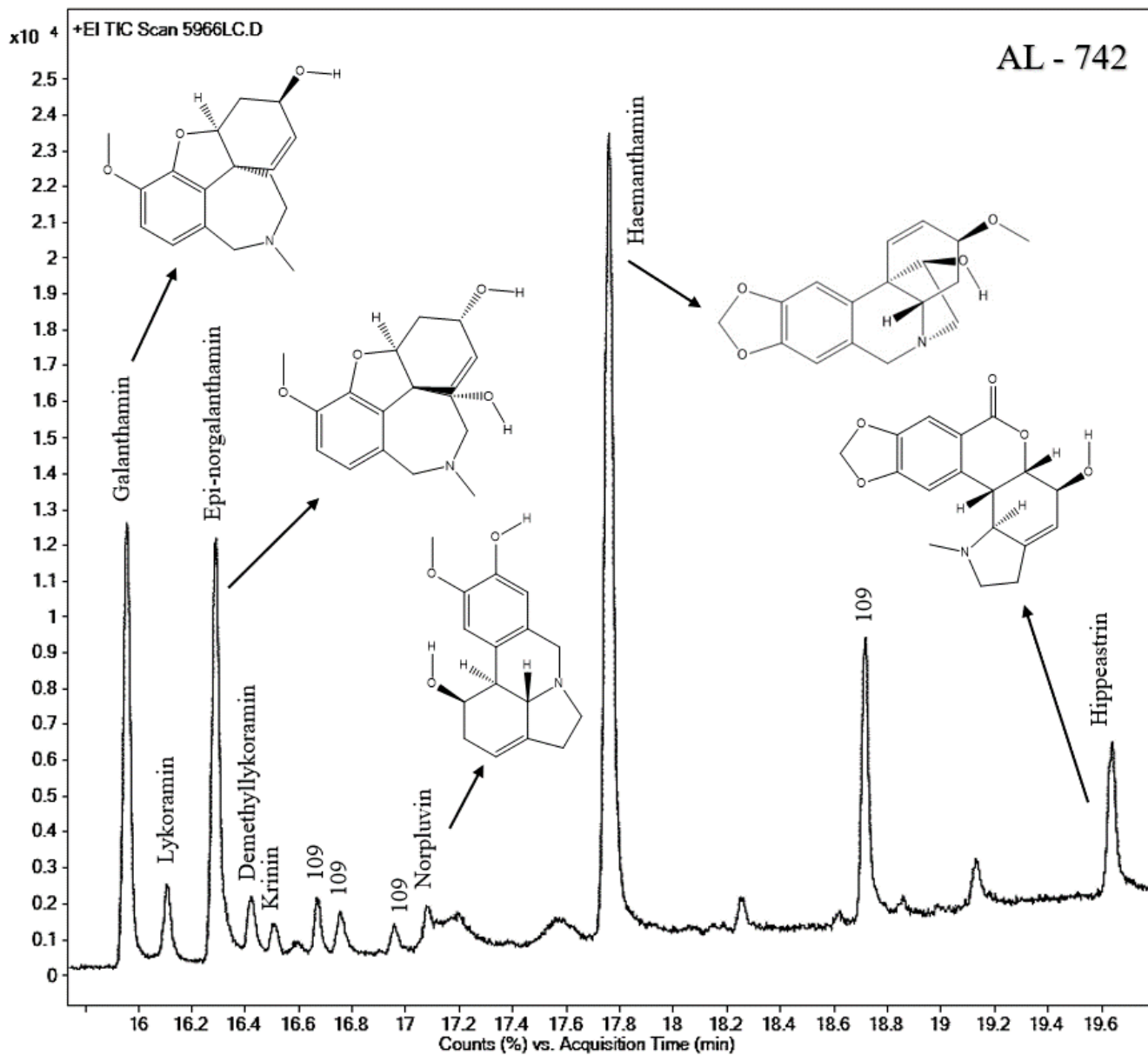
Obr. 28 – Chromatogram sumárního extraktu AL-738.

Číslo u některých píků označují m/z přítomných štěpů.



Obr. 29 – Chromatogram sumárního extraktu AL-740.

Čísla u některých píků označují m/z přítomných štěpů.



Obr. 30 – Chromatogram sumárního extraktu AL – 742.

Čísla u některých píků označují m/z přítomných štěpů.

5.2 Přehled obsažených alkaloidů v jednotlivých extraktech

V následující tabulce můžeme vidět v levém sloupci souhrn jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech kultivarů označených v jednotlivých sloupcích. Znaménko plus označuje přítomnost alkaloidu v sumárním extraktu kultivaru a znaménko mínus naopak nepřítomnost alkaloidu.

Obsažené alkaloidy	Jednotlivé kultivary						
	AL - 718	AL - 722	AL - 729	AL - 736	AL - 738	AL - 740	AL - 742
Acetylpluvín	-	-	+	-	+	-	-
1- <i>O</i> -Acetyl-10-Norpluvín	+	+	-	-	-	+	-
Assoanin	-	+	+	+	+	-	-
Demethyllykoramin	+	+	-	+	+	+	+
Epi-galanthamin	+	+	-	-	-	-	-
Epi-norgalanthamin	+	+	+	+	-	-	+
Galanthamin	-	-	+	+	-	+	+
Galanthin	+	+	+	+	+	-	-
Haemanthamin	+	+	+	-	-	+	+
Hippeastrin	-	-	-	+	-	+	+
Inkartin	-	-	-	-	+	-	-
Krinin	+	-	+	+	-	+	+
Lykoramin	-	+	-	+	-	+	+
Lykorin	+	+	-	+	-	+	-
Narcissidin	+	-	-	-	+	-	-
Narwedín	-	-	-	+	+	-	-
Norpluvín	-	+	-	-	-	-	+
Pluvín	-	+	+	+	+	-	-
8,9-desmethylenbis(oxy)-7,9-dimethoxykrinan	-	-	-	-	-	+	-
9- <i>O</i> -methylpseudolykorin	+	+	+	+	+	-	-
109	-	+	-	+	-	+	+
125	-	-	-	+	-	-	-
271	-	-	-	+	-	-	-
295	-	-	-	-	+	-	-

Tabulka č. 3 – Přehled přítomnosti jednotlivých alkaloidů v sumárních extraktech kultivarů rodu *Narcissus*

5.3 Inhibiční aktivita vůči humánní AChE a humánní BuChE

Číslo vzorku	AChE (% inhibice) při 50 μ M	IC ₅₀ AChE [μ g/ml]	BuChE (% inhibice) při 50 μ M	IC ₅₀ BuChE [μ g/ml]
AL-718	84,24 \pm 1,15	3,15 \pm 0,29	42,81 \pm 1,32	>20
AL-722	77,95 \pm 0,71	7,57 \pm 0,19	35,92 \pm 1,38	>20
AL-729	79,62 \pm 1,11	7,41 \pm 0,45	36,87 \pm 0,91	>20
AL-736	52,05 \pm 1,42	>20	43,56 \pm 0,80	>20
AL-738	0	>20	11,04 \pm 1,64	>20
AL-740	0	>20	59,63 \pm 0,98	>20
AL-742	81,46 \pm 0,88	5,39 \pm 0,36	49,43 \pm 1,39	>20
Galanthamin HBr	100	0,74 \pm 0,05	100	12,41 \pm 0,98
Eserin	100	0,06 \pm 0,00	100	0,08 \pm 0,03
Huperzin A	100	0,01 \pm 0,00	-	-

Tabulka č. 4 – Přehled hodnot naměřené inhibiční aktivity vůči cholinesterasám sumárních extraktů jednotlivých kultivarů rodu *Narcissus* včetně hodnot referenčních látek

6 Diskuze a závěr

V současné době představuje demence jednu z nejfrekventovanějších a nejobávanějších nemocí vyššího věku. Progresivní neurodegenerativní AD je její nejčastější příčinou. Touto chorobou trpí velmi významná část starší populace a postižených stále přibývá. To je dáno mimo jiné i zlepšující se medicínskou péčí, přičemž lidé nad 65 let s nejvyšším rizikem vzniku AD tvoří stále vyšší procento obyvatelstva. Ačkoliv je tato choroba neustále intenzivně studována vědeckou komunitou po celém světě, stále neznáme její přesné příčiny a patofyziologii. Navíc ani neexistuje lék, který by chorobu dokázal kauzálně léčit, existující léky dokáží pouze zpomalovat progresi a tím prodloužit život nemocným a oddálit tak těžký stupeň demence. Z tohoto důvodu je obrovská snaha nalézt zdroje nových potenciálních léčivých látek, případně nalézt nový ekonomicky významný přírodní zdroj současných léčivých látek. K těmto potenciálně nadějným látkám patří alkaloidy obsažené v čeledi Amaryllidaceae, které jsou neustále předmětem aktivního výzkumu. Bylo identifikováno a strukturně popsáno až 600 alkaloidů obsažených v rostlinách této čeledi s velmi cennou a rozmanitou biologickou aktivitou. Byly prokázány jejich antimikrobiální, antivirové, antifungální, analgetické, antimalarické a cytotoxické účinky a navíc z pohledu potenciální léčby AD nejvýznamnější inhibiční účinky vůči humánní AChE a BuChE.

Cílem této práce bylo získat sumární extrakty z čerstvých cibulí ze sedmi různých kultivarů rodu *Narcissus*. Těmito kultivary jsou Apotheose (AL-718), Chromacolor (AL-722), Hungarian Rhapsody (AL-729), Mon Cheri (AL-736), Peach Cobbler (AL-738), Pink Pride (AL-740) a Red Devon (AL-742). Obsah alkaloidů v cibulích jednotlivých kultivarů, jak je vidět v tabulce č. 2, se pohybuje v průměru 0,15–0,2 %. Ze sumárních extraktů byly následně připraveny vzorky, které byly podrobeny analýze pomocí plynového chromatografu s hmotnostním detektorem. Získaná spektra jednotlivých látek byla porovnána s literárními zdroji, což umožnilo identifikaci jednotlivých alkaloidů obsažených v jednotlivých kultivarech. Dále byly připraveny vzorky pro stanovení biologické aktivity těchto extraktů vůči humánní AChE a BuChE.

Alkaloidy byly identifikovány na základě porovnání hmotnostních spekter dostupných v komerční knihovně NIST a rovněž spekter dostupných v laboratoři na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Bylo identifikováno celkem 24 alkaloidů. Přehled jednotlivých alkaloidů můžeme nalézt v tabulce č. 4. Zde je uvedeno, které alkaloidy obsahují jednotlivé sumární extrakty. Byly identifikovány zejména alkaloidy lykorinového strukturního typu jako assoanin, galanthin, inkartin, lykorin, narcissidin, norpluvin, pluvin, acetylpluvin,

1-*O*-acetyl-10-norpluvín a 9-*O*-methylpseudolykorin. Dále byly identifikovány alkaloidy galanthaminového strukturního typu jako demethyllykoramin, epi-galanthamin, epi-norgalanthamin, galanthamin, lykoramin a narwedín. Mezi další identifikované alkaloidy patří hippeastrin (homolykorinový strukturní typ), haemanthamin (haemanthaminový strukturní typ) a krinin (krininový strukturní typ). Téměř všechny extrakty obsahovaly assoanin, demethyllykoramin, epi-norgalanthamin, galanthamin, galanthin, haemanthamin, krinin, lykorin a 9-*O*-methylpseudolykorin. Některé struktury jsou uvedeny v jednotlivých chromatogramech (obr. 24–30). Nalezeny byly rovněž látky, které obsahují štěpy s *m/z* 109 a 125 (homolykorinový strukturní typ) a látky se štěpem 271 a 295, což jsou blíže nespecifikované alkaloidy nebo možné nečistoty nealkaloidní povahy. Na základě GC/MS analýzy nebylo možné je blíže identifikovat.

Jednotlivé vzorky sumárních extraktů byly poté podrobeny screeningu pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody pro stanovení inhibičního účinku jednotlivých alkaloidních sumárních extraktů vůči humánní AChE a BuChE při koncentraci 50 µg/ml. Jednotlivé hodnoty můžeme vidět v tabulce č. 5. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazovaly kultivary AL-718, AL-722, AL-729 a AL-742. U těchto kultivarů byla inhibiční aktivita vyšší než 60% (červeně označené hodnoty, tabulka č. 4), a proto byla u nich dále stanovena hodnota IC₅₀. Jednotlivé inhibiční aktivity byly porovnány s referenčními látkami galanthaminem HBr, eserinem a huperzinem A (v µg/ml), přičemž na základě porovnání kultivary AL-718 (obr. č. 24) a AL-742 (obr. č. 30) vykazovaly nejslibnější inhibiční aktivitu vůči humánní AChE a jejich hodnoty IC₅₀ se nejvíce blížily referenčním hodnotám galanthaminu HBr. Tato významná aktivita pravděpodobně souvisí s významným zastoupením epi-norgalanthaminu, epi-galanthaminu a galanthaminu. Kultivary AL-738 a AL-740 oproti tomu nevykazovaly žádnou inhibiční aktivitu vůči humánní AChE, což zřejmě souvisí s nízkým nebo téměř žádným zastoupením obsahu galanthaminu a z něj odvozených látek v příslušných extraktech. V sumárním extraktu kultivaru AL-740 (obr. č. 29) byl identifikován zejména haemantamin a u kultivaru AL-738 (obr. č. 28) byl zastoupen zejména galanthin. Pro své cytotoxické účinky oba tyto alkaloidy nacházejí uplatnění spíše v terapii nádorů. Díky své struktuře jsou tyto látky také vhodnými kandidáty na přípravu polosyntetických derivátů, a proto by výše zmíněné kultivary mohly sloužit jako zdroj těchto látek. Žádný ze sedmi kultivarů nevykazoval významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE.

Na závěr je možné říci, že na základě výsledků získaných v rámci této diplomové práce se kultivary rodu *Narcissus* celkově jeví jako zajímavý zdroj AA vzhledem k obsahu celého

spektra těchto látek s rozmanitými chemickými strukturami i biologickými účinky. Mohou být využity k dalším studiím i jako zdroj alkaloidů.

7 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Karolína Komendová

Školitel: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Název diplomové práce: Screening biologické aktivity různých druhů rodu *Narcissus* sp. I

Klíčová slova: Amaryllidaceae, *Narcissus*, alkaloidy, AChE, BuChE, Alzheimerova choroba

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou dodnes jedny z nejvýznamnějších a nejlépe studovaných alkaloidů vůbec. Je tomu tak díky jejich strukturní rozmanitosti a širokému spektru biologických účinků. Hlavním cílem této práce bylo získat sumární extrakty alkaloidů z čerstvých cibulí sedmi různých kultivarů rodu *Narcissus* a najít kultivary s největším potenciálem inhibovat acetylcholinesterasu (AChE) či butyrylcholinesterasu (BuChE). Těchto účinků se hojně využívá právě v léčbě Alzheimerovy choroby. Sumární extrakty byly získány z následujících kultivarů: *N. cv.* Apotheose (AL – 718), *N. cv.* Chromacolor (AL – 722), *N. cv.* Hungarian Rhapsody (AL – 729), *N. cv.* Mon Cheri (AL – 736), *N. cv.* Peach Cobbler (AL – 738), *N. cv.* Pink Pride (AL – 740) a *N. cv.* Red Devon (AL – 742).

Získané sumární extrakty byly dále podrobeny GC/MS analýze. Analýza ukázala ve většině extraktů přítomnost následujících alkaloidů: galanthamin, galantin, haemanthamin, lykorin, lykoramin, krinin, narcissidin, hippeastrin a dalších. U každého extraktu byla stanovena také inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE Ellmanovou metodou za použití rekombinantních enzymů. Výsledné hodnoty byly porovnány s referenčními látkami galanthaminem, huperzinem A a eserinem.

Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AChE vykazovaly tyto kultivary: Apotheose (84,24 %), Chromacolor (77,95 %), Red Devon (81,46 %) a Hungarian Rhapsody (79,62 %). Vysoká aktivita kultivarů byla pravděpodobně dána vyšším obsahem galanthaminu, který je svou významnou inhibiční aktivitou vůči AChE znám, a proto je také užíván při léčbě Alzheimerovy choroby. U těchto kultivarů byly dále měřeny hodnoty IC_{50} . Nejvýznamnější aktivitu pro potenciální další využití vykazovaly kultivary Apotheose ($IC_{50} = 3,15 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) a Red Devon ($IC_{50} = 5,39 \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$). Naměřená inhibiční aktivita všech sumárních extraktů vůči BuChE byla zanedbatelná. Na základě získaných výsledků je možno kultivary rodu *Narcissus* považovat i do budoucna za zajímavý zdroj AA.

8 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany

Candidate: Karolína Komendová

Supervisor: PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.

Title of thesis: Screening of biological activity of various species of the genus *Narcissus* sp. I

Key words: Amaryllidaceae, *Narcissus*, alkaloids, AChE, BuChE, Alzheimer's disease

Alkaloids from family Amaryllidaceae (AA) nowadays belong to the most important and also the most examined alkaloids. This is because of their structural diversity and a broad spectrum of biological effects. The main aim of my diploma was to prepare whole bulb extracts from seven different cultivated varieties of genus *Narcissus* and to select those with the highest potential to inhibit enzyme acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). Inhibition of these enzymes is very important in the treatment of Alzheimer's disease (AD). Summary extracts were obtained from these cultivars: *N. cv.* Apotheose (AL – 718), *N. cv.* Chromacolor (AL – 722), *N. cv.* Hungarian Rhapsody (AL – 729), *N. cv.* Mon Cheri (AL – 736), *N. cv.* Peach Cobbler (AL – 738), *N. cv.* Pink Pride (AL – 740) a *N. cv.* Red Devon (AL – 742).

The isolated extracts were subsequently analyzed by GC-MS. The following alkaloids were found in the majority of extracts: galanthamine, galanthine, haemanthamine, lycorine, lycoramine, crinine, narcissidine and hippeastrine. Each extract was also examined for its inhibitory activity towards AChE and BuChE by using recombinant enzymes. The results were compared with activity of purified reference substances galanthamine, huperzine A and eserine.

The highest inhibitory activity towards AChE showed the extracts from these cultivars: Apotheose (84,24 %), Chromacolor (77,95 %), Red Devon (81,46 %) a Hungarian Rhapsody (79,62 %). Their high activity was probably related to the content of galanthamin that is known due to its significant inhibitory activity towards AChE and it is therefore used in treatments of AD. To better characterize the activity of promising extracts, their IC_{50} was further determined. The most promising extracts for future use were cultivars Apotheose ($IC_{50}=3,15 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) and Red Devon ($IC_{50} = 5,39 \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$). Measured inhibitory activity of all whole bulb extracts towards BuChE was insignificant. Based on the obtained results, cultivars of genus *Narcissus* remain an interesting source of Amaryllidaceae alkaloids for future.

9 Použitá literatura

1. Baloun, J., Jahodář L., Leifertová, I., Štípek, S.: *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha: Avicenum, 1989. ISBN 08-083-89.
2. Dohnal, F.: *Studijní texty k dějinám farmacie*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2618-5.
3. Horák, J., Linhart I., Klusoň P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-7080-548-x.
4. Spilková, J.: *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
5. <https://botany.cz/cs/amaryllidaceae/> (staženo 14. 11. 2021)
6. Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.
7. Novák, J.: *Jedovaté rostliny kolem nás*. Praha: Grada, 2007. Svět rostlin. ISBN 978-80-247-1549-0.
8. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/10-leucojum-vernum-bledule-jarni> (staženo 14. 11. 2021)
9. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/287-galanthus-nivalis-snezenka-podsneznik> (staženo 17. 11. 2021)
10. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/403-galanthus-elwesii-snezenka-elwesova> (staženo 17. 11. 2021)
11. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/379-clivia-miniata-klivie> (staženo 17. 11. 2021)
12. Collen, M., Elizabeth Bosede, A., Adebowale Emmanuel, A.: *Clivia miniata* (Lindl.) Bosse, (Amaryllidaceae): Botany, medicinal uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2021, 11, 12-18
13. Křesadlová, L., Hudec, P., Poková, H.: *Použití cibulnatých a hlíznatých rostlin v památkách zahradního umění*. Praha: Národní památkový ústav, 2019. Odborné a metodické publikace (Národní památkový ústav). ISBN 978-80-7480-143-3.
14. <https://www.sarahraven.com/articles/a-brief-history-of-daffodils> (staženo 5. 3. 2022)
15. Mathioli, P. O.: *Herbář neboli bylinář III. 1590*. repr. Olomouc: Dobra Fontána, 2000. ISBN 80 86179-49-4.

16. Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R.: Supercritical CO₂ Extraction of *Narcissus poeticus* L. Flowers for the Isolation of Volatile Fragrance Compounds. *Molecules*. 2022, 27, 353
17. Boshra, Y. R., Fahim, J.R., Hamed, A. N. E., Desoukey, S.Y.: Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): A review. *South African Journal of Botany*. 2022, 146, 437 - 458
18. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/308-narcissus-poeticus-narcis-bily> (staženo 17. 11. 2021)
19. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/307-narcissus-pseudonarcissus-narcis-zluty> (staženo 17. 11. 2021)
20. https://lukon-bulbs.eu/soubory/stranky_soubory/file-51-48.pdf (staženo 21. 11. 2021)
21. Graman, J., Čurn, V.: *Šlechtění rostlin: (obecná část)*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1997. ISBN 80-7040-255-5
22. <http://www.lukon-glads.cz/uploads/pdf/katalog-lukon-glads-podzim-2021.pdf> (staženo 21. 11. 2021)
23. <http://kgardens.org/N2.htm> (staženo 31.1.2022)
24. <https://daffseek.org/detail-age/?cultivar=Apotheose%23&pagenum1=1&which=hist1> (staženo 21. 11. 2021)
25. <https://www.dutchbulbs.co.uk/csp/parkers/products/large/0004137.jpg> (staženo 21. 11. 2021)
26. https://www.gardenersdream.co.uk/images/daffodil-apotheose-p2932-17028_medium.jpg (staženo 21. 11. 2021)
27. <https://www.whiteflowerfarm.com/129121-product.html> (staženo 21. 11. 2021)
28. <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Chromacolor> (staženo 21. 11. 2021)
29. <https://www.hollandbulbfarms.com/Shared/Images/Product/Hungarian-Rhapsody-Daffodil/82210-hungarian-rapsody-daffodil-2.jpg> (staženo 21. 11. 2021)
30. <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Hungarian%20Rhapsody&auto=1> (staženo 21. 11. 2021)
31. <https://daffseek.org/detail-age/?cultivar=Mon%20Cheri&pagenum1=1&which=hist1#> (staženo 21. 11. 2021)
32. <https://www.gardenexpress.com.au/wp-content/uploads/2019/12/daffodil-mon-cherie-pkdafmch.jpg> (staženo 21. 11. 2021)
33. <https://www.farmergracy.co.uk/products/narcissus-peach-cobbler-bulbs-uk> (staženo 21. 11. 2021)

34. <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Peach%20Cobbler&auto=1> (staženo 21. 11. 2021)
35. <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Pink%20Pride&pagenum1=1&which=hist1> (staženo 21. 11. 2021)
36. <https://www.longfield-gardens.com/plantname/Narcissus-Pink-Pride> (staženo 21. 11. 2021)
37. <https://daffseek.org/detail-page/?cultivar=Red%20Devon&auto=1> (staženo 21. 11. 2021)
38. <https://www.jparkers.co.uk/15-daffodil-red-devon> (staženo 21. 11. 2021)
39. Torras Claveria, L., Tallini, L. R., Viladomat Meya, F., Bastida Armengol, J.: Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII*. 2017, 5, 69-82
40. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L. a Cahlíková, L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*, 2013, 107, 701-708
41. Khalifa, M., Attia, E., Fahim, J., Kamel M.: An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2018, 1, 41-49
42. Berkov, S., Martínez-Francés, V., Bastida, J., Codina, C., Ríos, S.: Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014, 99, 95-106
43. Boshra, Y. R., Fahim, J. R., Hamed, A. N. E., Desoukey, S. Y.: Phytochemical and biological attributes of *Narcissus pseudonarcissus* L. (Amaryllidaceae): A review. *South African Journal of Botany*. 2022, 146, 437-458
44. Nair, J. J., Van Staden, J.: The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South African Journal of Botany*. 2021, 136, 157-174
45. Pellegrino, S., Meyer, M., Zorbas, Ch., et al.: The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure*. 2018, 26, 416-425.e4
46. Naidoo, D., Roy, A., Poštová Slavětínská, L., Chukwujekwu, J.C., Gupta, S., Van Staden, J.: New role for crinamine as a potent, safe and selective inhibitor of human monoamine oxidase B: In vitro and in silico pharmacology and modeling. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020, 248

47. Nair, J. J., Van Staden, J.: Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany*. 2021, 136, 147-156
48. Fürst, R.: Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica*. 2016, 82, 1389-1394
49. Mclachlan, A., Kekre, N., McNulty, J., Pandey, S.: Pancratistatin: A natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis*. 2005, 10, 619-630
50. Akram, M. N., Verpoorte, R., Pomahačová, B.: Effect of bulb age on alkaloid contents of *narcissus pseudonarcissus* bulbs. *South African Journal of Botany*. 2021, 136, 182-189
51. Kausar, S., Mustafa, H. G., Altaf, A. A., Mustafa, G., Badshah, A.: Galantamine. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2019, ISBN 9780128012383
52. Jiráček, R.: Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Česká a slovenská Psychiatrie*, 2015, 111, 127-132
53. López, A. F. F., Martínez, O. M. M., Hernández, H. F. C.: Evaluation of Amaryllidaceae alkaloids as inhibitors of human acetylcholinesterase by QSAR analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*. 2021, 1225
54. https://atlasses.muni.cz/atlasses/stud/atl_cz/main+cnspatol+degenecns.html (staženo 21. 12. 2021)
55. Pidrman, V. (2007). Demence - 1. část: diagnostika a diferenciální diagnostika. *Medicína pro praxi*, 2007, 2, 83-88
56. Geddes, J. R., Andreasen, N. C., Goodwin G. M., Koychev I., Gallacher J.: Alzheimer's disease. Koychev I., Gallacher J, Geddes, J. R, Andreasen, N. C., Goodwin G. M, ed.: *New Oxford Textbook of Psychiatry*. Oxford University Press, 2020, s. 395-404. ISBN 9780198713005.
57. Martin J., Kršková Z., Dušek J.: Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, 2011, 1, 39-41
58. Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, 4, 240-244
59. Atri, A.: The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Medical Clinics of North America*. 2019, 103, 263-293
60. Silbernagl, S., Lang, F.: *Atlas patofyziologie*. 2. české vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3555-9.

61. Tiwari, S., Atluri V., Kaushik, A., Yndart, A., Nair, M.: Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*. 2019, 14, 5541-5554
62. Marei, E. H., Althani, H. A., Suhonen, J., El Zowalaty, M. E., Albanna, M. A., Cenciarelli, C., Wang, T., Caceci, T.: Recent Perspective About the Amyloid Cascade Hypothesis and Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Alzheimer's Disease. Atta-Ur-Rahman, ed.: *Frontiers in Clinical Drug Research – Alzheimer Disorders*. Bentham Science Publishers, 2016, s. 144-174. ISBN 9781681082318.
63. https://www.physio-pedia.com/images/c/cc/Alzheimers_brain.jpg (staženo 28. 12. 2021)
64. Hroudová, J.: Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*. 2017, 1, 7-10
65. Ka, S., Koirala, M., Mérindol, N., Desgagné-Penix, I.: Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*, 2020, 25, 4901.
66. Vlček, J., Fialová D., Vytríšalová M.: *Klinická farmacie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3169-8.
67. Suchopár, J., Valentová, Š., ed.: *Compendium: léčiva používaná v podmínkách ČR*. Páté vydání. Praha: Panax, 2018. ISBN 978-80-902806-7-0.
68. Petrovič, M., Sedláček, M., Horák M., Vyklický, L.: Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004, 2, 81-89
69. Franková, V.: Demence u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi*. 2017, 1, 30-33
70. Vaz, M., Silvestre, S.: Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*. 2020, 887
71. <https://alzheimersnewstoday.com/abvac40/> (staženo 14. 4. 2022)
72. Athar, T., Al Balushi, K., Khan, S. A.: Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*. 2021, 48, 5629-5645
73. Jiráček, R., Manukyan A.: Hledání farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská psychiatrie*. 2017, 3, 79-83