

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Izolace alkaloidů z *Hippeastrum* cv. Ferrari a jejich biologická aktivita**

**Isolation of alkaloids from *Hippeastrum* cv. Ferrari and their  
biological activity**

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

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

Hradec Králové, květen 2022

Tereza Buchalová

## PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, květen 2022



.....

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velmi poděkovat především mé školitelce PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, pomoc v laboratoři a velkou trpělivost, kterou se mnou měla po celou dobu vypracování diplomové práce. Mé velké díky patří také panu doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Janě Křoustkové, PhD. za identifikaci látek a interpretaci NMR spekter. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat ostatním pracovníkům Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí, rady při práci v laboratoři a ochotu pomoci.

Velké díky patří také mé rodině, která mi poskytla zázemí a podporovala mě během celého studia.

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

# OBSAH

<b>1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	7
<b>2. ÚVOD</b> .....	8
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	10
<b>4. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	11
<b>4.1. Charakteristika čeledi Amaryllidaceae</b> .....	11
<b>4.2. Charakteristika rodu <i>Hippeastrum</i></b> .....	11
<b>4.3. Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae</b> .....	13
<b>4.4. Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů</b> .....	17
4.4.1. Cytotoxická aktivita.....	17
4.4.2. Antivirová aktivita.....	18
4.4.3. Antimalarická aktivita.....	19
4.4.4. Antibakteriální aktivita .....	20
4.4.5. Inhibice enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy.....	20
<b>4.5. Demence</b> .....	22
4.5.1. Epidemiologie.....	23
4.5.2. Typy demencí .....	23
<b>4.6. Alzheimerova choroba</b> .....	24
4.6.1. Etiopatogeneze .....	24
4.6.2. Symptomy Alzheimerovy choroby.....	26
4.6.3. Epidemiologie.....	28
4.6.4. Diagnostika.....	29
4.6.5. Léčba Alzheimerovy choroby .....	31
4.6.5.1. Inhibitory cholinesteras .....	31
4.6.5.2. Antagonisté NMDA receptorů .....	34
4.6.5.3. Novinky v terapii Alzheimerovy nemoci .....	35
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	37
<b>5.1. Potřebný materiál a pomůcky</b> .....	37
5.1.1. Rozpouštědla.....	37
5.1.2. Detekční činidla .....	37

5.1.3.	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografií .....	37
5.1.4.	Chromatografické absorbenty .....	38
5.1.5.	Přístroje .....	38
<b>5.2.</b>	<b>Všeobecné postupy .....</b>	<b>39</b>
5.2.1.	Destilace rozpouštědel .....	39
5.2.2.	Extrakce .....	39
5.2.3.	Sloupcová chromatografie .....	39
5.2.4.	Tenkovrstvá chromatografie .....	39
5.1.5.	Odpařování rozpouštědel .....	39
5.1.6.	Detekce alkaloidů .....	40
<b>5.3.</b>	<b>Izolace .....</b>	<b>40</b>
5.3.1.	Biologický materiál pro izolaci .....	40
5.3.2.	Extrakce drogy a zpracování získaného extraktu .....	40
5.3.3.	Sloupcová chromatografie extraktu .....	40
5.3.4.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14 .....	42
5.3.4.1.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/1 .....	44
5.3.4.2.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/2 .....	45
5.3.4.3.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/3 .....	46
5.3.4.4.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/4 .....	50
5.3.4.5.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/5 .....	51
5.3.4.6.	Izolace alkaloidů z frakce HF-14/6 .....	51
<b>5.4.</b>	<b>Identifikace získaných látek .....</b>	<b>52</b>
5.4.1.	GC/MS analýza .....	52
5.4.2.	Porovnávání alkaloidů za využití analytické TLC .....	52
5.4.3.	Nukleární magnetická rezonance (NMR) .....	53
5.4.4.	Optická otáčivost .....	53
<b>5.5.</b>	<b>Testování biologické aktivity .....</b>	<b>53</b>
5.5.1.	Pufry .....	53
5.5.2.	Chemikálie .....	53
5.5.3.	Materiál .....	54
5.5.4.	Přístroje .....	54
5.5.5.	Stanovení <i>in vitro</i> inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám .....	54

5.5.6.	Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase (POP) <i>in vitro</i> .....	55
5.5.7.	Stanovení cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	55
5.5.8.	Stanovení aktivity vůči plazmodiím <i>in vitro</i> .....	56
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>57</b>
<b>6.1.</b>	<b>Strukturní analýza izolovaných látek</b> .....	<b>57</b>
6.1.1.	HF/14/1: Tazetin .....	57
6.1.2.	HF/14/2: 11-hydroxyvitatin .....	58
6.1.3.	HF/14/3/A: Hamayn .....	59
6.1.4.	HF/14/3/C: 9- <i>O</i> -demetyl-7- <i>O</i> -etyllykorenin .....	61
6.1.5.	HF/14/4/1: 9- <i>O</i> -demetylhomolykorin .....	62
6.1.6.	HF/14/4/3: Eugenin .....	63
<b>6.2.</b>	<b>Biologická aktivita izolovaných látek</b> .....	<b>64</b>
6.2.1.	Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k AD .....	64
6.2.2.	Cytotoxická aktivita vybraných izolovaných alkaloidů .....	65
6.2.3.	Antimalarická aktivita izolovaných alkaloidů .....	66
<b>7.</b>	<b>DISKUZE A ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>73</b>

## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AchE	Acetylcholinesterasa
BchE	Butyrylcholinesterasa
Ach	Acetylcholin
N4OMT	Norbelladin 4'- <i>O</i> -methyltransferasa
AD	Alzheimerova choroba
APP	Amyloidový prekurzorový protein
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy
MCI	Mírné kognitivní poruchy
CT	Výpočetní tomografie
MRI	Magnetická rezonance
MMSE	Mini mental state examination
CNS	Centrální nervová soustava
AchEI	Inhibitory acetlycholinesterasy
BACE I	Inhibitory $\beta$ -sekretas
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
MF	Mobilní fáze
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
NMR	Nukleární magnetická rezonance
POP	Prolyl oligopeptidasa

## 2. ÚVOD

Již od dávných dob využívali lidé rostliny nejen jako zdroj potravy, ale i v tradiční medicíně, kdy přírodní produkty hrály značnou roli jak v prevenci, tak léčbě nemocí. Dříve léčení probíhalo především na základě empirie, kdy pomocí šťastných náhod a tragických pochybení lidé postupně vypozerovali léčebné účinky jednotlivých rostlin. Rostliny byly používány v surovém stavu, ale i zpracované ve formě odvarů, výluhů, mastí a obkladů, avšak pravá podstata účinku byla lidem neznámá. Teprve na přelomu 18. a 19. století, díky rychlému rozvoji chemických, biologických a lékařských věd, se vědci zaměřili na to, proč jednotlivé rostliny působí tak, jak působí a začali hledat jejich účinné látky. Dnes jsme díky moderním technologiím schopni rostlinný materiál zpracovat, izolovat obsahové látky v čistém stavu, zjistit jejich biologické aktivity a vhodně tyto látky využít v terapii.

Většina biologicky aktivních látek přírodního původu patří do skupiny sekundárních metabolitů, které tvoří velmi širokou škálu různorodých struktur oplývající unikátním spektrem účinků. Jednou z nejvýznamnějších skupin sekundárních metabolitů jsou bezesporu alkaloidy, látky bazické povahy, které ve své molekule obsahují alespoň jeden atom dusíku vázaný v heterocyklickém kruhu. Biosyntéza většiny alkaloidů vychází ze sedmi aminokyselin považovaných za výchozí látky – argininu, histidinu, kyseliny anthranilové a nikotinové, lysinu, ornithinu, tryptofanu a tyrosinu. Látky alkaloidní struktury se vyskytují především ve vyšších rostlinách, ale byly detekovány také v houbách, přesličkách, plavuních a vzácně u živočichů. Mezi nejvýznamnější čeledi obsahující alkaloidy patří například Berberidaceae, Papaveraceae, Solanaceae a čeleď Amaryllidaceae, která obsahuje charakteristickou skupinu alkaloidů s názvem Amaryllidaceae alkaloidy (AA).<sup>1,2</sup>

AA jsou řazeny do skupiny isochinolinových alkaloidů, jejichž syntéza vychází z aminokyseliny tyrosinu.<sup>3</sup> Jsou známé především kvůli svým významným biologickým účinkům, mezi které patří cytotoxická, antivirová, antimalarická, antibakteriální, antimykotická, analgetická a inhibiční aktivita vůči enzymům acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Nejznámějším a zároveň terapeuticky nejvýznamnějším zástupcem je bezpochyby galantamin, který má jako inhibitor mozkové acetylcholinesterasy nenahraditelné místo v terapii Alzheimerovy choroby (AD).<sup>5</sup>

AD je závažné neurodegenerativní onemocnění, kdy buněčné poškození způsobuje dysfunkci komunikace mezi neurony v mozku. To vede ke změnám v myšlení, emocích, paměti a dalších v závislosti na konkrétním místě poškození. Nejčastějším projevem AD je syndrom



demence, přičemž v této době se jedná o nejčastější příčinu demence vůbec. Vzhledem k tomu, že doposud není zcela odhalena etiopatogeneze AD, tak neexistuje ani účinná léčba, která by onemocnění kompletně vyléčila. Nynější postupy mají za cíl pouze zpomalit progresi a zlepšit kvalitu života pacienta, a proto je důležité hledat nové látky, které by v budoucnu byly využitelné v terapii.

Hlavním cílem této diplomové práce je izolace alkaloidů z extraktu rostliny *Hippeastrum* cv. Ferrari za účelem následné identifikace izolovaných látek a stanovení jejich biologických aktivit.

### 3. CÍL PRÁCE

- 1) Izolace alkaloidů z podfrakce HF-14, získané ze sumárního extraktu rostliny *Hippeastrum* cv. Ferrari.
- 2) Získání alespoň 3 látek alkaloidní povahy v čistém stavu.
- 3) Strukturní identifikace získaných alkaloidů pomocí fyzikálně chemických metod (NMR, GC/MS analýzy, optická otáčivost, porovnávání výsledků s literaturou).
- 4) Podílení se na stanovení biologických aktivit alkaloidů získaných v dostatečném množství.
- 5) Zpracování rešerše na dané téma.
- 6) Zpracování a vyhodnocení získaných výsledků a sepsání diplomové práce.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1. Charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Čeď Amaryllidaceae, česky amarylkovité, představuje skupinu jednoděložných víceletých rostlin, která zahrnuje přes 850 druhů klasifikovaných do více než 65 rodů rozšířených typicky v tropických a subtropických oblastech celého světa.<sup>1</sup> Někteří zástupci, například v podobě sněženek (*Galanthus*), narcisů (*Narcissus*) a bledulí (*Leucojum*), se také volně vyskytují i na území České republiky.<sup>2</sup>

Čeď zahrnuje vytrvalé, především suchozemské byliny s podzemními cibulemi, méně častěji hlízkami nebo cibulemi. Listy jsou podlouhlé, čárkovité až kopinaté, s celokrajnou čepelí, uspořádané střídavě podél stonku nebo pouze přízemní. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem, jednotlivé nebo ve šroubelovitých a hroznovitých květenstvích. Okvěť je vyvinuto a zpravidla se objevuje 6 okvětních lístků (3+3) ve dvou přeslenech, okvětní lístky mohou být jak volné, tak srostlé, které pak vytvářejí korunní trubku. Květy většinou obsahují 6 volných tyčinek ve dvou přeslenech, které mohou ale i srůst s korunní trubkou. Plodem je nejčastěji bobule nebo tobolka.<sup>1,3</sup>

Rostlinám z této čeledi se v posledních letech dostává velké pozornosti nejen kvůli nádherným barevným květům, ale především kvůli obsahu biologicky aktivních alkaloidů unikátních chemických struktur, které mohou být izolovány z většiny rodů této čeledi. Léčivé účinky Amaryllidaceae alkaloidů byly lidem známy již ve starověku, kdy je Hippokratés z Kóu využíval k léčbě nádorů.<sup>4</sup> Od této doby, díky vysoké pozornosti vědců a lékařů, dosáhl výzkum AA značných úspěchů. Do současnosti bylo izolováno téměř 600 strukturně odlišných alkaloidů, které se vyznačují cytotoxickými, antibakteriálními, antivirotickými, antiprotozoálními, antifungálními, a především inhibičními účinky vůči enzymům zvaným cholinesterasy.<sup>5,6</sup> Nejznámějším a zároveň terapeuticky nejvýznamnějším alkaloidem je bezpochyby galantamin, který byl poprvé izolován z některých druhů sněženek. V této době se získává z narcisů, především z kultivarů Carlton, Fortune, Galilee, Ice Follies a Ziva<sup>7</sup> a jako inhibitor mozkové acetylcholinesterasy (AChE) má nenahraditelné místo v terapii Alzheimerovy choroby.<sup>8</sup>

### 4.2. Charakteristika rodu *Hippeastrum*

*Hippeastrum* neboli hvězdník je rod zahrnující zhruba kolem 90 jednoděložných botanických druhů rostlin, které se přirozeně vyskytují hlavně na území tropické a subtropické

Ameriky. Rod původně pochází z Mexika a později se rozšířil na území Argentiny, většiny východní Brazílie, Peru a Bolívie.<sup>9</sup> Taxonomické zařazení rodu uvádí Tabulka 1.

<b>Tabulka 1: Taxonomické zařazení rodu <i>Hippeastrum</i><sup>10</sup></b>		
	<b>Latinský název</b>	<b>Český název</b>
<b>Třída</b>	Liliopsida	Jednoděložné rostliny
<b>Řád</b>	Asparagales	Chřestotvaré
<b>Čeleď</b>	Amaryllidaceae	Amarylkovité
<b>Podčeleď</b>	Amaryllidoideae	Amarylkové
<b>Rod</b>	<i>Hippeastrum</i>	Hvězdník

Hvězdníky jsou vytrvalé cibulovité rostliny, charakteristické masivní cibulí o velikosti v průměru až 13 cm, ze které vyrůstá několik až 80 centimetrů dlouhých bezřapíkatých listů mečovitého tvaru. Rostliny tohoto rodu jsou známé především pro jejich barevné květy, které se tyčí na jednom či dvou dutých dlouhých stvolech. Květenství tvoří zpravidla 2–10 květů nálevkovitě zvonkovitého tvaru uspořádaných do okolíku. V květech se obvykle nachází 6 tyčinek tvořených nitkami a prašníkem, který obsahuje pylová zrna. U tyčinek se objevuje pestík skládající se z čnělky, blizny a semeníku se samičími pohlavními buňkami. Plodem je tobolka kulovitého nebo laločnatého tvaru, uvnitř které se nachází několik hnědých až černých semen. Semena jsou suchá, nejčastěji zploštělá, šikmo křídlatá nebo nepravidelně diskovitá. V některých případech mohou být nafouklá s kulovitým nebo subkulovitým tvarem.<sup>9</sup> Pro květy je také typická jejich výrazná barva, rod zahrnuje druhy s červenými, fialovými, žlutými, bílými, modro-červenými i jinak zbarvenými květy.<sup>9,11</sup> Právě kvůli využití květů ve floristice je velká snaha o hybridizaci rostlin rodu *Hippeastrum*, v tuto dobu existuje více než 2000 odrůd.<sup>12</sup> Jednou z nich je i *Hippeastrum* cv. Ferrari, která nepoutá pozornost pouze kvůli svým krásným červeným květům (Obrázek 1), ale i z hlediska výzkumu obsahových látek, a byla proto v této diplomové práci použita jako výchozí rostlina k izolaci AA.<sup>13</sup>

Rostliny tohoto rodu mají využití i v tradiční medicíně, kdy například kmen Toba, domorodá komunita sídlící na území Jižní Ameriky, používal rostliny především k léčbě kožních defektů, jako jsou bradavice, pupínky nebo pigmentové poruchy, a dále k terapii nádorů, hemoroidů a různých zánětlivých onemocnění.<sup>13</sup> V 50. letech 20. století se vědci začali zabývat fytochemickými studii rodu a zjistili, že rostliny obsahují velké množství AA. Prvními alkaloidy, izolovanými z cibule *Hippeastrum vittatum*, byly tazettin, lykorin

a hemanthamin. Právě lykorin a hemanthamin vykazují významnou *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti několika různým typům rakovinných buněčných linií. Lykorin navíc vykazuje antivirové, protizánětlivé, antifungální a antiprotozoální účinky.<sup>14</sup>

**Obrázek 1** – Květ *Hippeastrum* cv. Ferrari<sup>15</sup>



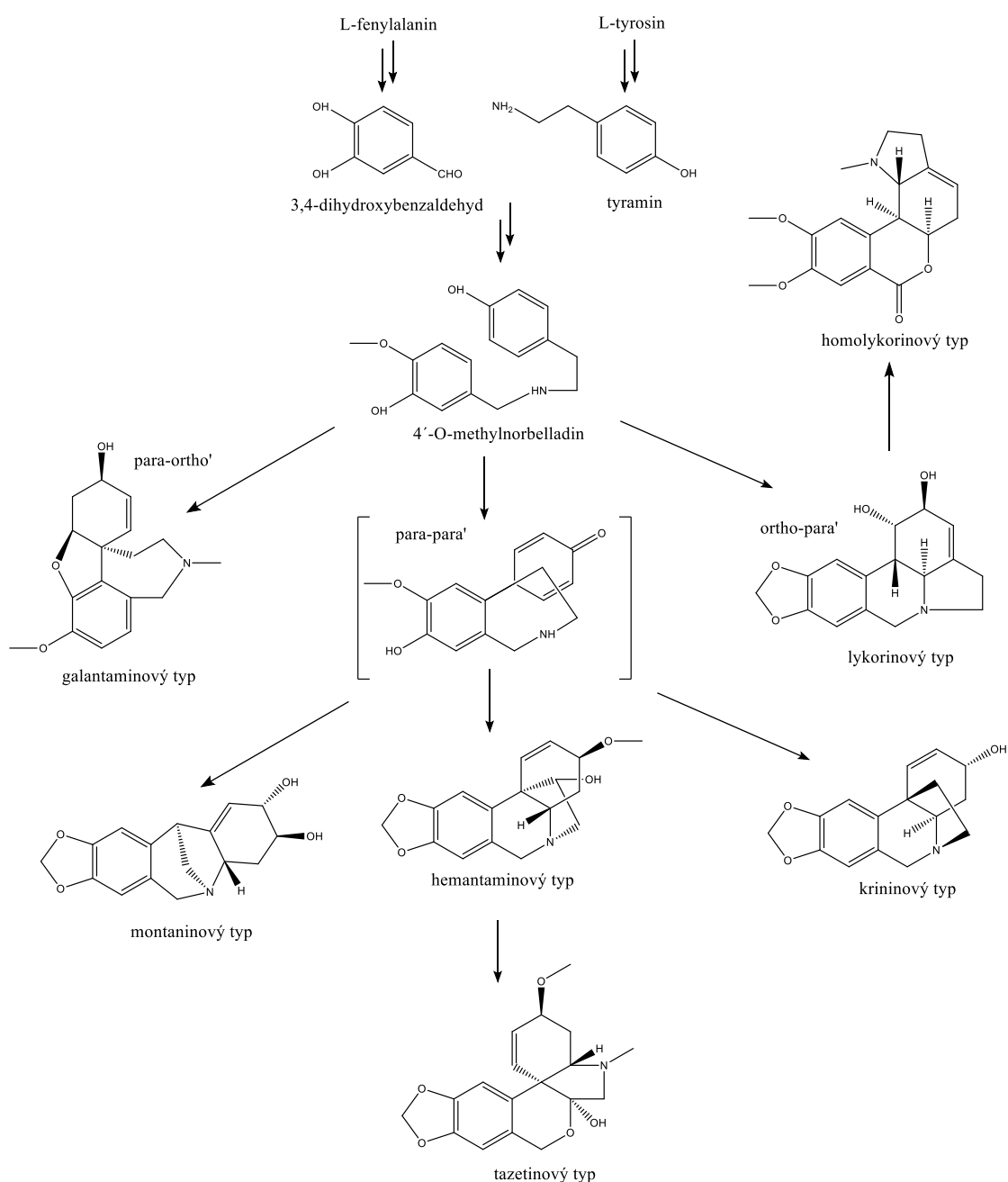
### 4.3. Biosyntéza alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy jsou obsáhlou a rozmanitou skupinou sekundárních rostlinných metabolitů, které se vyskytují zhruba u 20 % všech druhů rostlin. Celkem je známo přes 20 000 strukturně odlišných alkaloidů.<sup>16</sup> AA patří do velké skupiny biologicky aktivních dusíkatých látek isochinolinové struktury, které jsou v rostlinné říši spolu s indolovými alkaloidy jedny z nejrozšířenějších.<sup>8</sup> Prvním izolovaným AA byl v roce 1877 lykorin z cibule rostliny *Narcissus pseudonarcissus*, od té doby bylo identifikováno více než 600 různých AA a tento počet se s každým rokem zvyšuje.<sup>16</sup>

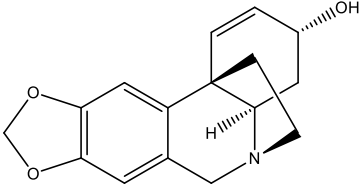
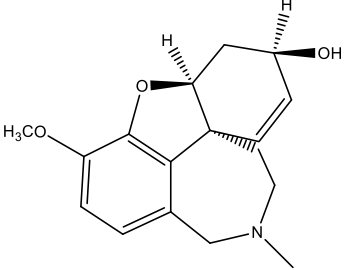
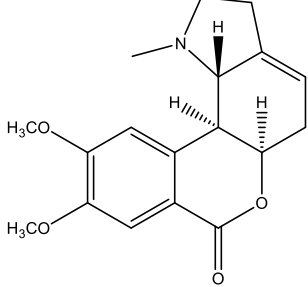
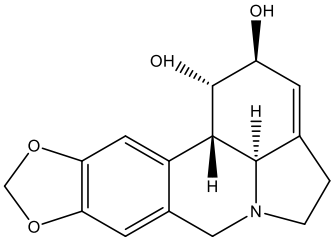
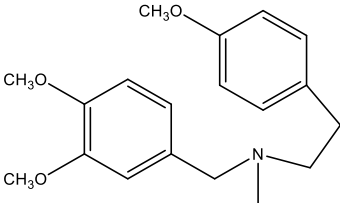
I když se od sebe jednotlivé amaryllkovité alkaloidy liší strukturou, vznikají z jediného prekurzoru, a to z norbelladinu a jeho derivátů. Díky tomu se popisuje syntéza AA cestou označovanou jako tzv. norbelladinová cesta. Syntéza vychází z aminokyseliny L-fenylalaninu, ze kterého vzniká 3,4-dihydroxybenzaldehyd a L-tyrosinu, jehož dekarboxylací vzniká tyramin. Kondenzací 3,4-dihydroxybenzaldehydu a tyraminu vzniká meziprodukt typu Schiffovy baze. Tato baze je následně redukována na norbelladin, který je v dalším kroku metylován pomocí norbelladin 4'-*O*-methyltransferasy (N4OMT) na klíčový meziprodukt biosyntézy 4'-*O*-methylnorbelladin. Ten je cyklizován pomocí tzv. „phenol oxidative coupling“ za vzniku

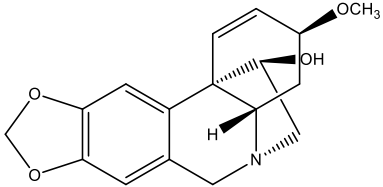
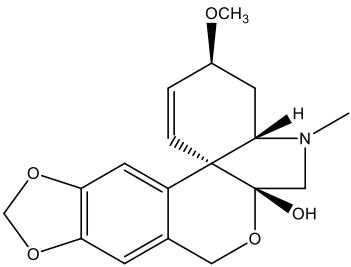
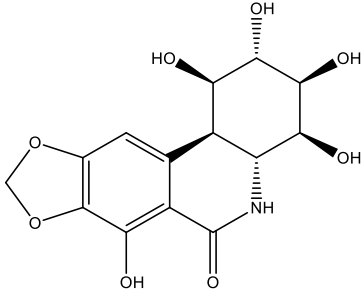
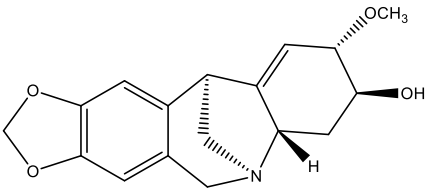
C–C kovalentní vazby, a to ve třech různých postaveních – *para-ortho'*, *para-para'*, *ortho-para'*, která vedou ke vzniku základních strukturálních typů AA: krininového, galantaminového, homolykorinového, lykorinového, belladinového, haemantaminového, tazetinového, pankrastinového a montaninového.<sup>8,17,18</sup> Syntéza hlavních strukturálních typů AA je uvedena na Obrázku 2. V Tabulce 2 jsou uvedeny názvy a vzorce hlavních zástupců strukturálních typů a příklady rodů, ze kterých byly alkaloidy izolovány.

**Obrázek 2** – Syntéza základních typů Amaryllidaceae alkaloidů<sup>18</sup>



**Tabulka 2:** Příklady rodů, ze kterých byly izolovány základní typy alkaloidů<sup>8,14,19 20</sup>

Strukturní typ (název hlavního zástupce)	Vzorec hlavního zástupce	Rod
<p><b>Krininový (krinin)</b></p>		<p><i>Crinum</i> <b><i>Hippeastrum</i></b> <i>Leucojum</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyrantes</i></p>
<p><b>Galantaminový (galantamin)</b></p>		<p><i>Crinum</i> <i>Galanthus</i> <b><i>Hippeastrum</i></b> <i>Leucojum</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyrantes</i></p>
<p><b>Homolykorinový (homolykorin)</b></p>		<p><i>Galanthus</i> <b><i>Hippeastrum</i></b> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i></p>
<p><b>Lykorinový (lykorin)</b></p>		<p><b><i>Hippeastrum</i></b> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyrantes</i></p>
<p><b>Belladinový (belladin)</b></p>		<p><i>Crinum</i> <i>Galanthus</i></p>

Tabulka 2: Příklady rodů, ze kterých byly izolovány základní typy alkaloidů <sup>8,14,19 20</sup>		
Strukturní typ (název hlavního zástupce)	Vzorec hlavního zástupce	Rod
Haemantaminový (haemantamin)		<i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Tazetinový (tazetin)		<i>Hymenocallis</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i>
Pankrastinový (pankrastin)		<i>Haemanthus</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancreatium</i>
Montaninový (montanin)		<i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i>

Z výše popsaných devíti základních typů dále pomocí enzymatických přeměn vznikají další strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů. Velká část z těchto typů je v současnosti reprezentována pouze jedinou identifikovanou látkou, která je přímo vázaná na určitý rostlinný druh.<sup>17</sup> Takovými látkami jsou například narcipavlin a narcikachnin, které byly izolovány



z cibule rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol – jejich molekuly obsahují kombinaci galantaminového a galantindolového strukturního typu.<sup>21</sup>

#### 4.4. Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

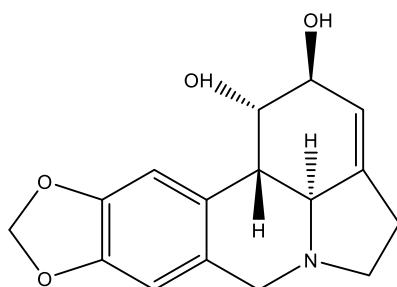
Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, nacházející se i v rodě *Hippeastrum*, a jejich deriváty jsou již několik desítek let intenzivně zkoumány pro široké spektrum významných biologických aktivit, kterými se vyznačují.<sup>14</sup> Mezi hlavní účinky patří cytotoxická, antivirová, antimalarická, antibakteriální, antimykotická, analgetická a inhibiční aktivita vůči enzymům acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase (BchE). Výčet aktivit je velmi rozmanitý, a proto je tato skupina alkaloidů zkoumána a testována s cílem objevit účinné a bezpečné látky, které by v budoucnosti našly své praktické využití v terapii.

##### 4.4.1. Cytotoxická aktivita

Nádorová onemocnění momentálně patří k jedné z nejčastějších příčin úmrtí a představují značnou překážku ve snaze prodloužit průměrnou délku života ve všech zemích světa. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace v roce 2019 zaujala nádorová onemocnění první nebo druhou hlavní příčku v příčinách úmrtí před věkem 70 let ve 112 ze 183 zemí a na třetím nebo čtvrtém místě v dalších 23 zemích. K nejčastěji diagnostikovaným novotvarům se řadí rakovina tlustého střeva, plic, prsu, jater a žaludku.<sup>22</sup> Terapeuticky používané látky často fungují na principu proapoptických činidel, jejichž selektivita je založena na zvýšené inhibici proliferace rychle se dělících buněk. Selektivita často bohužel není dostatečná, látky působí toxicky i na zdravé buňky, a tím vznikají četné nežádoucí účinky. Další častou komplikací léčby je rezistence nádorů na podaný přípravek, která vede k selhání účinnosti terapie. Z těchto důvodů je nutné hledat nové aktivní látky pro léčbu nádorových onemocnění, které budou působit selektivněji k nádorovým buňkám a zároveň budou obcházet mechanismy rezistence.<sup>23</sup>

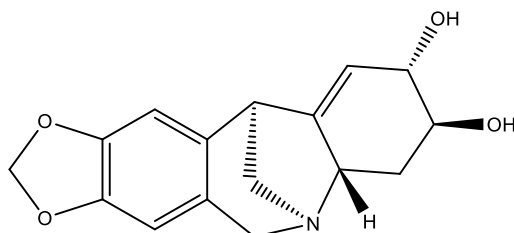
Cytotoxická aktivita byla pozorována např. u látek hemanthaminu, narciklasinu a především u alkaloidů lykorinového strukturního typu lykorinu (Obrázek 3) a pseudolykorinu, které patří z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k neúčinnějším molekulám.<sup>20</sup> Při důkladnějším zkoumání lykorinu byla prokázána suprese tumorových buněk zastavením buněčného cyklu a následnou indukci apoptózy, čehož by se v budoucnosti mohlo využívat v léčbě zhoubných nádorových onemocnění krvinek.<sup>14</sup> Do této doby bylo testováno kolem 150 přirozených a polosyntetických analogů lykorinu pro jejich cytotoxickou aktivitu přibližně na 100 buněčných liniích.<sup>24</sup>

**Obrázek 3** – Struktura molekuly lykorinu



Antineoplastickým účinkem se vyznačuje také pankracin (Obrázek 4), který účinně potlačuje životaschopnost a proliferaci rakovinných buněk. Byl u něj popsán silný inhibiční účinek na růst rakovinných buněčných linií pocházejících např. z vaječníků (A2780), plic (SW1573), prsu (T47-D) a tlustého střeva (WiDr).<sup>25</sup>

**Obrázek 4** – Struktura molekuly pankracinu



#### 4.4.2. Antivirová aktivita

Nejen že je výše zmíněný lykorin známý pro svou cytotoxickou aktivitu, ale vykazuje také antivirovou aktivitu spočívající především v inhibici virové replikace např. u herpes simplex virů, poliovirů a vaccinia virů.<sup>4</sup> Na podkladě schopnosti lykorinu inhibovat také lidské koronaviry typu OC43, NL63, vir myši hepatitidy kmene MHV-A59 a MERS-CoV (The Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), byla vědci zkoumána antivirová aktivita vůči koronaviřům SARS-CoV-2 a SARS-CoV. Po změření biologické aktivity vědci zjistili, že lykorin je dokonce účinnější proti infekcím SARS-CoV-2 a SARS-CoV než proti MERS-CoV, a že jeho inhibiční aktivita je srovnatelná s remdesivirem, který je v této době indikován k terapii onemocnění COVID-19.<sup>26</sup>

Lidský virus imunitní nedostatečnosti (HIV) je retrovirus, proti kterému se už dlouhá léta vědci snaží nalézt účinné antivirotikum. Alkaloidy lykorin, trisferidin, hemanthamin a homolykorin byly podrobeny studiím na lidských T-lymfocytech MT4 pro *in vitro* účinky na inhibici replikační aktivity lidských virů imunodeficiency typu HIV-1.

Bylo prokázáno, že lykorin, trisferidin i hemanthamin vykazovaly značnou antiretrovirální aktivitu a cytotoxický MTT test odhalil u homolykorinu inhibici replikace viru.<sup>27</sup>

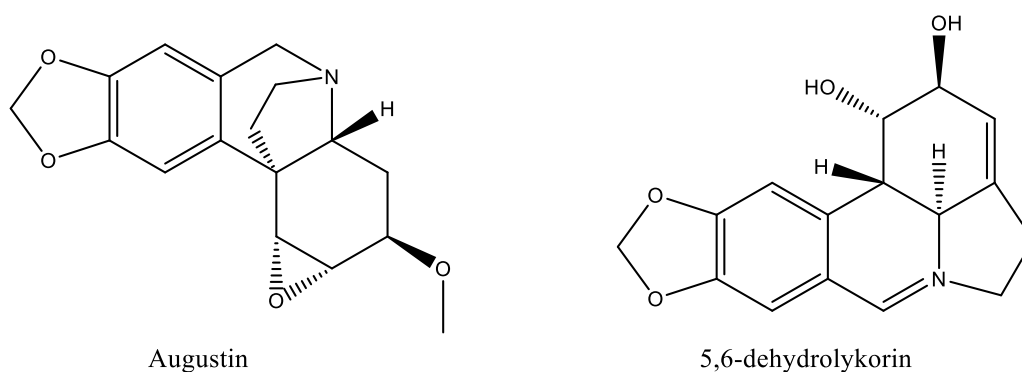
#### 4.4.3. Antimalarická aktivita

Malárie je závažná transmisivní nákaza, která je přenášena parazity rodu *Plasmodium* a projevuje se horečkou, bolestí kloubů a hlavy, zimnicí, nauzeou a v nejzávažnějších případech kómatem s následnou smrtí. Jedná se o infekční onemocnění, jehož incidence neustále celosvětově roste. Důvodem jsou nejen změny v zemědělských praktikách a rostoucí turismus, ale především zvyšující se rezistence na terapeuticky užívaná antimalarika.<sup>28</sup> Proto je velmi důležité neustále hledat nové efektivnější látky.

Měření biologické aktivity bylo provedeno i u alkaloidů izolovaných z hlízy rostliny *Crinum amabile* – amabilinu, augustinu, bufanisinu, krinaminu a lykorinu. Testovala se antimalární účinnost proti parazitovi *Plasmodium falciparum*, jak chlorochin senzitivnímu, tak chlorochin rezistentnímu. Nejvyšší účinnost vůči oběma typům *P. falciparum* vykazovaly alkaloidy augustin (Obrázek 5) a lykorin. Krinamin projevoval pouze mírný antimalarický účinek a zbylé alkaloidy byly neúčinné.<sup>29</sup>

Antimalarickým účinkem se vyznačuje i alkaloid 5,6-dehydrolykorin (Obrázek 5) izolovaný z cibule rostliny *Lycoris radiata*, u kterého byla prokázána účinnost proti dvěma kmenům *Plasmodium falciparum* (D-6 a W-2).<sup>29</sup>

**Obrázek 5** – Struktura molekuly augustinu a 5,6-dehydrolykorinu

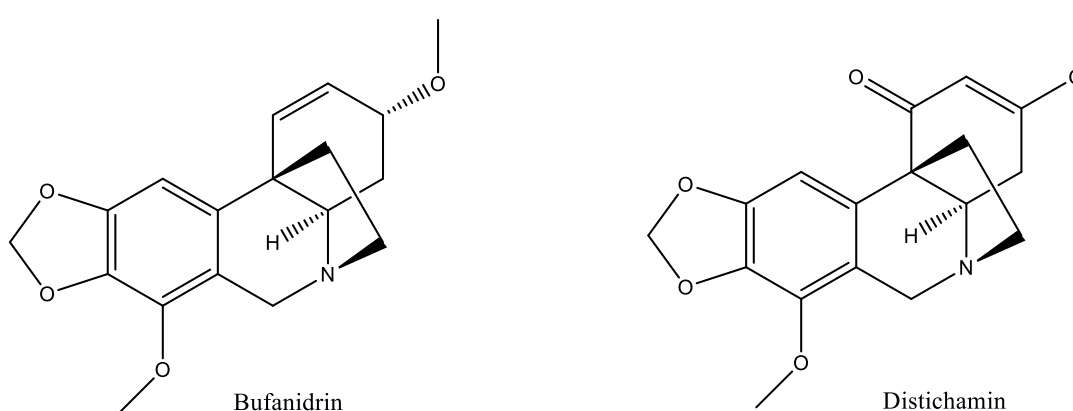


#### 4.4.4. Antibakteriální aktivita

Z důvodu nadměrného růstu bakteriální rezistence, vznikajícího především kvůli nadužívání a nesprávnému použití antibiotik, se vědci po celém světě pokouší objevit nové látky, které vykazují antibakteriální účinnost.

Již africké kmeny používaly odvary a extrakty z rostliny *Boophone disticha* v tradiční medicíně k léčbě řezných ran, popálenin, zánětů, gynekologických potíží a psychotických stavů. Proto se na alkaloidy této rostliny zaměřili i vědci, kteří je izolovali a podrobili měření biologické aktivity. Izolované alkaloidy bufanidrin a distichamin (Obrázek 6) byly testovány proti jak gramnegativním (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), tak grampozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). Nevelkým překvapením byla antibakteriální aktivita ethanolickeho extraktu alkaloidů s hodnotou 0,063 mg/ml proti všem typům testovaných bakterií.<sup>30</sup>

**Obrázek 6** – Struktura molekul bufanidrinu a distichaminu



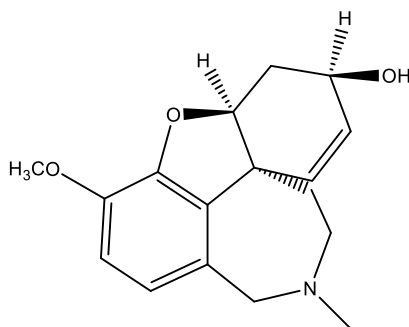
#### 4.4.5. Inhibice enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

Acetylcholinesterasa, enzym patřící do skupiny serinových proteas, je lokalizovaná na neuromuskulárních spojeních, v cholinergních synapsích centrálního nervového systému a v červených krvinkách. AchE má vysokou katalytickou aktivitu a rychlou hydrolyzou inaktivuje neurotransmitter acetylcholin (Ach), který rozkládá na acetát a cholin. Ach je mediátor nacházející se na nervových zakončeních parasymptiku, kde navázáním na muskarinové receptory vyvolává parasymptomimetické projevy – zvýšení motility hladkého svalstva, zpomalení srdeční činnosti, relaxaci svěračů, zvýšení žlázné sekrece, bronchokonstrikci a další. Působí také na nervosvalové ploténce a ve vegetativních gangliích, kde ovšem reaguje s nikotinovými receptory.<sup>31</sup> Díky degradaci Ach se umožní návrat

cholinergních neuronů do jejich klidového stavu. Nesprávné fungování tohoto systému vede mimo jiné k progresivnímu zhoršování paměti pozorované u Alzheimerovy choroby. Butyrylcholinesterasa, označovaná také jako pseudocholinesterasa, může podobně jako AchE degradovat acetylcholin. Oproti AchE je BchE produkovaná játry a detekovaná v plazmě. BchE je také exprimována v neuronech CNS. Biologická aktivita BchE je za normálních podmínek v porovnání s AchE podstatně menší, ale v případě demence Alzheimerova typu její koncentrace patologicky roste a v pokročilých stádiích onemocnění se stává převládající esterasou.<sup>32</sup>

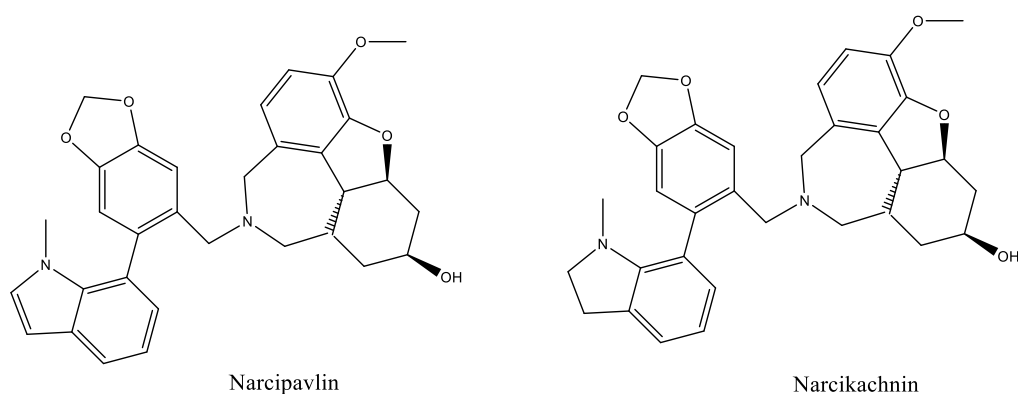
Některé AA, například v praxi používaný galantamin (Obrázek 7), jsou dlouhodobě působící, selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitory AchE a BchE a zároveň alosterické modulátory nikotinového receptoru pro acetylcholin. Působením těchto alkaloidů se zvyšuje hladina Ach na synapsi, čímž se usnadňuje cholinergní přenos. Díky tomu je dnes galantamin používán k symptomatické léčbě mírné až středně těžké demence Alzheimerova typu.<sup>32</sup>

**Obrázek 7** – Struktura molekuly galantaminu



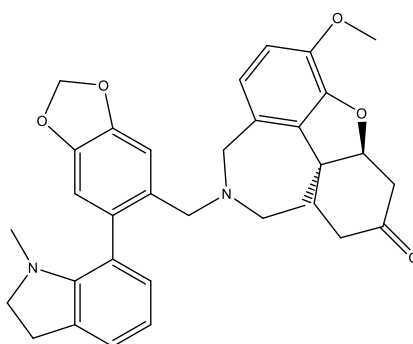
Nově objevený alkaloid narcipavlin, izolovaný z cibule rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol, byl podroben měření biologické aktivity, kdy ukázal slibnou inhibici vůči lidské BchE s hodnotou  $IC_{50} = 24.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ . Alkaloid narcikachnin, který se od narcipavlinu liší pouze v poloze dvojné vazby mezi uhlíky C'13–C'14 (Obrázek 8), byl izolován v tak malém množství, že se měření biologické aktivity nemohlo uskutečnit. Proto nebylo dokázáno, zda má přítomnost dvojné vazby klíčový význam pro inhibici enzymu BchE.<sup>21</sup>

**Obrázek 8** – Struktura molekul narcipavlinu a narcikachninu



Pomocí běžných chromatografických metod bylo z čerstvých cibulí rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master izolováno celkem 21 již známých alkaloidů a jeden alkaloid nové struktury s názvem narcimatulin, který ve své molekule kombinuje dva základní typy AA – galantamin a galantindol. Všechny izolované sloučeniny byly hodnoceny z hlediska jejich *in vitro* aktivity vůči AchE, BchE, prolyl oligopeptidase (POP) a glykogensyntase a inhibiční aktivity kinasy-3p. Nejzajímavější biologický profil prokázal právě nově izolovaný narcimatulin, který vykazoval inhibiční aktivitu vůči BchE s hodnotou  $IC_{50} = 5,90 \pm 0,23 \mu M$ .<sup>33</sup>

**Obrázek 9** – Struktura molekuly narcimatulinu



#### 4.5. Demence

Demence je zastřešující termín pro řadu progresivních organických onemocnění mozku, charakterizovaných postižením krátkodobé, později i dlouhodobé paměti, postupujícím úbytkem kognitivních schopností a poruchami osobnosti, které narušují nezávislý každodenní život pacienta. Nemoc typicky začíná pomalu progresivním poklesem paměti, i když v méně obvyklých typech demence dominují příznaky behaviorální, vizuoprostorové, popř. jazykové. V terminálním stádiu znemožňuje onemocnění vykonávání i základních činností nutných pro důstojný život a pacient je odkázán na nepřetržitou pomoc druhých. Dosud zjištěných příčin

demence je nespočet a zahrnují primární neurologické, neuropsychiatrické i zdravotní stavy. Většina neurodegenerativních onemocnění vedoucích k demenci je charakterizována procesy, kdy dochází k aberantní polymeraci proteinů v mozku. U nízkého procenta jedinců se demence ale vyvine jako přímý důsledek mutací či polymorfismů v genech ovlivňující tyto procesy.<sup>34,35</sup>

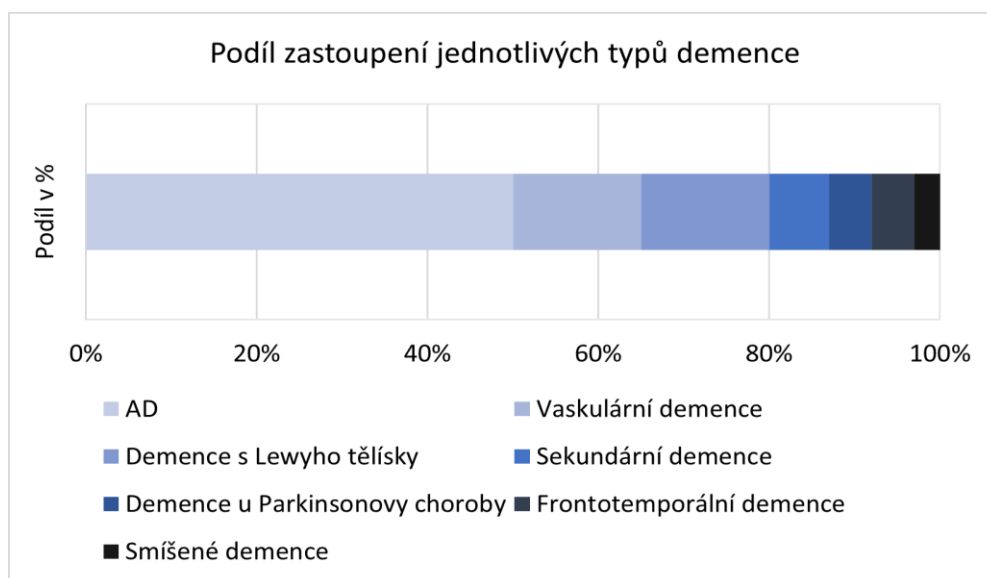
#### 4.5.1. Epidemiologie

Co se týče počtu pacientů postižených demencí, globální odhady prevalence jsou až 7 % jedinců starších 65 let běžné populace. Riziko vzniku onemocnění prudce roste s přibývajícím věkem – samotný syndrom bývá proto někdy označován jako stařecká demence. U seniorů starších 75 let trpí některým typem demence přibližně 15 procent a po 80. roce života dokonce 20–40 % osob. Ve vyspělých zemích je celková incidence ještě o něco vyšší, a to z důvodu vyšší průměrné délky života lidí. V této době zaujímá demence ve světě až děsivě vysokou příčku v tabulce příčin úmrtí, a to 4.–5. místo.<sup>34,36</sup>

#### 4.5.2. Typy demencí

Demence lze dle příčin klasifikovat na několik druhů – Alzheimerova choroba, demence vaskulární, smíšená, s Lewyho tělísky, spojená s Parkinsonovou chorobou, frontotemporální a sekundární demence, které jsou jako jediné potenciálně reverzibilní, pokud se včas odhalí a odstraní jejich příčina. Nejčastěji zastoupenou formou je Alzheimerova choroba (50–60 % všech případů) a demence s Lewyho tělísky (10–20 %), které se projevují primárně u starších lidí. Na druhou stranu traumatické poranění mozku, nádory hlavy, intoxikace, infekce, cévní onemocnění a další poruchy zasahující mozek jsou běžnými příčinami u mladších pacientů.<sup>36</sup>

**Obrázek 10:** Procentuální podíl zastoupení jednotlivých typů demence<sup>36</sup>



## 4.6. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je primární neurodegenerativní onemocnění, jež bylo poprvé předmětem zkoumání na začátku 20. století, kdy německý neuropatolog a psychiatr Alois Alzheimer, po kterém byla choroba později pojmenována, pozoroval u jedné ze svých pacientek příznaky kognitivní poruchy.<sup>37</sup> Jak již bylo zmíněno v přechozí kapitole, nyní se jedná o nejrozšířenější typ demence vůbec.

### 4.6.1. Etiopatogeneze

Ačkoli můžeme jasně pozorovat, jaké jsou důsledky AD, skutečná příčina nemoci v tuto chvíli stále není zcela objasněna. Bez ohledu na původ onemocnění, buněčné poškození způsobuje dysfunkci komunikace mezi neurony v mozku. To vede ke změnám v myšlení, emocích, paměti a dalších v závislosti na konkrétním místě poškození. Existuje mnoho teorií snažících se vysvětlit příčinu poškození buněk v mozku, které má za následek vznik nemoci.<sup>38</sup> Tyto teorie popisují například amyloidní dysmetabolismus, charakterizovaný patologickou tvorbou amyloidního plaku, tvorbu neurofibrilárních klubek nebo změny funkce a hladin neuromediátorů a aminokyselin v mozku.<sup>39</sup>

Během let výzkumu AD bylo prokázáno, že ukládání bílkovinného agregátu  $\beta$ -amyloidu je klíčovou událostí při zahájení neuronální degenerace. Nerozpustný  $\beta$ -amyloid se shlukuje do amyloidních plaků, které se projeví jako neurotoxické při zkouškách jak *in vitro*,<sup>40</sup> tak *in vivo*<sup>41</sup> a v mozku vedou k neurodegenerativním procesům. Tento peptid je syntetizován z tzv. amyloidového prekurzorového proteinu (APP), glykoproteinu, zabudovaného v membránách nervových buněk, který je za běžných podmínek nezbytný pro správné fungování nervové soustavy. U zdravých lidí je APP štěpen biokatalyzátorem  $\alpha$ -sekretasou na menší rozpustné fragmenty, které pomáhají udržet plasticitu nervových buněk a zabezpečují jejich ochranu.<sup>42</sup> U pacientů s AD je ale APP rozkládán enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasou, díky kterým se tvoří delší a skoro nerozpustné fragmenty, které se následně spojují za vzniku bílkoviny  $\beta$ -amyloidu, jejíž molekuly se shlukují do extracelulárních plaků způsobujících sterilní zánět.<sup>37</sup>

Kromě amyloidních plaků jsou významným patologickým znakem AD i neurofibrilární klubka. Jedná se o intracelulární shluky proteinu známého pod označením  $\tau$ . Tento protein hraje za fyziologických podmínek důležitou roli v nervové soustavě, kdy ve své fosforylované podobě stabilizuje mikrotubuly, které díky němu snadněji polymerují. Pokud je  $\tau$  protein hyperfosforylován, což znamená, že do proteinu je přidáno příliš mnoho molekul fosfátu, tvoří nerozpustné zkroucené vlákno uvnitř neuronu. Tato spleť narušuje normální transport živin a buněčné fungování, což vede k buněčné smrti.<sup>38,42</sup>



Nejen tvorba patologických bílkovin, ale i změna funkce a hladin neuromediátorů byla pozorována u pacientů s AD. Acetylcholin je důležitý neurotransmitter, který zprostředkovává přenos nervového vzruchu v periferní i centrální nervové soustavě. U AD můžeme v cholinergním systému pozorovat úbytek Ach, a to z důvodu snížení koncentrace enzymu cholinacetyltransferasy, který je zodpovědný za syntézu Ach z acetyl-CoA a cholinu. Zároveň dochází k odbourávání Ach enzymy AchE a BchE. Biologická aktivita BchE je v časných stádiích AD oproti AchE podstatně nižší, ale její koncentrace se patologicky zvyšuje v pokročilých stádiích onemocnění a stává se převládajícím enzymem. Předpokládá se, že deficit Ach přispívá ke kognitivnímu poškození, které u této nemoci pozorujeme.<sup>32,38</sup>

Další neurotransmitter, který se podílí v mozku na aktivaci či excitaci neuronů a je také zapojen v procesu učení a paměti, je aminokyselina nazývaná se glutamát. Glutamát se váže na konkrétní protein známý jako *N*-methyl-*D*-aspartátový (NMDA) receptor a hraje důležitou roli v synaptické plasticitě, normální paměti a učení se novým úkolům. Při AD se z poškozených buněk uvolňuje přebytek glutamátu, což má za následek hyperexcitaci NMDA receptorů, které způsobí zvýšený vstup vápníku do nervové buňky. Chronická nadměrná expozice vápníku může vést k dalšímu poškození buněk a k následné apoptóze.<sup>42</sup>

Jedním z nejsilnějších rizikových faktorů AD je pozitivní rodinná anamnéza, představující přibližně třikrát vyšší riziko rozvoje choroby u prvostupňových příbuzných pacientů s AD. Familiární forma zaujímá zhruba 5–10 % případů z celkového počtu nemocných a je pro ni typický časný nástup již před. 65. rokem života. Při genetických testováních se ukázalo, že například alela nacházející se na chromozomu 19 s názvem APOE, která kóduje syntézu apolipoproteinu E, jenž se podílí na tvorbě  $\beta$ -amyloidu, může mít za následek až čtyřnásobně zvýšené riziko rozvoje AD, a to především u ženského pohlaví. U mužů nesoucích tuto alelu se riziko ale zvyšovalo pouze minimálně.<sup>43,44</sup> Další genetický faktor, který může hrát roli, je známý jako jednonukleotidové polymorfismy (SNP). SNP jsou izolované změny v jediném nukleotidu vyskytující se na určitém místě genomu. Tyto odchylky jsou často spojovány s chorobnými stavy, jako je například srpkovitá anémie nebo cystická fibróza.<sup>42</sup> Celkově bylo objeveno více než 160 různých mutací, které jsou označovány jako odpovědné za většinu případů familiární autozomálně dominantní AD s časným nástupem. Jedná se jak o již výše zmíněné mutace, tak o změny na chromozomu 1, 12, 14, 21, a dále například o mutace genu pro transmembránový protein presenilin 1 a 2.<sup>45</sup>

#### 4.6.2. Symptomy Alzheimerovy choroby

Nástup příznaků onemocnění je u pacientů trpících AD ze začátku velmi nenápadný a typicky se projevy zhoršují v čase. Raná stádia jsou spojena především s poruchami paměti.<sup>36</sup> S rostoucím věkem je zcela normální, že dochází k určitým výpadkům paměti, například zapomenete, kam jste umístili klíče nebo si nezapamatujete jméno nového přítele. Ztráty paměti u pacientů s AD jsou však mnohem dramatičtější, nejsou přechodné a v průběhu času postupně eskalují. Pacienti často zapomínají předmět konverzace, která právě proběhla, nepamatují si jména členů rodiny nebo blízkých přátel nebo špatně umísťují denně používané předměty. Je to způsobeno tím, že u AD dochází ve většině případů nejdříve k dysfunkci buněk hipokampu, který je nedílnou součástí formování nové paměti. Pokud je tato oblast mozku poškozena, naruší se i funkce vytváření a upevňování nových vzpomínek, a to způsobí poruchy krátkodobé paměti. Zajímavé je, že staré vzpomínky jsou ušetřeny. Důvodem je jejich ukládání v prostoru celé mozkové kůry. Tvorba nových vzpomínek spoléhá na hipokampus, ale jakmile je paměť uložena, role hipokampu se stává zanedbatelnou.<sup>38</sup>

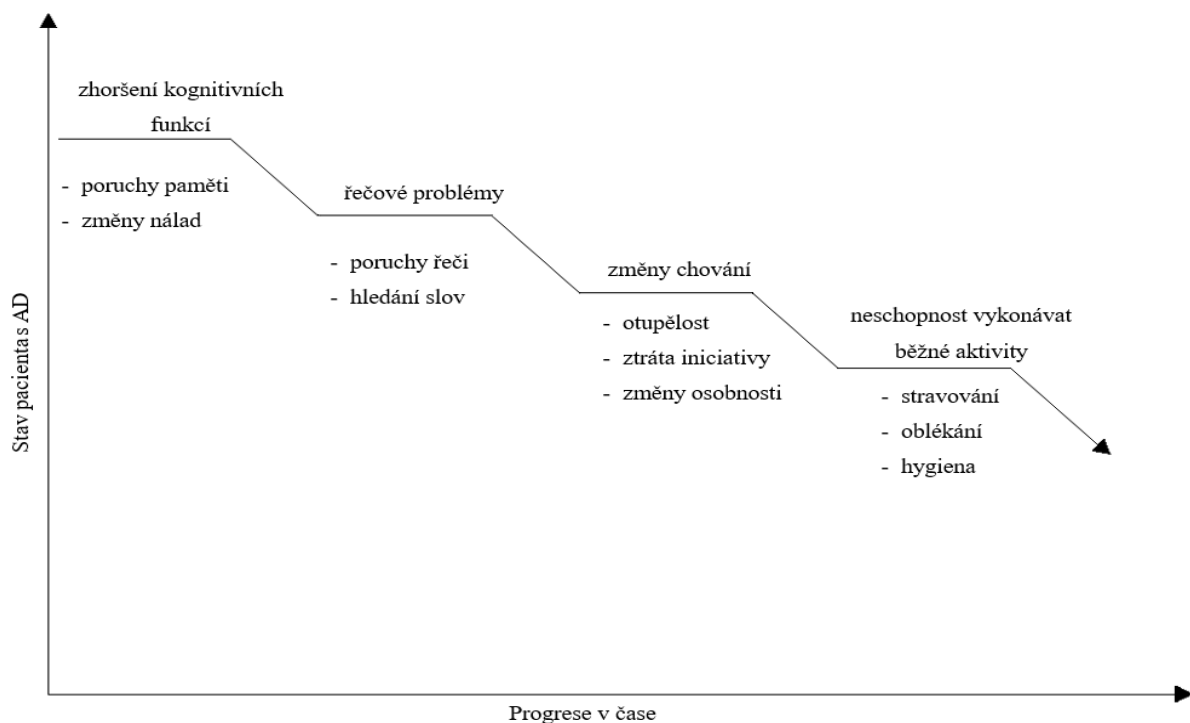
Problémy s pamětí jsou však pouze malou částí klinických příznaků, které tvoří AD. K dalším často pozorovaným symptomům patří zhoršení prostorového vnímání, které se může projevit jako zmatenost i na dobře známém místě nebo jako nesprávná interpretace prostorových vztahů, což ztěžuje pohyb pacienta jak chůzí, tak pomocí dopravních prostředků. Dalším příznakem nemoci jsou verbální poruchy, které lidem trpícím tímto onemocněním velmi komplikují komunikaci s ostatními lidmi. Mnoho pacientů zažívá tzv. fenomén „na špičce jazyka“, kdy nemohou najít správné slovo, i když přesně vědí, co se snaží říct. Velká spousta lidí trpících AD si v počáteční a střední fázi nemoci bohužel může být vědoma svého onemocnění a omezení, které se sebou AD přináší. To často vede k pocitu frustrace a rozrušení a napomáhá ke zhoršování psychického stavu.<sup>38,46</sup>

Mezi další procesy, které se řadí do skupiny důležitých kognitivních funkcí, a jsou postiženy u pacientů s AD, patří uvažování, rozhodování, plánování a provádění pohybů. Tyto kognitivní procesy jsou všechny nepříznivě ovlivněny základními patologickými změnami AD a bohužel nakonec vedou k vážným sociálním problémům mezi pacientem, jeho nejbližšími přáteli, rodinou a později ošetřujícími jedinci. Hlavním důvodem je, že člověk s demencí se stává více a více odkázaný na pomoc ostatních, ale zároveň vnímá svou hrdost a sebeuvědomění. Touží žít autonomně a činnosti, které v životě běžně vykonával sám, nechce přenechávat jiným.<sup>38</sup>

Velké procento pacientů s AD (50–90 %) ve střední až pozdní fázi může také vykazovat neuropsychiatrické příznaky, mezi které patří deprese, úzkost, neklid, agrese, výbuchy vzteku, apatie, bludy, halucinace a nevhodné sexuální chování. Nejen že jsou tyto příznaky spojeny s poklesem kognitivních funkcí, který může vést ke zvýšení úmrtnosti pacientů, ale jejich přítomnost a závažnost jsou také pozitivně spojeny s pečovatelskou zátěží.<sup>47</sup>

V pozdní fázi onemocnění jsou pacienti neschopni vykonávat běžné denní aktivity jako je oblékání, stravování či hygiena. Kvůli silným výpadkům paměti nepoznávají své blízké, později ani sami sebe. Komunikace a porozumění se pro ně stávají čím dál složitější, řeč se omezuje postupně pouze na jednoduché věty až nakonec zůstane jen pár základních slov. Přestože nemocný většinu dne spí, má velmi málo energie, špatně jí, ztrácí na váze a organismus celkově fyzicky ochabuje. Ke konci života jsou pacienti kompletně připoutáni na lůžko a jsou zcela odkázáni na pečovatelskou odbornou pomoc. AD se průměrně manifestuje 7–10 let, u časných forem i kratší dobu. Z toho konečné stádium nemoci může trvat několik týdnů, ale bohužel i několik let. Život nemocných je ukončen smrtí nejčastěji z důvodu přidružených komplikací.<sup>36,38</sup>

**Obrázek 11** – Obvyklé symptomy projevující se u pacienta s AD v čase<sup>35,36</sup>

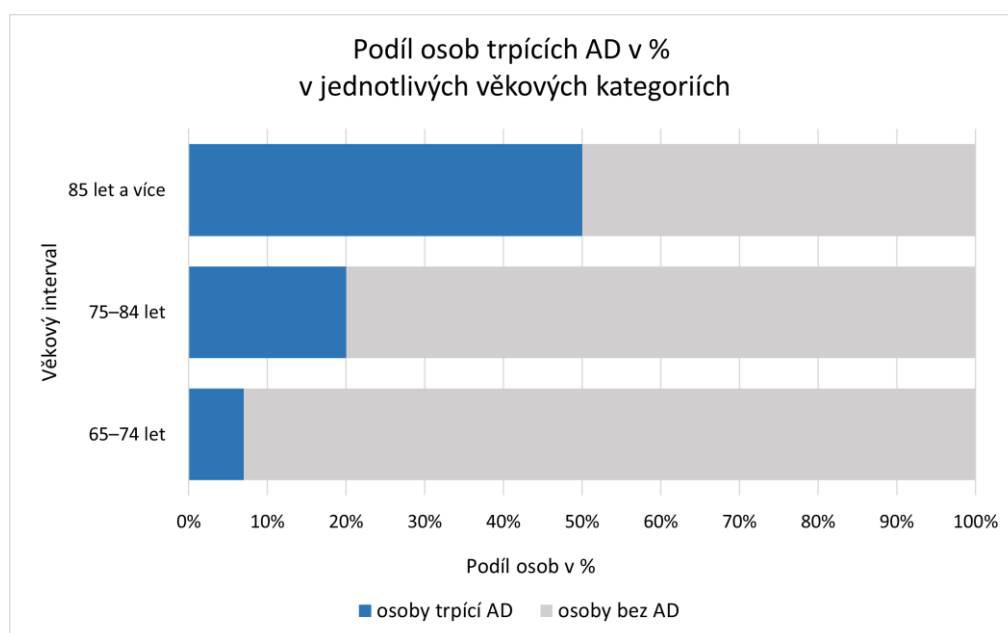


Je potřeba si také uvědomit, že AD je onemocnění, které neovlivňuje pouze daného pacienta, ale psychicky zasáhne celou jeho rodinu a blízké, na které je člověk s AD odkázán. U pečujících lidí je důležité, aby i kvůli svému psychickému a fyzickému zdraví dokázali rozpoznat, kde jsou jejich limity a kdy se o pacienta ještě dokážou postarat sami.

### 4.6.3. Epidemiologie

Prevalence AD, která představuje 50–60 % všech případů demence, byla v roce 2015 podle Alzheimer's Disease International celosvětově odhadována na 46,8 milionů pacientů<sup>48</sup> a očekává se, že do roku 2050 dosáhne až čísla 115,4 milionů.<sup>47</sup> Podle zahraničních prevalenčních studií se v roce 2015 odhadoval počet lidí s AD pouze v České republice na 155,9 tisíc, což odpovídá zhruba každému 70. obyvateli naší země.<sup>48</sup> AD je běžně diagnostikována u jedinců starších 65 let věku a výskyt onemocnění se exponenciálně zvyšuje s rostoucím věkem (Obrázek 12). Přestože je choroba typicky považována za nemoc starších lidí, ne vždy tomu tak je. Existuje vzácná forma, známá také pod pojmem presenilní, která postihuje zhruba 5 % jedinců z celkového počtu pacientů s AD, a projevuje se již ve třetím a čtvrtém desetiletí jejich života. Ačkoli někteří z těchto mladších pacientů jsou schopni žít plnohodnotný život i několik let po diagnóze, relativně málo z nich se dožije 50. narozenin. V průměru je střední délka dožití osoby trpící AD kolem 6 let od stanovení diagnózy. Méně než 3 % postižených žije 14 let.<sup>38</sup>

**Obrázek 12** – Procentuální podíl osob trpících Alzheimerovou chorobou v jednotlivých věkových kategoriích<sup>48</sup>



Dobře známým epidemiologickým faktem je, že AD postihuje více ženy než muže. V populaci nad 65 let je prevalence AD až dvakrát vyšší u ženského pohlaví než u mužského. Nadměrné zastoupení žen je pozorováno nezávisle na kultuře, rase a dalších diagnostických kritériích. Tento fakt je zajímavý i z toho důvodu, že muži mají prokazatelně vyšší riziko rozvoje mírné kognitivní poruchy (MCI). MCI je stav, kdy má pacient problémy s pamětí a poznávacími funkcemi, ale stále nesplňuje kritéria pro diagnózu demence.<sup>49</sup> Jedním z racionálních důvodů vyššího procentuálního zastoupení žen postižených AD je jejich vyšší průměrná délka života. Na území České republiky v letech 2017–2018 se podle Českého statistického úřadu ženy dožívaly v průměru 82 let. Oproti tomu muži skoro o 6 let méně – pouze 76 let.<sup>50</sup> Druhým jasně pozorovatelným důvodem je, že ženy s AD obecně přežívají s onemocněním delší dobu než muži.<sup>49</sup> Za to je částečně zodpovědný neuroprotektivní účinek estrogenu, životní styl nebo rizikové kardiovaskulární faktory.<sup>51</sup> Bylo prokázáno, že estrogen zlepšuje synaptický přenos, funkci hipokampu, krevní oběh a metabolismus glukózy v mozku a zároveň zvyšuje syntézu Ach a může zabránit poškození mitochondrií. Kromě biologických rozdílů mezi ženou a mužem ovlivňují rozvoj AD i sociální faktory, jako je vzdělání, povolání, cvičení, strava, kouření, konzumace alkoholu a další. V dnešní době na území České republiky už mají tyto faktory díky velkému tlaku na genderovou rovnost zanedbatelný vliv na rozdíl mezi pohlavími v prevalenci AD.<sup>38</sup>

#### **4.6.4. Diagnostika**

Na rozdíl od jiných poruch, které se objevují rychle a mají symptomy, které se u pacientů snadno projeví, příznaky Alzheimerovy choroby začínají velmi mírně a postupují pomalu. V důsledku toho je pro rodinné příslušníky a osoby v blízkosti pacienta extrémně obtížné zaznamenat zhoršení, dokud nemoc extrémně nepokročí. Diagnostika AD je také komplikována kvůli nejednoznačnosti symptomů, které jsou typické i pro mnoho dalších onemocnění, jedno z nich je např. deprese. Lidé s depresí totiž často trpí poruchami paměti, a dokonce i omezením motorických funkcí. Depresivní pacienti tak mohou být nesprávně diagnostikováni kvůli negativním účinkům deprese na testy, které se provádí u podezření na AD. Navíc jak už bylo zmíněno výše, 30–50 % pacientů s AD trpí také zároveň depresemi.

Při podezření na AD je velmi důležitý odběr osobní a rodinné anamnézy pacienta. Následně se provádí krevní testy, které specificky měří hladiny vitaminů B12 a D, funkce štítné žlázy, jaterní enzymy, hladinu elektrolytů a glykémie a další kritéria, která by mohla vést k rozvoji demence. Zároveň se vyloučí infekční nemoci jako je syfilis, HIV a borelie, u kterých

se může demence projevit.<sup>38</sup> U pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou se provádí genetické testování, kdy se pátrá po známých patogenetických mutacích.

Důležitým krokem v diagnostice jsou radiografická zobrazení mozku. Nejčastěji se využívá zobrazovací metody výpočetní tomografie (CT) pro odlišení onemocnění, která by mohla být teoreticky chirurgicky řešitelná – vaskulární choroby, tumory, léze, krvácení a jiné. Magnetická rezonance (MRI) mozku má oproti vyšetření CT vyšší citlivost a specifitu, nevýhodou je však její cena. Obě zobrazovací metody podrobně zobrazují anatomii mozku a dokáží odhalit morfologické změny, jako je cerebrální atrofie, což je jeden z charakteristických znaků AD. Metody spadající do nukleární medicíny, jednofotonová emisní výpočetní tomografie a pozitronová emisní tomografie, se používají především k hodnocení mozkového metabolismu, průtoku krve a zásobení kyslíkem.<sup>52</sup>

Nedílnou součástí diagnostiky AD jsou i fyzikální vyšetření, kdy se podrobně hodnotí stav kognitivních funkcí. Celosvětově doporučovaným testem je tzv. Krátká škála mentálního stavu (Mini mental state examination – MMSE), která se skládá ze 30 otázek a jednoduchých úkolů, zaměřených na krátkodobou paměť, prostorové a časové vnímání, logické myšlení, psaní, čtení a další. Zdravý člověk bez poruchy kognitivních funkcí by měl dosáhnout plného počtu bodů.<sup>36</sup>

<b>Tabulka 3: Orientační hodnocení MMSE<sup>53</sup></b>	
<b>Počet získaných bodů</b>	<b>Hodnocení</b>
30–27	Pacient bez poruchy kognitivních funkcí.
26–25	Hraniční nález, podezření na některý typ demence.
24–18	Patologický nález, pacient trpí lehkou až středně těžkou demencí.
17–6	Pacient trpí středně těžkou až těžkou demencí.
5–0	Pacient trpí těžkou demencí.

Další vhodnou orientační zkouškou je test kreslení hodin, kdy mají pacienti za úkol nakreslit ciferník, na kterém jsou správně umístěna všechna čísla. Poté musí pomocí malé a velké hodinové ručičky správně zaznamenat určený čas. Podle tvaru hodin, umístění čísel a zanesení času se hodnotí stupeň demence. Výhodou testu je jeho rychlé provedení. Nevýhodou je však nerozpoznání časných kognitivních poruch.<sup>36</sup>

#### 4.6.5. Léčba Alzheimerovy choroby

Vzhledem k tomu, že doposud není zcela odhalena etiopatogeneze AD, tak neexistuje ani účinná terapie, která by onemocnění kompletně vyléčila. Nynější postupy mají za cíl pouze zpomalit progresi a zlepšit kvalitu života pacienta. V praxi se využívá kombinace farmakologických a nefarmakologických metod.

Pacient postižený AD by měl přizpůsobit svůj životní styl onemocnění a dodržovat co nejvíce pravidelný režim bez větších změn. Vhodné je podporovat jak fyzické, tak psychické zdraví, např. zařazením pro pacienta akceptovatelné sportovní aktivity – procházky, tance, jízdy na rotopedu a dalších jednodušších úkonů. Důležitou částí nefarmakologické terapie je bezpochyby dlouhodobá stimulace mozku, kdy dochází k rozvíjení kognitivních funkcí řešením jednoduchých paměťových cvičení, čtením, luštěním křížovek, procvičováním drobné motoriky atd. V pokročilejší fázi onemocnění by se nemocnému měla přizpůsobit celá domácnost, ať už se jedná o edukaci členů rodiny nebo zařízení bytu, který by měl být maximálně bezpečný a jednoduchý. V terminální fázi onemocnění je pacient závislý na kvalifikované ošetrovatelské péči.<sup>36</sup>

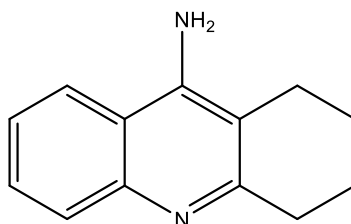
Farmakologická terapie by měla být nasazena co nejdříve, ale zároveň až po potvrzení správné diagnózy. To je komplikováno především postupným a většinou mírným nástupem nemoci a složitou diagnostikou. Současné možnosti léčby kognitivních deficitů pozorovaných u AD nabízejí terapii dvěma hlavními skupinami látek – inhibitory cholinesteras, které zvyšují množství dostupného Ach v mozku a antagonisty NMDA receptoru, který modifikuje glutamátergní neurotransmisi.<sup>34</sup>

##### 4.6.5.1. Inhibitory cholinesteras

Mechanismus účinku látek, vykazujících inhibiční aktivitu vůči AchE, popřípadě BchE, spočívá v potlačení funkce enzymů, které za normální situace degradují v synaptických štěrbinách neuromediátor Ach. Díky tomu je Ach přítomen v dostatečně velké koncentraci pro správný přenos nervového signálu v centrální nervové soustavě (CNS) a zároveň dochází ke snížení tvorby a toxicity  $\beta$ -amyloidu. Látky z této skupiny můžeme rozdělit podle typu kompetice s aktivním úsekem cholinesteras na kompetitivní inhibitory, které přímo reagují s aktivním místem enzymu a na nekompetitivní, inhibující v jiné části aktivního působíště.<sup>54</sup> Inhibitory cholinesterasy jsou momentálně lékem volby pro léčbu mírné až středně těžké AD a jsou většinou pacientů dobře snášeny. Ačkoli jejich hlavní použití bylo za úkolem stabilizace poklesu kognitivních funkcí, existují důkazy, které je spojují se zlepšením behaviorálních a psychologických příznaků demence. Vůbec prvním schválenou léčivou látkou s inhibiční

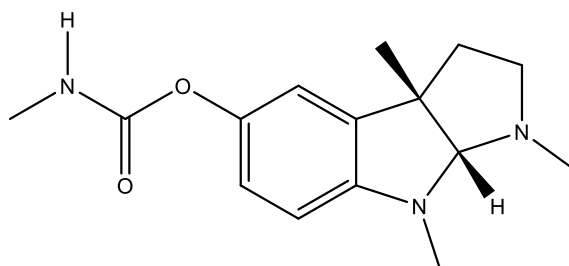
aktivitou vůči esterasám byl v roce 1993 takrin (Obrázek 13), který byl ale o několik let později stažen z trhu pro vysokou gastrointestinální a hepatální toxicitu. V současné době se v klinické praxi využívá pouze tři zástupců – galantaminu, rivastigminu a donepezilu, kteří jsou známi jako tzv. kognitiva.<sup>55</sup>

**Obrázek 13** – Struktura molekuly takrinu



Další látkou zavedenou do terapie AD po takrinu byl rivastigmin, který se používá ve formě rozpustné tartátové soli. V praxi je v České republice znám např. pod firemními názvy EXELON<sup>®</sup>, NIMVASTID<sup>®</sup>, PROMETAX<sup>®</sup>, RIVASTIGMIN ACTAVIS<sup>®</sup> nebo RIVASTIGMINE SANDOZ<sup>®</sup>. Jeho terapeutickou indikací není pouze demence Alzheimerovského typu, ale také symptomatická léčba mírné až středně těžké demence u pacientů s idiopatickou Parkinsonovou chorobou.<sup>56</sup> Molekula byla inspirována strukturou parasymptomimetického alkaloidu fysostigminu (Obrázek 14), od kterého se liší přítomností terciární aminoskupiny, díky které je umožněn průnik přes hematoencefalickou bariéru, a tudíž je zvýrazněný účinek na CNS.<sup>54</sup>

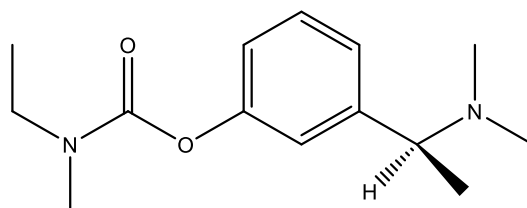
**Obrázek 14** – Struktura molekuly fysostigminu



Rivastigmin (Obrázek 15) se řadí díky svému mechanismu účinku do skupiny pseudoreverzibilních kompetitivních inhibitorů cholinesteras, protože karbamyluje přímo aktivní místo jak AchE, tak i BchE. Tento děj probíhá selektivně přímo v hipokampu a mozkové kůře, které jsou u pacientů s AD nejvíce zasaženy neurodegenerativními změnami.<sup>57</sup>

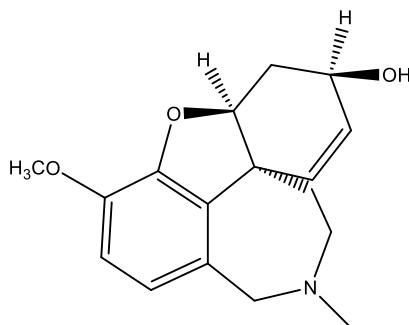


**Obrázek 15** – Struktura molekuly rivastigminu



Pravděpodobně nejznámější látkou je terciární alkaloid galantamin (Obrázek 16), který byl do klinické praxe zaveden v roce 2001 a jeho terapeutickou indikací je pouze symptomatická léčba mírné až středně těžké AD. Momentálně je na našem území používán ve formě hydrobromidu pod firemním názvem GALANTAMIN MYLAN<sup>®</sup>. Jedná se o selektivní reverzibilní opět kompetitivní inhibitor především AchE, inhibiční aktivita BchE je velmi malá.<sup>58</sup> Výhodou galantaminu je i jeho působení na nikotinové receptory, kdy se navázáním na alosterické vazební místo zvyšuje aktivita cholinergního systému, díky čemuž dochází ke zlepšení kognitivních funkcí u pacienta.<sup>54</sup> Dle studií dochází ke zpomalení rozvoje onemocnění až o 1 rok a jeho efekt může přetrvávat až po dobu 4 let.<sup>36</sup> Stejně jako rivastigmin, i galantamin působí především v částech mozku, které jsou postižené AD. Příčinou je to, že kompetitivní inhibitory AchE jsou závislé na koncentraci Ach. To znamená, že je méně pravděpodobné, že dojde k vazbě na enzymatické místo v oblastech, kde se nachází vysoké hladiny Ach. Zatímco v oblastech mozku, kde je Ach málo, což se týká i částí poškozených AD, dochází k větší vazbě inhibitorů na AchE.<sup>58</sup>

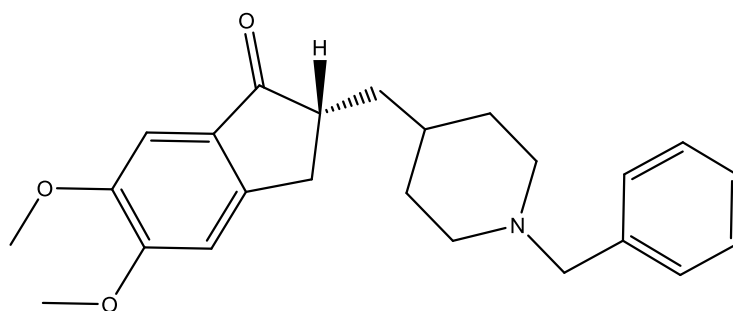
**Obrázek 16** – Struktura molekuly galantaminu



Donepezil (Obrázek 17), který byl uveden na trh v roce 1996, momentálně patří mezi nejúčinnější látky ze skupiny centrálních inhibitorů cholinesteras. Jedná se o specifický reverzibilní nekompetitivní inhibitor AchE, kterou inhibuje *in vitro* až 1000× účinněji než

enzym BchE, a zároveň zabraňuje ukládání  $\beta$ -amyloidových plaků v mozku, neutralizuje škodlivé volné radikály a celkově vykazuje neuroprotektivní vlastnosti.<sup>54</sup> V praxi se používá ve formě monohydrátu donepezil-hydrochloridu a je znám např. pod názvy ADONEP<sup>®</sup>, ALZIL<sup>®</sup>, ARICEPT<sup>®</sup>, DONEPEZIL ACCORD<sup>®</sup>, DONEPEZIL SANDOZ<sup>®</sup>, DONEPEZIL MYLAN<sup>®</sup>, DONPETHON<sup>®</sup>, DAREZIL<sup>®</sup>, DOSPELIN<sup>®</sup>, KOGNEZIL<sup>®</sup>, LANDEX<sup>®</sup>, NEPLA<sup>®</sup>, PROMEMORE<sup>®</sup>, YASNAL<sup>®</sup>. Stejně jako u galantaminu je jeho terapeutická indikace pouze léčba mírně až středně závažné AD. Jeho velkou výhodou je snadný přestup přes HEB, a tím vysoká biologická dostupnost a dlouhý poločas účinku, což umožňuje podávání pouze jednou denně.

**Obrázek 17** – Struktura molekuly donepezilu



Jak už bylo zmíněno výše, inhibitory cholinesteras jsou pacienti většinou velmi dobře snášeny a mají minimum nežádoucích účinků. Mezi nejčastěji objevující se, především u rivastigminu, patří zažívací potíže – zvracení, nevolnost, bolesti v oblasti břicha, průjem. Tyto problémy pak mohou vést k úbytku hmotnosti, v některých případech k anorexii. Proto je důležité u pacientů v průběhu terapie sledovat jejich hmotnost. Mezi další nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, srdeční arytmie, poruchy spánku, zmatenost a psychické poruchy.<sup>36</sup>

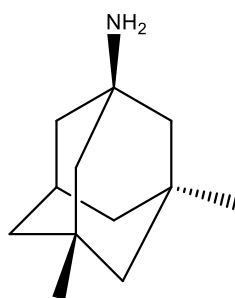
#### 4.6.5.2. Antagonisté NMDA receptorů

V terapii těžších stavů demencí se využívá blokáce NMDA receptorů, které jsou u pacientů trpících AD excesivně aktivovány přemírou excitačního neuromediátoru glutamátu. Tím se ulehčí přenos vzruchu v synapsi a obnoví se správná funkce neuronu.<sup>36</sup>

Momentálně jedinou v praxi používanou látkou z této skupiny je memantin (Obrázek 18). Jedná se o nekompetitivně blokující inhibitor NMDA receptorů, který zároveň působí proti tvorbě  $\beta$ -amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek tvořených  $\tau$  proteinem. Chemicky se jedná o derivát amantadinu, který se používá ve formě memantin-hydrochloridu

a je známý pod názvy AXURA<sup>®</sup>, COGNOMEM<sup>®</sup>, EBIXA<sup>®</sup>, MANTOMED<sup>®</sup>, MARIXINO<sup>®</sup>, MEMABIX<sup>®</sup>, MEMANTINE ACCORD<sup>®</sup>, MEMANTIN ZENTIVA<sup>®</sup>, MEMIXA, POLMATINE<sup>®</sup> a další. V České republice je jeho oficiální terapeutická indikace výhradně léčba středně těžké až těžké demence Alzheimerova typu. Podle klinických studií existují důležité rozdíly v účinnosti memantinu u mírné AD ve srovnání s účinností u středně těžké až těžké formy. U pacientů v pozdějších stádiích nemoci byl prokázán klinický přínos memantinu, ke kterému dochází bez ohledu na to, zda pacienti zároveň užívají inhibitory cholinesteras, ale skoro žádný přínos u lidí, kteří trpí mírnou formou AD. K prokázání účinnosti a bezpečnosti léčby memantinem u pacientů v mírných stádiích je potřeba definitivní dlouhodobé studie. V současné době důkazy hovoří proti tomuto postupu v terapii, i když podávání memantinu v dřívějších fázích AD patří do běžné praxe.<sup>59</sup>

**Obrázek 18** – Struktura molekuly memantinu

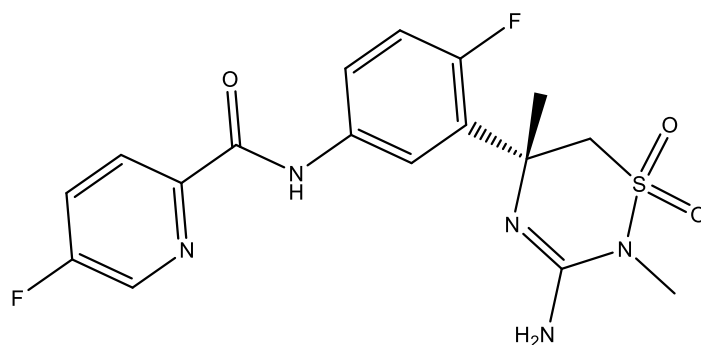


#### 4.6.5.3. Novinky v terapii Alzheimerovy nemoci

Vzhledem k tomu, že v současnosti stále neexistuje účinný lék, který by kompletně vyléčil AD, tak vědci po celém světě vyvíjí a zkoumají nejrůznější substance jako potencionální léčiva proti tomuto onemocnění. Momentálně kolem 20 z těchto látek podstupuje již třetí fázi klinického zkoušení. Většina nových molekul cílí na zabránění syntézy a snížení neurotoxicity již vzniklých  $\beta$ -amyloidových plaků. Jedná se např. o monoklonální látky proti tomuto bílkovinnému agregátu, inhibitory enzymů  $\beta$  a  $\gamma$ -sekretas, cholinesteras a monoamidooxidas, imunoterapie vůči  $\tau$  proteinu a látky ovlivňující jak serotoninové, tak nikotinové receptory.

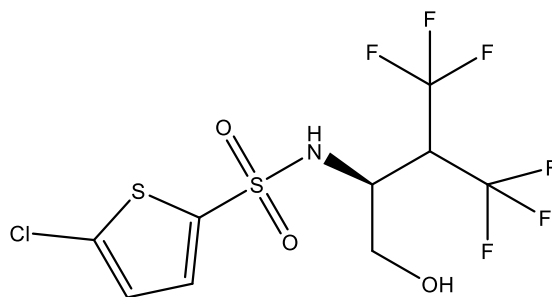
Mezi molekuly řadící se do skupiny inhibitorů enzymů  $\beta$ -sekretas (BACE I) patří i verubecestat (Obrázek 19), který vyniká především svými dobrými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Velmi nadějně působil i kvůli výbornému přechodu přes HEB, jednoduchému podávání ve formě per os tablet a slibné inhibici  $\beta$ -amyloidu. Bohužel klinická studie ve třetí fázi byla pozastavena z důvodu neprůkazné účinnosti.<sup>60</sup>

**Obrázek 19** – Struktura molekuly verubecestatu



Další klinické testování látek ze skupiny inhibitorů enzymu  $\gamma$ -sekretasy bylo pozastaveno kvůli mnoha závažným nežádoucím účinkům, z nichž nejvýznamnější byly hematotoxicita, gastrointestinální obtíže, změny v barvě vlasů pacientů a kožní reakce. Momentálně ale vzniká tzv. II. generace inhibitorů  $\gamma$ -sekretasy, která zatím vykazuje mnohem bezpečnější profil. Do této nové generace se řadí i selektivní inhibitor  $\gamma$ -sekretasy s názvem begacestat (Obrázek 20), díky kterému nedochází ke štěpení amyloidového prekurzorového proteinu, a který se prozatím jeví jako slibný potenciální lék na AD.<sup>61</sup>

**Obrázek 20** – Struktura molekuly begacestatu



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Potřebný materiál a pomůcky

#### 5.1.1. Rozpouštědla

- Amoniak (NH<sub>3</sub>), p. a. (Penta)
- Cyklohexan (cHx), p. a. (Penta)
- Dietylamin (DEA), p. a. (Penta)
- Ethanol (EtOH), p. a. (Penta)
- Ether (Et<sub>2</sub>O), p. a. (Penta)
- Etylacetát (EtOAc), p. a. (Penta)
- Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), p. a. (Penta)
- Methanol (MeOH), p. a. (Penta)
- Toluén (To), p. a. (Penta)

#### 5.1.2. Detekční činidla

- D1: Dragendorffovo činidlo

Tabulka 4: Příprava Dragendorffova činidla <sup>62</sup>		
Roztok A	Roztok B	Dragendorffovo činidlo pro postřík
1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého 20 g kyseliny vinné 80 ml vody	16 g jodidu draselného 40 ml vody	5 ml kyseliny vinné 50 ml vody
<b>Zásobní roztok</b>		5 ml zásobního roztoku
smíšené roztoky A a B v poměru 1 : 1		

#### 5.1.3. Vytvájecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

Izolace jednotlivých alkaloidů byla provedena pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC). Nejprve byla frakce HF-14 rozdělena pomocí směsi chloroformu, methanolu a amoniaku do šesti podfrakcí. Izolace z těchto podfrakcí probíhala pomocí dalších mobilních fází (MF) složených z amoniaku, chloroformu, methanolu, dietylaminu, etylacetátu,

toluenu a cyklohexanu. Přesné složení jednotlivých MF pro preparativní TLC je uvedeno v tabulce 5.

Při identifikaci izolovaných alkaloidů porovnáváním se standardy pomocí TLC byly využity MF složené z toluenu a dietylaminu; toluenu, methanolu a dietylaminu a v neposlední řadě z etylacetátu a dietylaminu. Přesné složení MF je uvedeno taktéž v tabulce 5.

<b>Tabulka 5: Složení mobilních fází pro TLC</b>		
<b>Mobilní fáze</b>		<b>Poměr</b>
MF-1	CHCl <sub>3</sub> : MeOH : NH <sub>3</sub>	85 : 15 : 0,25
MF-2	CHCl <sub>3</sub> : MeOH : NH <sub>3</sub>	60 : 40 : 0,25
MF-3	CHCl <sub>3</sub> : MeOH : NH <sub>3</sub>	70 : 30 : 0,25
MF-4	CHCl <sub>3</sub> : EtOAc : DEA	85 : 5 : 10
MF-5	CHCl <sub>3</sub> : EtOAc : DEA	60 : 30 : 10
MF-6	cHx : EtOAc : DEA	70 : 25 : 5
MF-7	To : EtOAc : DEA	70 : 25 : 5
MF-8	CHCl <sub>3</sub> : EtOAc : NH <sub>3</sub>	70 : 30 : 0,25
MF-9	EtOAc : DEA	9 : 1
MF-10	To : DEA	9 : 1
MF-11	To : MeOH : DEA	70 : 25 : 5

#### 5.1.4. Chromatografické absorbenty

- A1 – Sloupcová chromatografie – oxid hlinitý (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) deaktivovaný 6 % vody
- A2 – Komerčně vyráběné desky Silica gel 60 F<sub>254</sub> s UV indikátorem (Merck)
- A3 – Lité desky se silikagelem LS 5/40 UC<sub>254</sub>

#### 5.1.5. Přístroje

- Poloprovodní vakuová rotační odparka Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Vakuová rotační odparka Büchi Rotavapor R-114 (Büchi Labortechnik AG, Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlín, Německo)

## **5.2. Všeobecné postupy**

### **5.2.1. Destilace rozpouštědel**

Veškerá rozpouštědla použitá v této práci byla z důvodu čistoty předem destilována. Při destilaci byl nejdříve jímán destilační předek – cca 5 % a následně bylo destilováno zbylých 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v uzavřených lahvích za nepřístupu světla.

### **5.2.2. Extrakce**

Pro izolaci alkaloidů z výchozího biologického materiálu byla využita metoda extrakce. Pro snazší uvolnění látek a lepší výnosnost byl rostlinný materiál rozdrcen na jemnější části, a poté došlo za varu k extrakci EtOH (96% v/v) s následnou filtrací pro odstranění mechanických nečistot.

Primární ethanolický extrakt byl dále čištěn od nealkaloidních struktur a látek tukové povahy pomocí extrakce kapaliny kapalinou, kdy byl použit Et<sub>2</sub>O a CHCl<sub>3</sub> jako organická fáze. K rozdělení mezi organickou a vodnou fází docházelo dle acidobazických vlastností látek a ustálením lipofilně-hydrofilní rovnováhy.

### **5.2.3. Sloupcová chromatografie**

Sloupcová chromatografie byla provedena stupňovitou elucí na stacionární fázi tvořenou oxidem hlinitým (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Směs adsorbentu s rozpouštědlem byla nalita na chromatografickou kolonu obvyklým způsobem. Testovaný vzorek byl rozpuštěn v malém množství rozpouštědla a nanesen na kolonu.

### **5.2.4. Tenkovrstvá chromatografie**

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla uskutečněna vzestupně v předem nasycených skleněných komorách. Doba sycení komor mobilní fáze činila 15–20 minut pro analytickou TLC a 30–40 minut pro preparativní TLC. Po vyvinutí byl vzniklý chromatogram vysušen teplým, později studeným vzduchem a byla provedena detekce UV lampou, v druhé fázi reakcí s detekčním činidlem.

### **5.1.5. Odpařování rozpouštědel**

K odpařování rozpouštědel z jednotlivých frakcí byly využity 2 typy vakuových rotačních odparek – vakuová rotační odparka Büchi Rotavapor R-114 a poloprovodní vakuová rotační odparka Laborota 20 Heidolph. K odpařování docházelo za sníženého tlaku a teplotě 40°C.

### 5.1.6. Detekce alkaloidů

Detekce látek alkaloidní struktury na chromatogramech byla v první fázi prováděna expozicí chromatogramu paprskům UV<sub>254</sub> a následně byl použit roztok tetrajodbismutitanu známý pod názvem Dragendorffovo činidlo, který tvoří oranžově červenou sraženinu komplexní soli rozpouštědla a alkaloidu.<sup>63</sup>

## 5.3. Izolace

### 5.3.1. Biologický materiál pro izolaci

Pro izolaci alkaloidů byly použity čerstvé cibule rostliny *Hippeastrum* cv. Ferrari, které byly zakoupeny u firmy Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanickou identifikaci a ověření pravosti provedl prof. RNDr. Lubomír Opletal CSc. na Katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. V herbáriu fakulty byl dokladový vzorek uložen pod označením CUFPH-16130/AL-562.

### 5.3.2. Extrakce drogy a zpracování získaného extraktu

Čerstvé nasekané cibule (25 kg) rostliny *Hippeastrum* cv. Ferrari byly nasypány do Erlenmeyerovy baňky a 3× extrahovány ethanolem (EtOH 96% v/v) za varu na vodní lázni pod zpětným chladičem. Extrakce probíhala vždy po dobu 30 minut za občasného protřepání. Primární ethanolický extrakt byl zfiltrován a za sníženého tlaku odpařen do sucha pomocí rotační vakuové odparky. Tento odparek (425 g) byl rozpuštěn v 2% kyselině chlorovodíkové na pH 1,5–2, přefiltrován a následně byl přečištěn pomocí acidobazické extrakce kapaliny kapalinou za použití etheru a chloroformu. Po odstranění vodné fáze a odpaření organického rozpouštědla bylo získáno 29,46 g tmavě hnědého extraktu, který pozitivně reagoval tvorbou sraženiny s Dragendorffovým činidlem.<sup>6,13</sup>

### 5.3.3. Sloupcová chromatografie extraktu

Získaný alkaloidní extrakt byl dále rozdělen na jednotlivé podfrakce pomocí gradientové eluční sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs benzínu a CHCl<sub>3</sub> v různých poměrech a následně směs CHCl<sub>3</sub> a EtOH v různých poměrech. Jednotlivé frakce byly jímány v objemech 500 ml. Kolona byla nakonec propláchnuta MeOH obohaceným o 2% kyselinu octovou v poměru 99:1. Podmínky sloupcové chromatografie jsou uvedeny v Tabulce 6.



<b>Tabulka 6: Podmínky sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu<sup>13</sup></b>	
Hmotnost alkaloidního extraktu	29,46 g
Adsorbent	1200 g Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Mrtvý objem	1200 ml
Objem jímané frakce	500 ml

Během sloupcové chromatografie bylo získáno celkem 360 frakcí (500 ml každá frakce), později na podkladu analytické TLC byly látky spojeny do 21 částí, které byly následně analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Frakce s podobnými profily byly spojeny za vzniku finálních 15 frakcí – viz Tabulka 7. K izolaci alkaloidů v této práci byla použita frakce číslo 14 s názvem HF-14.

<b>Tabulka 7: Sloupcová chromatografie, přehled frakcí, použitých mobilních fází a výtěžků</b>			
<b>Frakce</b>	<b>Spojení frakcí</b>	<b>MF</b>	<b>Hmotnost v g</b>
1	4–17	CHCl <sub>3</sub> (100)	1,93
2	18–29	CHCl <sub>3</sub> (100)	2,91
3	30–56	CHCl <sub>3</sub> (100)	3,16
4	57–60	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	0,2
5	61–64	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	0,16
6	65–72	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	0,32
7	73–76	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	1,0
8	77–87	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	3,91
9	88–101	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1)	1,65
10	102–136	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (99 : 1) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2)	1,41
11	137–194	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (98 : 2) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95 : 5)	1,32

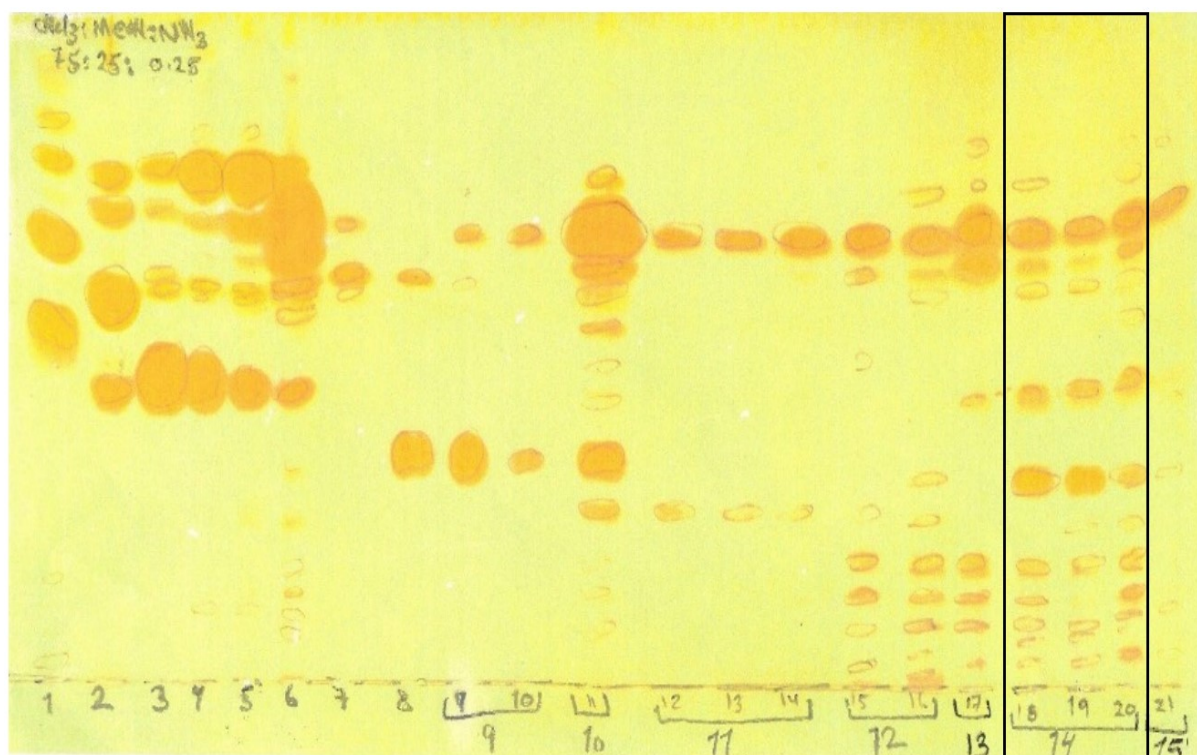
<b>Tabulka 7: Sloupcová chromatografie, přehled frakcí, použitých mobilních fází a výtěžků</b>			
<b>Frakce</b>	<b>Spojení frakcí</b>	<b>MF</b>	<b>Hmotnost v g</b>
12	195–319	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95 : 5) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90 : 10) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (85 : 15) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (80 : 20) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (75 : 25) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (70 : 30) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (65 : 35) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (60 : 40) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (55 : 45) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (50 : 50)	1,25
13	320–332	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (50 : 50) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (45 : 55)	0,26
14	333–355	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (35 : 65) CHCl <sub>3</sub> : EtOH (25 : 75) EtOH (100)	0,67
15	356–363	2% kys. octová v MeOH	2,55
<b>Celkem výtěžnost v g</b>			22,7

Vzhledem k tomu, že v rámci této diplomové práce byla zpracovávána pouze frakce HF-14, uvádí podrobnější informace o extrakci a izolaci MSc. Latifah Ajaj Al Shammari, která je zodpovědná za celou extrakci látek z drogy, v rámci své disertační práce s názvem „Alkaloids of the genus *Hippeastrum* (Amaryllidaceae): isolation, identification, biological activity“<sup>13</sup>.

#### 5.3.4. Izolace alkaloidů z frakce HF-14

Za účelem izolace alkaloidů v čistém stavu byla v této diplomové práci použita frakce HF-14, která je zvýrazněna na Obrázku 21.

**Obrázek 21** – Kontrolní analytické TLC všech 15 frakcí, které byly získány sloupcovou chromatografií. Zvýrazněná je frakce 14, která byla dále zpracovávána v této diplomové práci.

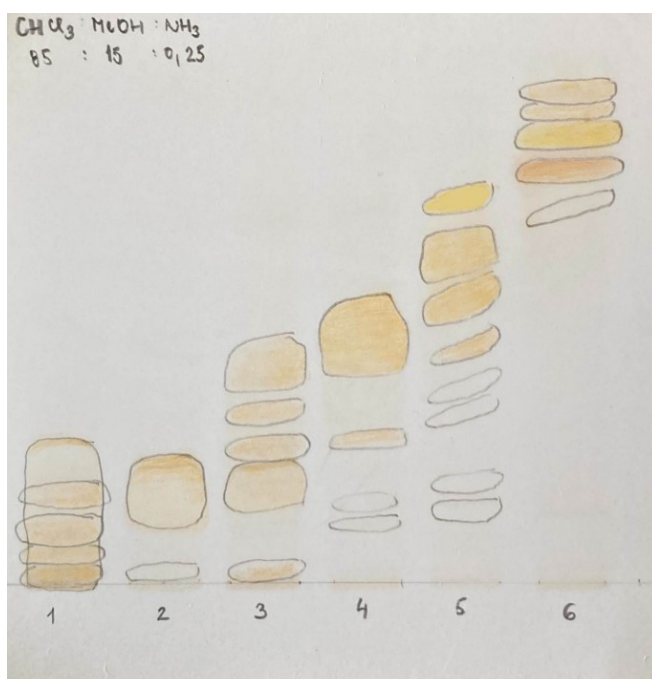


Směs látek o celkové hmotnosti 670 mg byla dokonale rozpuštěna v malém množství směsi EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1) a za pomoci chromatografického pera byla kvantitativně přenesena na 19 litých desek (přibližně 0,035 g množství vzorku na desku). Tyto desky byly postupně 2× vyvíjeny v MF-1. Mobilní fáze byla zvolena na základě předchozí analytické TLC, kdy MF-1 nejlépe dělila látky obsažené v dané frakci. Po vyvinutí byly desky důkladně vysušeny a byla provedena detekce UV lampou, v druhé fázi reakcí s Dragendorffovým činidlem. Na podkladu vzdálenosti středů jednotlivých skvrn od startu byly látky rozděleny do 6 zón 14/1–6. Každá zóna alkaloidů byla společně se silikagelem separována a stejné zóny z jednotlivých desek byly spojeny. Látky byly vymyty z adsorbentu smícháním s křemelinou a následnou filtrací na kolonci pomocí roztoku EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1), který byl posléze odpařen pomocí vakuové odparky. Extrakty byly kvantitativně převedeny do jednotlivých baněk, vysušeny do sucha a zváženy. Hmotnosti jednotlivých frakcí jsou uvedeny v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Podfrakce získané rozdělením původní frakce HF-14 a jejich hmotnosti

Označení podfrakce	Hmotnost v mg
14/1	188,4
14/2	150,5
14/3	95,6
14/4	94,0
14/5	45,2
14/6	47,3
<b>Celková výtěžnost</b>	<b>621,0</b>

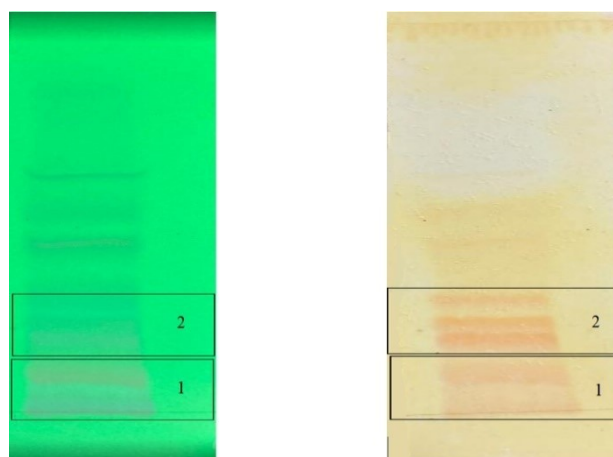
**Obrázek 22** – Kontrolní chromatogram šesti podfrakcí, které byly vytvořeny dělením frakce HF-14.



#### 5.3.4.1. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/1

Vzorek HF-14/1 o hmotnosti 188,4 mg byl rozpuštěn v malém množství směsi EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1), postupně nanesen na 5 litých chromatografických desek a následně podroben preparativní TLC za použití MF-2. Na základě detekce pomocí UV světla a Dragendorffova činidla byla frakce rozdělena na 2 zóny (14/1/1, 14/1/2), (Obrázek 23).

**Obrázek 23** – Chromatogram frakce 14/1 se zvýrazněním dvou hlavních zón



Frakce 14/1/2 byla opakovaně dělena preparativní TLC pomocí MF-2 za vzniku několika menších podfrakcí, z nichž nejdůležitější byla 14/1/2/1, která se dle TLC jevila jako čistá alkaloidní látka. Tento extrakt byl následně krystalizován ze směsi  $\text{CHCl}_3$  : EtOH v poměru 1 : 1, čím bylo získáno 49,4 mg světle hnědých krystalů, které byly podrobeny GC/MS analýze. Ostatní látky frakce 14/1/2 se nepodařilo izolovat v čistém stavu.

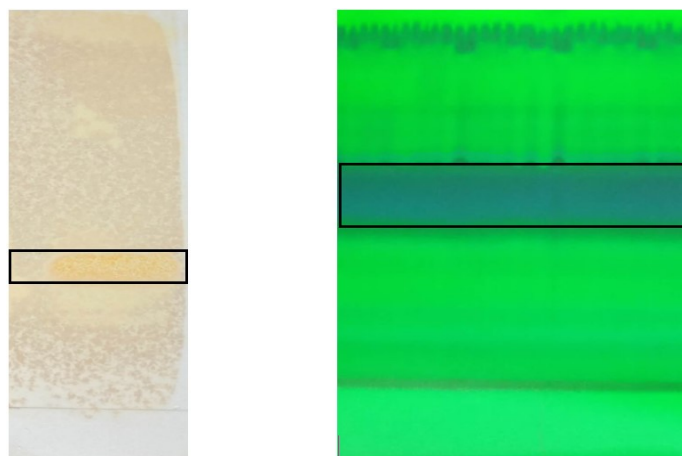
Dále byla zpracovávána dolní zóna s označením 14/1/1, která původně jevila přítomnost dvou látek alkaloidní struktury. Po provedení analytické TLC za pomoci MF-3 bylo zjištěno, že se jedná o směs velkého množství látek, které se nepodařilo izolovat v čistém stavu v dostatečně velkém množství k identifikaci.

Vzhledem k tomu, že látka 14/1/2/1 je jedinou látkou izolovanou z frakce 14/1, bude dále v diplomové práci zmiňována pod označením HF-14/1.

#### **5.3.4.2. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/2**

Frakce HF-14/2 o celkové hmotnosti 150,5 mg byla rozpuštěna v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1) a kvantitativně nanášena pomocí chromatografického pera na 4 lité desky. Vyvíjení desek probíhalo 2× v MF-3, která byla dopředu stanovena na základě analytické TLC. Podle detekce pod UV lampou a Dragendorffovým činidlem byla vyškrábána jedna hlavní zóna (Obrázek 24), která byla přečištěna následujícím způsobem. Výškrab byl smíchán s malým množstvím křemeliny, eluován směsí EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1), která byla poté odpařena na vakuové odparce do sucha. Bylo získáno celkem 73,8 mg alkaloidní látky s označením HF-14/2, která byla později podrobena GC/MS analýze.

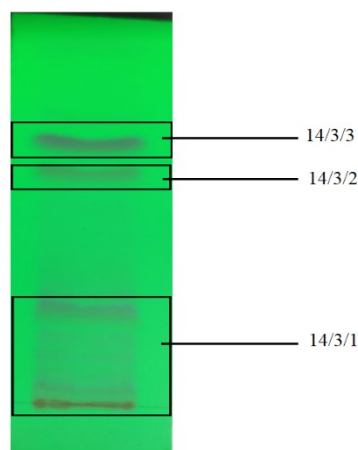
**Obrázek 24** – Chromatogram frakce 14/2 se zvýrazněním hlavní zóny



#### 5.3.4.3. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/3

Frakce HF-14/3 o celkové hmotnosti 95,6 mg byla rozpuštěna v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a  $\text{CHCl}_3$  (1 : 1) a kvantitativně nanesena pomocí chromatografického pera na 4 desky s adsorbentem A2 (přibližně 25 mg množství vzorku na desku). Desky byly 2× vyvíjeny v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou se jevila směs MF-4. Na podkladě detekce UV lampou a Dragendorffovým činidlem byly izolovány 3 zóny (14/3/1–3), které byly dále zpracovávány.

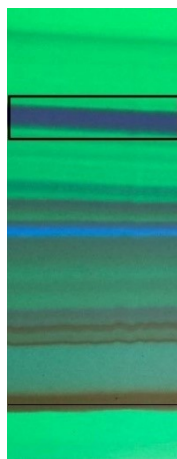
**Obrázek 25** – Chromatogram frakce 14/3 se zvýrazněním hlavních tří zón



Podfrakce 14/3/1, o hmotnosti 49,7 mg, která byla složena z většího množství různých druhů alkaloidních látek, byla podrobena další preparativní TLC s adsorbentem A2 za použití MF-4. Dále byla zpracovávána pouze jedna hlavní zóna (Obrázek 26), která byla vyškrábána

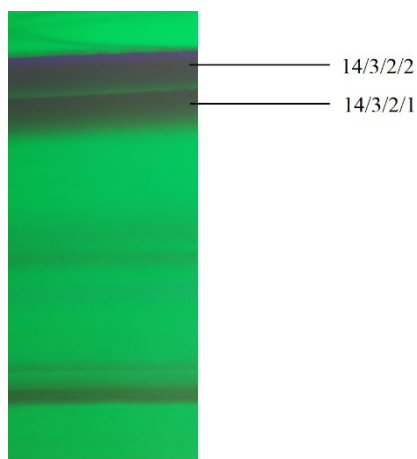
a vymyta z adsorbentu pomocí směsi EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1), jež byla následně odpařena. Bylo získáno celkem 7,2 mg látky 14/3/A, která byla později podrobena GC/MS analýze.

**Obrázek 26** – Chromatogram frakce 14/3/1 se zvýrazněním hlavní zóny



Podfrakce 14/3/2, o hmotnosti 24,4 mg, byla podrobena další preparativní TLC s předpokladem, že se jedná o jedinou látku alkaloidní struktury. Podfrakce byla rozpuštěna v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a kvantitativně nanášena pomocí chromatografického pera na 2 desky s adsorbentem A2. Desky byly 2× vyvíjeny v MF-5 a poté dokonale vysušeny. Po detekci UV lampou a Dragendorffovým činidlem bylo zjištěno, že se jedná o směs několika látek alkaloidní struktury, které byly rozděleny do hlavních dvou zón s názvem 14/3/2/1–2 (Obrázek 27) a následně vyškrábány, zbaveny adsorbentu a dále zpracovávány.

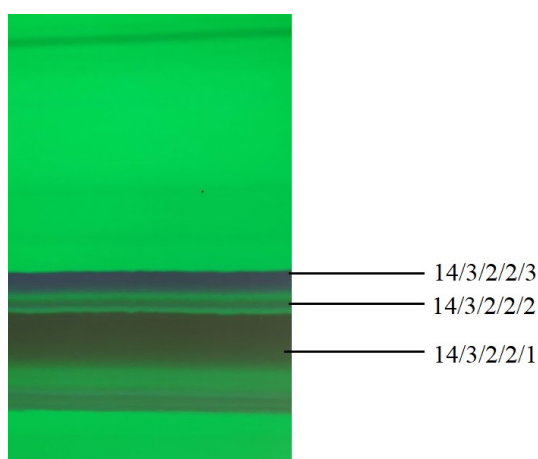
**Obrázek 27** – Chromatogram frakce 14/3/2 se zvýrazněním hlavních dvou zón



Podfrakce 14/3/2/1 byla podrobena analytické TLC za použití adsorbentu A2 a MF-5, kdy po detekci Dragendorffovým činidlem bylo zjištěno, že se jedná o čistou látku alkaloidní struktury. Bylo získáno celkem 7,9 mg látky s označením 14/3/B, která byla později poslána na GC/MS analýzu.

Podfrakce 14/3/2/2 byla rozpuštěna v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a kvantitativně nanášena pomocí chromatografického pera na 1 desku s adsorbentem A2. Desky byly 2× vyvíjeny v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou se jevila směs MF-6. Na podkladě detekce UV lampou a Dragendorffovým činidlem byly izolovány 3 zóny s názvem 14/3/2/2/1–3 (Obrázek 28), které byly dále podrobeny analytické TLC, aby bylo prokázáno, že se jedná o čisté látky. Mobilní fáze použité při analytické TLC pro jednotlivé zóny jsou uvedeny v Tabulce 9.

**Obrázek 28** – Chromatogram frakce 14/3/2/2 se zvýrazněním hlavních tří zón



<b>Tabulka 9:</b> Mobilní fáze použité k analytické TLC zón 14/3/2/2/1–3			
Zóna	Název MF	Složení mobilní fáze	Poměr
14/3/2/2/1	MF-7	To : EtOAc : DEA	70 : 25 : 5
14/3/2/2/2	MF-7	To : EtOAc : DEA	70 : 25 : 5
14/3/2/2/3	MF-6	cHx : EtOAc : DEA	70 : 25 : 5

Na základě analytické TLC a následné detekce pomocí Dragendorffova činidla bylo zjištěno, že se jedná o čisté látky alkaloidní struktury, které byly později poslány na GC/MS analýzu. Označení a hmotnosti jednotlivých látek jsou uvedeny v Tabulce 10.



<b>Tabulka 10:</b> Látky izolované z podfrakce 14/3/2/2		
Zóna	Označení látky	Hmotnost (mg)
14/3/2/2/1	14/3/C	8,2
14/3/2/2/2	14/3/D	2,0
14/3/2/2/3	14/3/E	1,7

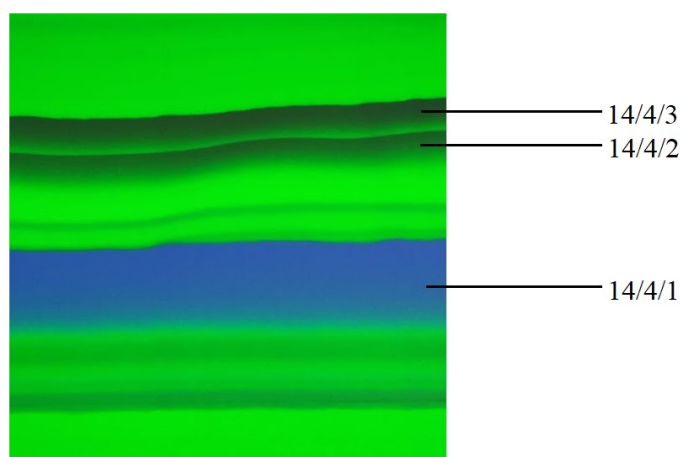
Podfrakce 14/3/3, o hmotnosti 5,2 mg, byla podrobena preparativní TLC s předpokladem, že se jedná o jedinou látku alkaloidní struktury. Extrakt byl rozpuštěn v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a kvantitativně nanesen pomocí chromatografického pera na ½ desky s adsorbentem A2. Deska byla 2× vyvíjena v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou se jevila směs MF-6. Na podkladě detekce UV lampou byla zjištěna přítomnost minimálně čtyř látek, z nichž pouze jedna pozitivně reagovala s Dragendorffovým činidlem za vzniku oranžové sraženiny. Tato látka byla vyškrábána, zbavena adsorbentu, dokonale vysušena a zvážena. Celkem bylo získáno 2,2 mg látky označením 14/3/F. V Tabulce 11 jsou uvedeny všechny látky izolované z frakce HF-14/3.

<b>Tabulka 11:</b> Přehled podfrakcí, které vznikly dělením frakce HF-14/3 a z nich izolované alkaloidní látky					
Frakce	Podfrakce		<b>Izolovaná látka</b>	Hmotnost látky (mg)	
HF-14/3	14/3/1		14/3/A	7,2	
	14/3/2	14/3/2/1		14/3/B	7,9
		14/3/2/2	14/3/2/2/1	14/3/C	8,2
			14/3/2/2/2	14/3/D	2,0
			14/3/2/2/3	14/3/E	1,7
	14/3/3		14/3/F	2,2	

#### 5.3.4.4. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/4

Vzorek HF-14/4 o hmotnosti 94,0 mg byl dokonale rozpuštěn v malém množství směsi EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a postupně nanesen na 4 chromatografické desky za použití adsorbentu A2. Desky byly 2× vyvíjeny v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou se jevila směs MF-8. Na základě detekce pomocí UV světla a Dragendorffova činidla byla frakce rozdělena na 3 zóny s označením 14/4/1–3 (Obrázek 29), které byly následně vyškrábány a dle postupu uvedeného výše zbaveny silikagelu.

**Obrázek 29:** Chromatogram frakce 14/4 se zvýrazněním hlavních tří zón



Pro kontrolu čistoty izolovaných látek byla provedena analytická TLC na adsorbentu A2 za použití MF-8. Látky 14/4/1 a 14/4/3 se po detekci UV zářením a Dragendorffovým činidlem jevíly jako čisté látky alkaloidní struktury. Zóna 14/4/2 obsahovala směs více látek, proto byla znovu provedena preparativní TLC za stejných podmínek jako u předchozí TLC. Ze zóny 14/4/2 se bohužel nepodařilo izolovat alkaloidní látky v čistém stavu v dostatečně velkém množství k identifikaci. Tabulka 12 uvádí látky izolované z frakce HF-14/4 a jejich množství.

<b>Tabulka 12:</b> Látky izolované z frakce HF-14/4		
Zóna	Označení látky	Hmotnost (mg)
14/4/1	14/4/1	33,1
14/4/3	14/4/3	11,1

#### 5.3.4.5. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/5

Vzorek HF-14/5 o hmotnosti 45,2 mg byl dokonale rozpuštěn v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a postupně nanesen na 2 chromatografické desky za použití adsorbentu A2. Desky byly vyvíjeny v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou byla MF-1. Na základě detekce pomocí UV světla a Dragendorffova činidla bylo zjištěno, že frakce obsahuje směs velkého množství látek alkaloidní struktury. Dvě nejvýraznější zóny 14/5/1 a 14/5/2 byly vyškrábány a dle postupu uvedeného výše zbaveny adsorbentu. Po provedení analytické TLC na adsorbentu A2 za použití MF-4 se oba alkaloidy jevily jako čisté látky. Tabulka 13 uvádí látky izolované z frakce HF-14/5 a jejich množství.

<b>Tabulka 13:</b> Látky izolované z frakce HF-14/5		
Zóna	Označení látky	Hmotnost (mg)
14/5/1	14/5/1	1,6
14/5/2	14/5/2	1,4

#### 5.3.4.6. Izolace alkaloidů z frakce HF-14/6

Vzorek HF-14/6 o hmotnosti 47,3 mg byl dokonale rozpuštěn v malém množství rozpouštědla složeného z EtOH a CHCl<sub>3</sub> (1 : 1) a postupně nanesen na 2 chromatografické desky za použití adsorbentu A2. Desky byly 3× vyvíjeny v MF, která byla předem určena analytickou TLC, kdy nejvhodnější vyvíjecí soustavou byla směs MF-9. Po detekci UV zářením a Dragendorffovým činidlem bylo zjištěno, že se jedná o směs velkého množství látek, a nebylo proto možné izolovat alkaloidy v čistém stavu v dostatečném množství potřebného k identifikaci.

<b>Tabulka 14:</b> Přehled všech látek izolovaných z frakce HF-14		
	Označení látky	Hmotnost (mg)
1	14/1	49,4
2	14/2	73,8
3	14/3/A	7,2
4	14/3/B	7,9
5	14/3/C	8,2

<b>Tabulka 14: Přehled všech látek izolovaných z frakce HF-14</b>		
Označení látky		Hmotnost (mg)
6	14/3/D	2,0
7	14/3/E	1,7
8	14/3/F	2,2
9	14/4/1	33,1
10	14/4/3	11,1
11	14/5/1	1,6
12	14/5/2	1,4

## 5.4. Identifikace získaných látek

### 5.4.1. GC/MS analýza

Pro základní predikci chemických struktur všech izolovaných alkaloidů byla provedena GC/MS analýza pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracujícího s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. K separaci byla použita kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA) a teplotní program 100 °C – 180 °C (25 min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C, kdy byl nastříknut 1 μl methanolického roztoku sumárního extraktu s koncentrací 1 μg/μl při splitu 1 : 10.

Alkaloidy byly následně identifikovány porovnáním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), s daty publikovanými v literatuře a se standardy látek již izolovaných naší laboratoří.

### 5.4.2. Porovnávání alkaloidů za využití analytické TLC

Pro potvrzení předpokládané struktury izolovaných alkaloidů byla využita analytická TLC, kdy došlo k vyvíjení izolovaného alkaloidu a standardu předpokládané struktury ve vhodných MF za použití adsorbentu A2. Po dokonalém vysušení teplým, později studeným vzduchem byla provedena detekce UV lampou, v druhé fázi reakcí s Dragendorffovým činidlem a došlo k porovnání alkaloidů na podkladu vzdálenosti středů jednotlivých skvrn od startu.

### 5.4.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Struktura izolovaných alkaloidů byla určena také pomocí spektrometru VNMR S500 pracujícího o frekvenci 499,87 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro  $^{13}\text{C}$ . Vzorek izolované látky byl rozpuštěn v deuteriochloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) a měření probíhalo při teplotě 25 °C. Spektrum udávaly chemické posuny zaznamenávané jako  $\delta$  hodnoty v pars per milion (ppm), které jsou nepřímo vztaženy k vnitřnímu standardu, jež byl tetrametylsilan (TMS; 7,26 ppm) v  $^1\text{H}$  spektru, nebo k signálu solventu (77,0 ppm) v  $^{13}\text{C}$  spektrech. Měřením získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun ( $\delta$ ), integrovaná intenzita spekter  $^1\text{H}$  NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

### 5.4.4. Optická otáčivost

Stanovení optické otáčivosti bylo provedeno na polarimetru P3000 při teplotě 25 °C. K měření byly použity chloroformové roztoky daných alkaloidů. Specifická otáčivost byla poté vypočtena dle následujícího vzorce:

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

$t$  = teplota měření [°C],

$D$  = D-linie sodíkového světla ( $\lambda = 589,3$  nm),

$\alpha$  = naměřený úhel otočení [°],

$c$  = koncentrace měřeného alkaloidu [ $\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ],

$l$  = délka kyvety [dm].

## 5.5. Testování biologické aktivity

### 5.5.1. Pufry

- P1 – 100mM Fosfátový pufr, pH 7,4

### 5.5.2. Chemikálie

- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (5mM roztok) v P1, (DTNB), (Sigma-Aldrich, Praha)
- Acetylthiocholin jodid (10mM roztok) v  $\text{H}_2\text{O}$ , (Sigma-Aldrich, Praha)
- Butyrylthiocholin jodid (10mM roztok) v  $\text{H}_2\text{O}$ , (Sigma-Aldrich, Praha)
- Dimetylsulfoxid (DMSO), p. a. (Sigma-Aldrich, Praha)

### 5.5.3. Materiál

- AchE – připravena rekombinantní technologií
- BchE – připravena rekombinantní technologií

### 5.5.4. Přístroje

- Reader Synergy™ HT MultiDetection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA)

### 5.5.5. Stanovení *in vitro* inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

#### 5.5.5.1. Příprava rekombinantních enzymů

Enzymy byly připraveny rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty Univerzity Hradec Králové. V čas potřeby se médium obsahující enzymy naředí pufrém P1 takovým způsobem, aby hodnota absorbance byla v rozmezí 0,08–0,15 pro AchE a 0,15–0,20 pro BchE. Následně je médium pomocí pipety rozděleno do jednotlivých mikrozkušavek a uchováno do doby použití v mrazu při teplotě -22 °C.

#### 5.5.5.2. Vlastní stanovení inhibiční aktivity

Při stanovení inhibiční aktivity AchE a BchE byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [ $\lambda = 412$  nm (pro AchE i BchE)]. Enzymová aktivita byla stanovena měřením zvýšení absorbance při 37 °C v minutových intervalech pomocí přístroje Reader Synergy™ HT MultiDetection Microplate Reader (BioTek, USA). Měření vzorku dané koncentrace proběhlo vždy 3×. Naměřená data byla použita k výpočtu procent inhibice (% I) podle vzorce:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}\right) \times 100 [\%]$$

$\Delta A_i$  označuje změnu absorbance způsobenou cholinesterasou vystavenou AChEI a  $\Delta A_0$  označuje změnu absorbance způsobenou cholinesterasou, kdy byl použit fosfátový pufr místo roztoku AChEI. Inhibiční účinnost testovaných látek byla vyjádřena jako hodnota  $IC_{50}$ , která vyjadřuje koncentraci inhibitoru způsobující 50% inhibici cholinesterasy. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity AchE nebo BchE nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 5.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky jsou porovnány s hodnotami  $IC_{50}$  známých inhibitorů cholinesteras (galantaminem, eserinem a huperzinem A).

Prvním krokem stanovování inhibiční aktivity je stanovení aktivity enzymů, kdy se do mikrotitračních destiček napipetuje 8,3  $\mu\text{l}$  média enzymu, 283  $\mu\text{l}$  5 mM DTNB, 8,3  $\mu\text{l}$  DMSO, důkladně se promíchá na mikrotřepače po dobu 1 minuty a nechá se inkubovat v komoře readeru po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Následně se přidá 33,3  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu – acetylthiocholinjodidu nebo butyrylthiocholinjodidu a změří se výsledná absorbance při příslušné vlnové délce. Obvyklým způsobem byl poté vypočten rozdíl a stanoven průměr se směrodatnou odchylkou.

V dalším kroku se stanovuje aktivita izolovaných látek, kdy se použijí stejné objemy činidel a substrátu (6 řad po 3 jamkách) a měření probíhá za stejných podmínek. Poslední, 6. řada, se používá jako slepý vzorek, kdy obsahuje pouze DMSO. Získané inhibiční aktivity  $\text{IC}_{50}$  AchE a  $\text{IC}_{50}$  BchE pro jednotlivé látky se porovnají s inhibičními aktivitami referenčních látek, které jsou uvedeny v Tabulce 15.

<b>Tabulka 15:</b> $\text{IC}_{50}$ AchE a $\text{IC}_{50}$ BchE referenčních látek		
Látka	$\text{IC}_{50}$ AchE ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ BchE ( $\mu\text{M}$ )
Galantamin	2,01 $\pm$ 0,14	33,69 $\pm$ 2,66
Eserin	0,20415 $\pm$ 0,009294	0,30015 $\pm$ 0,012185
Huperzin A	0,04487 $\pm$ 0,0067	-

#### 5.5.6. Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase (POP) *in vitro*

Inhibiční aktivita POP byla měřena ve spolupráci s Katedrou toxikologie a Fakultou vojenského zdravotnictví pro oblast farmacie, Univerzity obrany. Podrobnosti jsou uvedeny v práci s názvem „Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer’s Disease“ od autorů Hostalkova A. et al.<sup>64</sup>

#### 5.5.7. Stanovení cytotoxicity *in vitro*

Stanovení cytotoxického působení izolovaných alkaloidů bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze a Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Podrobnosti jsou uvedeny v publikacích Doskočil et al. (2015)<sup>65</sup> a Havelek et al. (2017)<sup>66</sup>.

### **5.5.8. Stanovení aktivity vůči plazmodiím *in vitro***

*In vitro* inhibiční aktivita vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei* byla měřena PharmDr. Kateřinou Breiterovou Ph.D. ve spolupráci s výzkumníky z Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu v rámci Erasmus+ stáže. Úplný popis postupu stanovení aktivity a zacházení s komáry je uveden v publikaci Ploemen et al. (2009).<sup>67</sup>



## 6. VÝSLEDKY

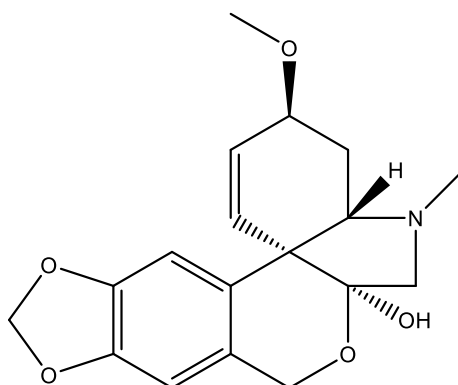
### 6.1. Strukturní analýza izolovaných látek

Všechny izolované látky byly poslány na GC/MS analýzu pro základní predikci chemických struktur. U látek s označením 14/3/B, 14/3/D, 14/3/E, 14/3/F, 14/5/1, 14/5/2 bylo zjištěno, že se nejedná o čisté látky a kvůli malému množství už dále nebyly zpracovávány. Alkaloidy 14/1, 14/2, 14/3/A, 14/3/C, 14/4/1, 14/4/3 se jevily jako čisté látky, proto byly dále identifikovány srovnávací analytickou TLC, pomocí NMR a měření optické otáčivosti.

#### 6.1.1. HF/14/1: Tazetin

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid tazetinového strukturního typu tazetin.

**Obrázek 30:** Struktura molekuly tazetinu



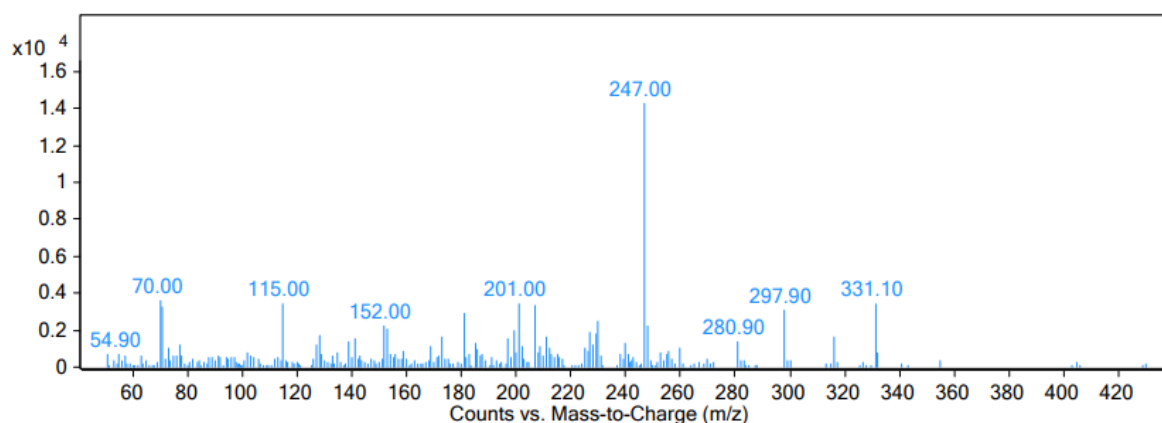
**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>

**Molekulová hmotnost:** 331,37

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{25} = +164.0^\circ$

**MS analýza m/z (%):** 331 (25), 298 (23), 247 (100), 230 (15), 207 (20), 201 (20), 181 (20), 115 (20)

**Obrázek 31:** MS analýza tazetinu



**NMR analýza:**

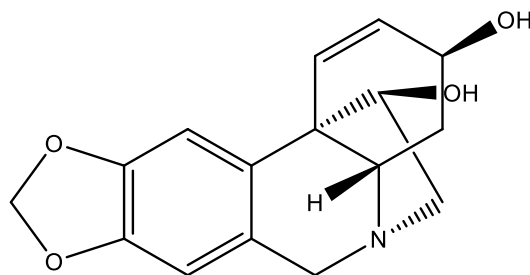
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.86 (1H, s, H-12), 6.50 (1H, s, H-9), 6.14 (1H, dt, *J* = 10.4, 1.4 Hz, H-2), 5.90 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 5.61 (1H, dt, *J* = 10.4, 1.8 Hz, H-1), 4.96 (1H, dd, *J* = 14.7, 0.5 Hz, H-8), 4.63 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, H-8), 4.11-4.17 (1H, m, H-3), 3.46 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.30 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, H-6), 2.85-2.89 (1H, m, H-6a), 2.68 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, H-6), 2.40 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.19–2.27 (1H, m, H-4), 1.63 (1H, ddd, *J* = 13.7, 10.1, 2.4 Hz, H-4).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.6, 146.4, 130.6, 128.7, 128.0, 125.5, 109.3, 104.0, 102.0, 100.9, 72.9, 70.0, 65.5, 62.0, 56.1, 49.9, 42.0, 26.7

**6.1.2. HF/14/2: 11-hydroxyvitatin**

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid hemanthaminového strukturního typu 11-hydroxyvitatin.

**Obrázek 32:** Struktura molekuly 11-hydroxyvitatinu



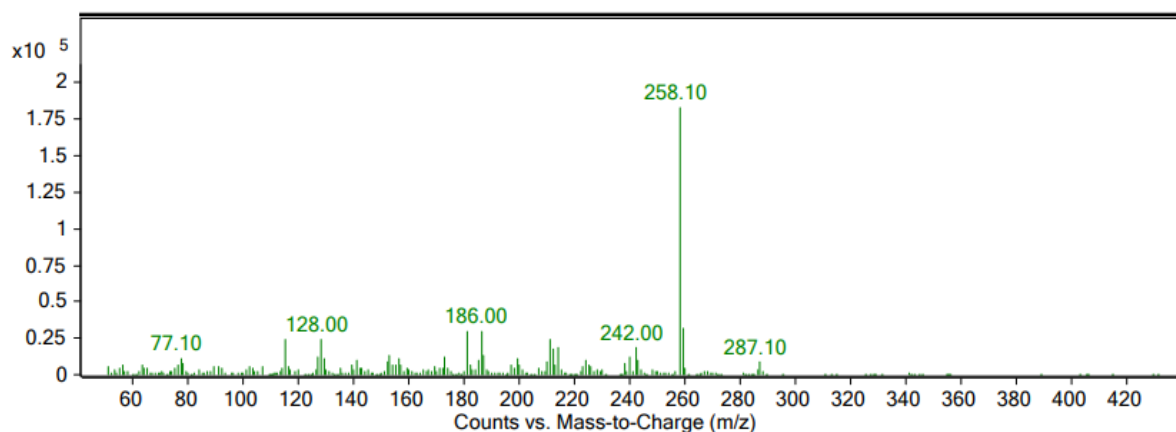
**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 287,31

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{25} = +20.0^\circ$

**MS analýza m/z (%):** 287(5), 259 (20), 258 (100), 242 (10), 214 (10), 212 (10), 211 (13), 186 (16), 181 (16), 128 (13), 115 (13)

**Obrázek 33:** MS analýza 11-hydroxyvitatinu



**NMR analýza:**

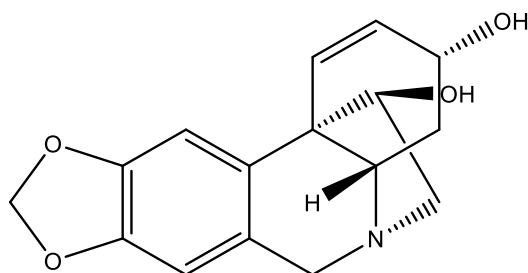
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.85 (1H, s), 6.48 (1H, s), 6.41 (1H, d,  $J = 10.3$  Hz), 6.36 (1H, dd,  $J = 10.3$  Hz,  $J = 4.9$  Hz), 5.92–5.90 (2H, m), 4.42–4.38 (1H, m), 4.32 (1H, d,  $J = 17.1$  Hz), 4.01–3.98 (1H, m), 3.69 (1H, d,  $J = 17.1$  Hz), 3.43–3.36 (2H, m), 3.26 (1H, dd,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 2.26 (1H, td,  $J = 14.0$  Hz,  $J = 4.4$  Hz), 1.95–1.90 (1H, m)

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 146.5, 146.3, 135.1, 134.2, 126.9, 126.7, 106.9, 103.2, 100.9, 80.1, 64.2, 63.5, 62.3, 61.4, 50.1, 32.3

### 6.1.3. HF/14/3/A: Hamayn

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR, TLC identifikace) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid hemanthaminového strukturního typu hamayn.

**Obrázek 34:** Struktura molekuly hamaynu



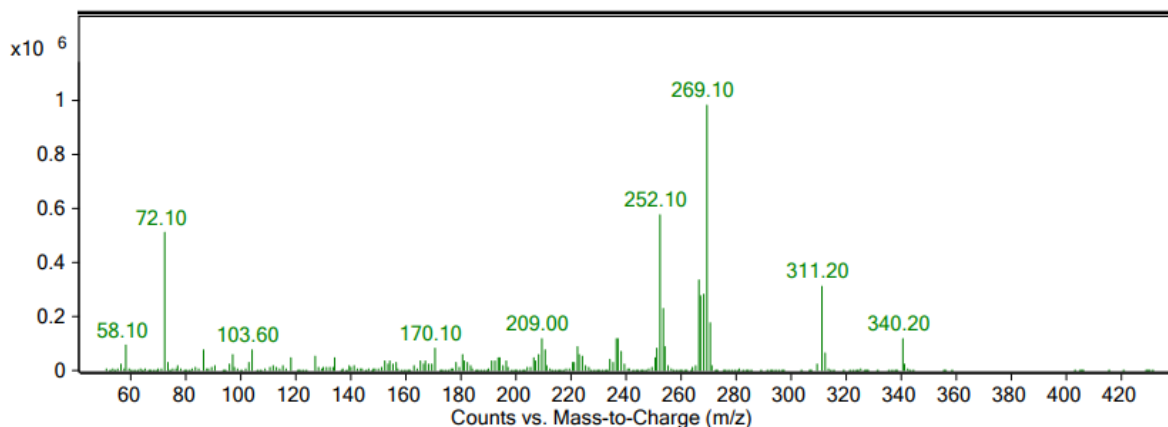
**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 287,32

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{25} = +43.0^\circ$

**MS analýza m/z (%):** 311 (32), 270 (18), 269 (100), 268 (29), 267 (28), 266 (34), 253 (23), 252 (59), 209 (12)

**Obrázek 35:** MS analýza hamaynu



**NMR analýza:**

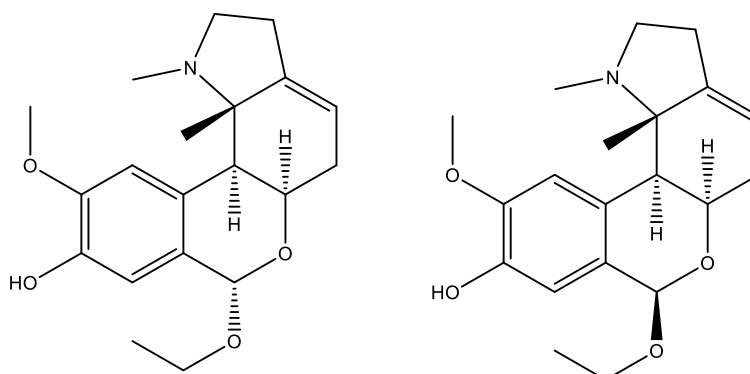
**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.10 (2H, m, H-4), 3.25 (1H, dd,  $J = 13.5, 4.5$  Hz, H-4a), 3.35 (2H, m, H-12), 3.65 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 4.00 (1H, m, H-11), 4.30 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-6 $\beta$ ), 4.35 (1H, m, H-3), 5.90 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.19 (2H, s, H-1 a H-2), 6.47 (1H, s, H-7). 6.81 (1H, s, H-10)

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 33.2, 49.8, 60.5, 63.0, 65.6, 67.0, 79.5, 101.0, 103.3, 106.8, 122.9, 125.2, 135.4, 137.4, 146.3, 146.8<sup>68</sup>

#### 6.1.4. HF/14/3/C: 9-*O*-demetyl-7-*O*-etyllykorenin

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako směs diastereomerů 9-*O*-demetyl-7-*O*-etyllykoreninu (homolykorinový strukturní typ) v poměru 5:6 (pravděpodobně *C7* epimery). Vzhledem k malému množství frakce dále nebyla zpracovávána.

**Obrázek 36:** Struktura molekul *C7* epimerů 9-*O*-demetyl-7-*O*-etyllykoreninu



**Sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 345,44

**NMR analýza:**

**Směs stereoizomerů:**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.12 (s, 1H, **B**), 7.00 (s, 1H, **A**), 6.87 (s, 1H, **B**), 6.86 (s, 1H, **A**), 5.76 (s, 1H, **B**), 5.61 (s, 1H, **A**), 5.55 – 5.49 (m, 1H, =CH, **A+B**), 4.34 (d, *J*=5.6 Hz, 1H, OCH, **A**), 4.15 – 4.10 (m, 1H, OCH, **B**), 3.96 – 3.83 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>, **A+B**) 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>, **B**), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>, **A**), 3.75 – 3.65 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>, **A+B**), 3.42 – 3.32 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>, **B**), 3.32 – 3.21 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>, **A**, 1H, NCH, **B**), 2.90-2.81 (m, 1H, NCH, **A**), 2.69-2.50 (1H, CH, **A+B**, 3H, CH<sub>2</sub>, **A+B**), 2.45-2.29 (1H, NCH<sub>2</sub>, **A+B**, 1H, CH<sub>2</sub>, **A+B**), 2.23 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, **B**), 2.17 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, **A**), 1.28 (t, *J*=7.1 Hz, CH<sub>3</sub>, **A+B**).

**Stereoizomer A:**

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.2, 145.2, 139.7, 129.5, 126.7, 116.3, 113.4, 112.0, 97.1, 67.8, 66.6, 63.5, 56.7, 56.2, 44.2, 43.5, 31.6, 28.0, 15.4

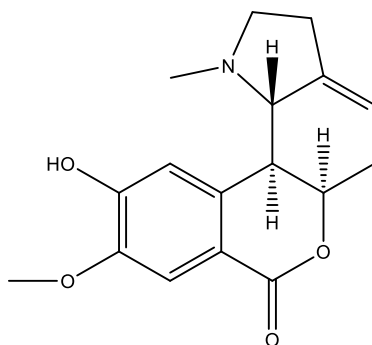
## Stereoizomer B

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  146.17, 145.2, 138.9, 130.0, 127.1, 116.3, 112.5, 112.1, 100.2, 72.5, 68.4, 63.0, 56.6, 56.2, 44.0, 43.5, 32.2, 28.0, 15.4

### 6.1.5. HF/14/4/1: 9-*O*-demethylhomolykorin

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR, TLC identifikace) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu 9-*O*-demethylhomolykorin.

**Obrázek 37:** Struktura molekuly 9-*O*-demethylhomolykorinu



**Sumární vzorec:**  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

**Molekulová hmotnost:** 301,34

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{25} = +215.7^\circ$

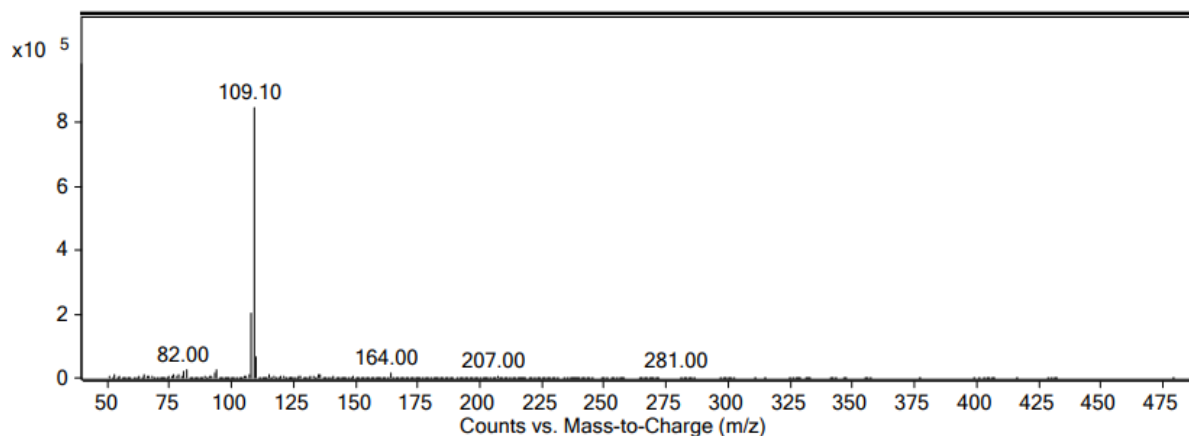
**MS analýza m/z (%):** 164 (2), 110 (8), 109 (100), 108 (24), 94 (3), 93 (2), 82 (3), 77 (1)

**NMR analýza:**

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  7.59 (1H, s, H8), 6.98 (1H, s, H11), 5.52-5.48 (1H, m, H4), 4.79- 4.76 (1H, m, H5a), 3.94 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.17-3.12 (1H, m, H2), 2.76-2.70 (1H, m, H11c), 2.66 (1H, dd,  $J=9.7$  Hz,  $J=2.1$  Hz, H11b), 2.62-2.58 (2H, m, H5), 2.53-2.47 (2H, m, H3), 2.26 (1H, q,  $J=9.5$  Hz, H2), 2.00 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  165.6 (C7), 150.8 (C10), 145.6 (C9), 140.6 (C3a), 136.7 (C11a), 117.6 (C7a), 116.0 (C8), 115.4 (C4), 110.3 (C11), 77.5 (C5a), 66.5 (C11c), 56.5 (C2), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 44.0 (C11b), 43.7 ( $\text{NCH}_3$ ), 31.2 (C5), 27.9 (C3)

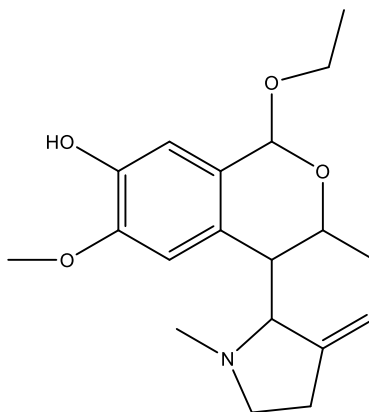
**Obrázek 38:** MS analýza 9-*O*-demethylhomolykorinu



### 6.1.6. HF/14/4/3: Eugenin

Látka byla na základě provedených testování (GC/MS analýza, NMR, TLC identifikace) a porovnání získaných dat s literaturou<sup>69</sup> identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu eugenin.

**Obrázek 39:** Struktura molekuly eugeninu



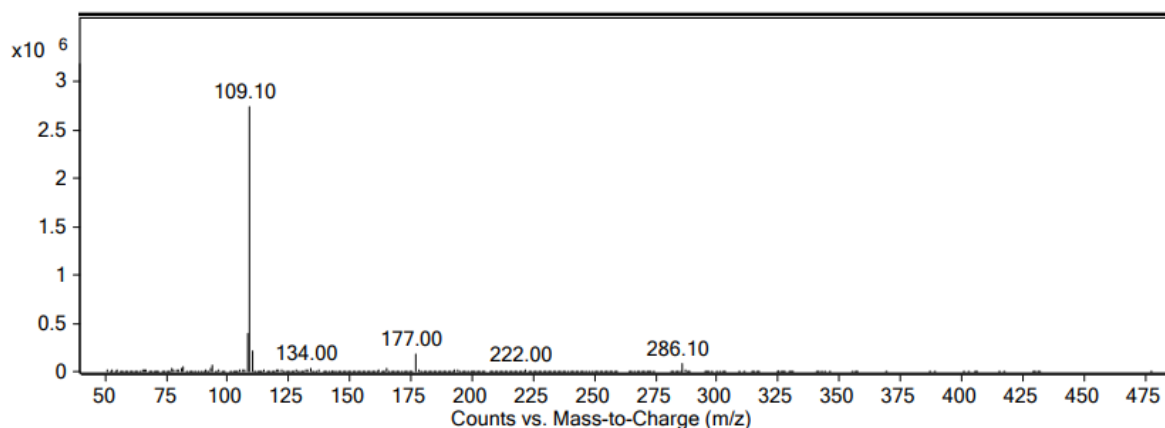
**Sumární vzorec:** C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>

**Molekulová hmotnost:** 331,41

**Optická otáčivost:**  $[\alpha]_D^{25} = +148,2^\circ$

**GC/MS analýza:** m/z: 286 (3), 177 (7), 165 (1), 110 (8), 109 (100), 108 (15), 94 (3), 82 (2), 81 (1)

**Obrázek 40:** MS analýza eugeninu



### NMR analýza:

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): 6.93 (1H, s, H-11), 6.86 (1H, s, H-8), 5.61 (1H, s, H-7), 5.53–5.49 (1H, m, H-4), 4.35–4.31 (1H, m, H-5a), 3.91 (1H, dq,  $J = 9.9, 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.87 (3H, s, C-10-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dq,  $J = 9.9, 7.1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.22 (1H, dt,  $J = 9.6, 5.5$  Hz, H-2), 2.83 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-11c), 2.68 – 2.59 (1H, m, H-5), 2.55 – 2.46 (3H, m, H-11b, H-3), 2.38 – 2.31 (1H, m, H-5), 2.27 (1H, dt,  $J = 18.8, 9.6$  Hz, H-2), 2.14 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 1.28 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): 146.2 (C-10), 145.0 (C-9), 140.1 (C-3a), 129.7 (C-11a), 126.7 (C-7a), 116.1 (C-4), 113.4 (C8), 112.0 (C-11), 97.1 (C-7), 67.7 (C-11c), 66.6 (C-5a), 63.5 (CH<sub>2</sub>), 56.7 (C-2), 56.1 (C-10 - OCH<sub>3</sub>), 44.2 (NCH<sub>3</sub>), 43.7 (C-11b), 31.7 (C-5), 28.0 (C-3), 15.4 (CH<sub>3</sub>)

## 6.2. Biologická aktivita izolovaných látek

Všechny strukturně identifikované sloučeniny, kromě 9-*O*-demetyl-7-*O*-etyllykoreninu, byly izolovány v množství, které umožňovalo měření jejich biologických aktivit. Látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám, inhibiční aktivitu vůči POP a v rámci spolupráce s dalšími pracovišti byla testována aktivita protinádorová a antimalarická (jaterní stádium *Plasmodium berghei*).

### 6.2.1. Biologická aktivita izolovaných alkaloidů ve vztahu k AD

U vybraných alkaloidů byla testována schopnost inhibice několika enzymů spojených s možnou terapií AD, např. inhibice lidské cholinesterasy (AChE, BchE) a prolyloligopeptidasy (POP). Hodnoty inhibičních aktivit jsou shrnuty v Tabulce 16. Významné aktivity jsou zvýrazněny.



<b>Tabulka 16:</b> Biologická aktivita alkaloidů vyjádřená jako IC <sub>50</sub> – inhibice AChE, BChE, POP			
<b>Látka</b>	<b>AchE IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>BchE IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>POP IC<sub>50</sub> (μM)</b>
Tazetin	>1000	>1000	>1000
11-hydroxyvitatin	>1000	>1000	/
Hamayn	829,11 ± 852,47	>1000	>1000
9- <i>O</i> - demetylhomolykorin	636,23 ± 39,37	>1000	>1000
Eugenin	>1000	310,18 ± 18,24	130 ± 8
<b>Standardy</b>	<b>AchE IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>BchE IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>POP IC<sub>50</sub> (μM)</b>
Galantamin	2,01 ± 0,14	33,69 ± 2,66	
Eserin	0,20415 ± 0,009294	0,30015 ± 0,012185	/
Huperzin A	0,04487 ± 0,0067	>1000	/
Z-Pro-prolinal	/	/	3,269 ± 0,02 × 10 <sup>-3</sup>
Baikalin	/	/	194 ± 14

### 6.2.2. Cytotoxická aktivita vybraných izolovaných alkaloidů

Stanovení cytotoxického působení alkaloidů bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Screeningová studie byla provedena na 10 buněčných liniích. Alkaloidy 9-*O*-demetylhomolykorin, hamayn a tazetin interagovaly s nádorovými liniemi: Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (linie buněk akutní lymfoblastické leukémie), A549 (linie buněk adenokarcinomu plic), HT-29 (kolorektální karcinom), PANC 1 (linie buněk epiteliálního karcinomu slinivky), A2780 (linie buněk karcinomu vaječníku), HeLa (linie buněk adenokarcinomu děložního čípku), MCF 7 (linie buněk adenokarcinomu prsu), SAOS 2 (linie buněk osteosarkomu), a kontrolní linie MRC-5 (linie buněk zdravých plicních fibroblastů). Koncentrace testovaných látek odpovídala 10 μM a na buněčné linie působila celkem 48 hodin. Po uplynutí daného času byla určena viabilita buněk jednotlivých linií, která byla následně porovnána s viabilitou buněk po působení doxorubicinu, který byl použit jako standard v koncentraci 1 μM.

**Tabulka 17:** Cytotoxická aktivita testovaných alkaloidů o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a standardu doxorubicinu o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  vyjádřena viabilitou buněk (%)<sup>66,13</sup>

Buněčná linie	Tazetin	9- <i>O</i> -demethylhomolykorin	Hamayn	Doxorubicin
Jurkat	93	100	80	2
MOLT-4	95	100	80	0
A549	83	109	72	11
HT-29	57	106	34	47
PANC 1	76	92	65	78
A2780	101	94	93	5
HeLa	84	96	68	11
MCF 7	94	102	76	37
SAOS 2	92	103	87	17
MRC-5	/	93	/	29

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

### 6.2.3. Antimalarická aktivita izolovaných alkaloidů

*In vitro* inhibiční aktivita vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei* byla měřena PharmDr. Kateřinou Breiterovou Ph.D. ve spolupráci s výzkumníky z Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu v rámci Erasmus+ stáže. Základní screening byl proveden při koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ . Bohužel žádný z testovaných alkaloidů (eugenin, 9-*O*-demethylhomolykorin, tazetin, hamayn) nevykazoval významnou inhibiční aktivitu vůči sporozoitům *Plasmodium berghei*.<sup>67</sup>

## 7. DISKUZE A ZÁVĚR

Alkaloidy jsou velmi obsáhlou a rozmanitou skupinou sekundárních rostlinných metabolitů, které se vyskytují zhruba až u 20 % všech druhů rostlin. Alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi Amaryllidaceae se vyznačují širokým spektrem unikátních biologických aktivit, jmenovitě antimalarickou, antibakteriální, antivirovou, antimykotickou, analgetickou, protinádorovou a inhibiční aktivitou vůči enzymům nazývaných cholinesterasy. Současný výzkum těchto alkaloidů se zaměřuje na hledání nových potencionálních léčiv užitečných například v protinádorové terapii, a to především díky jejich vysoce selektivnímu účinku na nádorové buňky. Inhibice lidských cholinesteras se dnes prakticky využívá při léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba. Nejznámějším a zároveň terapeuticky nejvýznamnějším AA je bezpochyby galantamin, který v současnosti figuruje mezi základními léčivy v terapii kognitivního poklesu u mírné a středně těžké AD.<sup>14</sup>

V průběhu fytochemické studie bylo zpracováno zhruba 25 kg čerstvých cibulí rostliny *Hippeastrum* cv. Ferrari do podoby přečištěného alkaloidního extraktu o celkové hmotnosti 22,7 g. Připravený extrakt byl rozdělen pomocí sloupcové chromatografie za vzniku 15 frakcí. Cílem předložené diplomové práce bylo izolovat alespoň tři alkaloidní látky v čistém stavu z podfrakce s označením HF-14 a následně změřit jejich biologické aktivity. Podfrakce HF-14 o hmotnosti 0,67 g byla podrobena opakované preparativní TLC, pomocí níž bylo získáno celkem 6 čistých látek, které byly na základě GC/MS, NMR analýzy, optické otáčivosti a porovnávací analytické TLC identifikovány. Látky byly určeny jako zástupci tří odlišných strukturních typů alkaloidů – tazetinový typ zastupoval hlavní představitel skupiny tazetin, z alkaloidů hemanthaminového typu byly izolovány 11-hydroxyvitatin a hamayn a z alkaloidů hemanthaminového typu byly identifikovány tři látky, a to 9-*O*-demetyl-7-*O*-etyllykorein, 9-*O*-demetylhomolykorin a eugenin.

Alkaloidy tazetin, 11-hydroxyvitatin, hamayn, 9-*O*-demetylhomolykorin a eugenin byly izolovány v dostatečném množství, které umožnilo měření biologických aktivit ve vztahu s možnou terapií AD, nádorových onemocnění a infekční nemoci malárie.

V souvislosti s potenciální terapií AD byly izolované alkaloidy studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči enzymům, které se v tuto dobu již uplatňují jako cíle zásahu v terapii AD – lidským cholinesterasám AchE a BchE. Získané inhibiční aktivity  $IC_{50, AchE}$  a  $IC_{50, BchE}$  pro jednotlivé látky byly porovnávány s hodnotou inhibiční aktivity vybraných referenčních látek – galantaminem, eserinem a huperzinem A. Žádný z testovaných alkaloidů ale bohužel nevykazoval významnou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám.

V souvislosti s AD byla také měřena inhibiční aktivita vůči POP, kdy jako referenční látky byly použity Z-Pro-prolinal ( $IC_{50} = 3,269 \pm 0,02 \times 10^{-3}$ ) a baikalin ( $IC_{50} = 194 \pm 14$ ). Provedené studie naznačují, že inhibice enzymu POP by mohla zabránit štěpení neuropeptidů, čímž by došlo ke zvýšení jejich hladin, a tím zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s AD. Jako jediný projevil významnou inhibiční aktivitu vůči POP alkaloid eugenin ( $IC_{50, POP, eugenin} = 130 \pm 8$ ), tato aktivita dosahovala dokonce lepších hodnot než standard baikalin. Ostatní látky neprojevily inhibiční aktivitu vůči tomuto enzymu.

Stanovení cytotoxického působení izolovaných látek bylo provedeno na celkem 10 buněčných liniích, kdy alkaloidy 9-*O*-demethylhomolykorin, hamayn a tazetin interagovaly s nádorovými liniemi: Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (linie buněk akutní lymfoblastické leukémie), A549 (linie buněk adenokarcinomu plic), HT-29 (kolorektální karcinom), PANC 1 (linie buněk epiteliálního karcinomu slinivky), A2780 (linie buněk karcinomu vaječníku), HeLa (linie buněk adenokarcinomu děložního čípku), MCF 7 (linie buněk adenokarcinomu prsu), SAOS 2 (linie buněk osteosarkomu), a za účelem stanovení toxicity studovaných látek vůči zdravým buňkám byla zařazena kontrolní linie MRC-5 (linie buněk zdravých plicních fibroblastů). Viabilita buněk jednotlivých linií byla porovnána s viabilitou buněk po působení doxorubicinu, který byl použit jako referenční látka. Mírné cytotoxické působení projevil alkaloid hamayn vůči buněčným liniím HT-29, A549, PANC 1 a HeLa. Slabou inhibiční aktivitu vůči buňkám HT-29 projevil také tazetin. Alkaloid 9-*O*-demethylhomolykorin se nevyznačoval cytotoxickým působením proti nádorovým liniím, ale ani nepoškozoval zdravé buňky.

Ve spolupráci s výzkumníky z Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes v Lisabonu byla měřena také antimalarická aktivita na jaterní stádium prvoka *Plasmodium berghei*. Bohužel žádný z testovaných alkaloidů (eugenin, 9-*O*-demethylhomolykorin, tazetin, hamayn) neprojevil významnou inhibiční aktivitu vůči tomuto parazitovi.

Na základě výsledků této diplomové práce lze konstatovat, že rostlina *Hippeastrum* cv. Ferrari je významným zdrojem AA, které disponují spektrem důležitých biologických aktivit a jsou perspektivní náplní pro budoucí fytochemický výzkum.

## 8. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: **Tereza Buchalová**

Školitel: **PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.**

Název diplomové práce: **Izolace alkaloidů z *Hippeastrum* cv. Ferrari a jejich biologická aktivita**

Mnoho různých druhů, odrůd a kultivarů rodu *Hippeastrum* patří mezi oblíbené okrasné rostliny, zároveň ale představují bohatý zdroj důležitých sekundárních metabolitů nazývaných Amaryllidaceae alkaloidy. Tyto strukturně unikátní sloučeniny jsou známy pro své široké spektrum biologických aktivit, jako jsou protinádorová, antivirová a inhibiční aktivita proti acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BchE), které představují důležitou součást léčby Alzheimerovy choroby (AD).

AD je neurodegenerativní onemocnění, které je označováno za jednu z nejčastějších příčin demence na světě. Deficit neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v mozku se podílí na rozvoji AD, má totiž za následek poškození cholinergních funkcí, a to je zodpovědné za ztrátu paměti a změny chování. AChE a BchE jsou enzymy podílející se na ukončení impulsního přenosu rychlou hydrolýzou ACh. Proto jsou inhibitory AChE a BchE v dnešní době nejdůležitějším cílem v léčbě AD.

Etanolickeý extrakt byl získán z 25 kg čerstvých cibulí *Hippeastrum* cv. Ferrari. Tento extrakt byl čištěn kapalinovou extrakcí a pomocí gradientové eluční chromatografie frakcionován na 15 jednotlivých frakcí, které byly použity k izolaci čistých alkaloidů. Frakce HF-14 byla zpracována preparativní tenkovrstvou chromatografií a bylo izolováno celkem 6 čistých látek alkaloidní povahy, které byly identifikovány pomocí analytické TLC, GC/MS, NMR analýzy a měření optické otáčivosti. Byly identifikovány tyto látky: tazettin, 11-hydroxyvittatin, hamayn, 9-O-demetyl-7-O etyllykorin, 9-O-demetylhomolykorin a eugenin.

Izolované alkaloidy byly testovány na biologické aktivity spojené s AD, cytotoxickou a antimalarickou aktivitu. Inhibiční aktivita proti lidským cholinesterasám byla stanovena *in vitro* Ellmanovou spektrofotometrickou metodou, všechny testované látky ale byly determinovány za neaktivní vůči testovaným enzymům ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Při měření inhibiční aktivity vůči prolyl oligopeptidase se jevil neaktivnějším alkaloidem eugenin

( $IC_{50} = 130 \pm 8 \mu M$ ). U většiny izolovaných alkaloidů byla testována cytotoxická aktivita, kdy screeningová studie byla provedena na celkem 10 buněčných liniích (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC 1, A2780, HeLa, MCF 7 a SAOS 2, MRC-5). Nejvyšší cytotoxickou aktivitu vykazoval hamayn, a to vůči buňkám HT-29, A549, PANC 1 a HeLa. Mírnou cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii HT-29 projevoval i tazetin. Stanovena byla také *in vitro* aktivita vůči jaternímu stádiu *Plasmodium berghei*, avšak žádný z testovaných alkaloidů nevykazoval významnou inhibiční aktivitu.

**Klíčová slova:** *Hippeastrum* cv. Ferrari, Amaryllidaceae, alkaloidy, Alzheimerova choroba, biologická aktivita, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyl oligopeptidasa, cytotoxicita, antimalarická aktivita.

## 9. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: **Tereza Buchalová**

Supervisor: **PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.**

Title of Thesis: **Isolation of alkaloids from *Hippeastrum* cv. Ferrari and their biological activity**

Many different species, varieties, and cultivars of the genus *Hippeastrum* are popular indoor ornamental plants, but they also represent a rich source of important secondary metabolites called Amaryllidaceae alkaloids. These structurally unique compounds are known for their wide spectrum of biological activities such as anticancer, antiviral, and inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) which represent important part in therapy of Alzheimer's disease (AD).

AD is a neurodegenerative disease that is identified as one of the most frequent causes of dementia in the world. Deficit of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the cortex participates on the development of the AD, which results in the damage of cholinergic functions, and this is responsible for the memory loss and behavioural changes. AChE and BChE are enzymes involved in the termination of impulse transmission by rapid hydrolysis of ACh. Therefore, AChE and BChE inhibitors are nowadays the most important goal in the treatment of AD.

Ethanollic extract was obtained from 25 kg fresh bulbs of *Hippeastrum* cv. Ferrari. This extract was purified by liquid-liquid extraction and fractionated by column chromatography to 15 individual fractions, which were used to isolate pure alkaloids. The fraction HF-14 was processed by preparative thin layer chromatography and 6 pure compounds were isolated from fraction HF-14: tazettine, 11-hydroxyvittatine, hamayne, 9-*O*-demethyl-7-*O*-ethyllycorine, 9-*O*-demethylhomolycorine and eugenine.

Isolated alkaloids were tested for their biological activities associated with AD, cytotoxic and antimalarial activity. The inhibitory activity against human cholinesterases was measured *in vitro* by the Ellman's spectrophotometric method, but all tested substances were determined to be inactive against the enzymes ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). The most active alkaloid against prolyl oligopeptidase appeared to be eugenine ( $IC_{50} = 130 \pm 8 \mu M$ ). The majority of isolated alkaloids were screened for cytotoxic activity. The screening study was performed on a total

of 10 cell lines (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC 1, A2780, HeLa, MCF 7 and SAOS 2, MRC-5). Among tested alkaloids, hamayne showed promising cytotoxic activity against HT-29, A549, PANC 1 and HeLa cells, tazettine also showed moderate cytotoxic activity against HT-29 cell line. *In vitro* activity against the hepatic stage of *Plasmodium berghei* was also determined, but none of the tested alkaloids showed significant inhibitory activity.

**Keywords:** *Hippeastrum* cv. Ferrari, Amaryllidaceae, alkaloids, Alzheimer's disease, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, cytotoxicity, antimalarial activity.



## 10. POUŽITÁ LITERATURA

- <sup>1</sup> Opletal L.: Daidalea – Univerzita Karlova [online]. 2019 [cit. 30.10.2021]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>.
- <sup>2</sup> Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Amaryllidaceae family alkaloids as potential drugs for cancer treatment. *Chemické Listy* 2013.
- <sup>3</sup> Jahodář L.: *Farmakobotanika – Semenné rostliny*, str. 181. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 2011.
- <sup>4</sup> Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* 2013.
- <sup>5</sup> Ferdausi A., Chang X., Hall A., Jones M.: Galanthamine production in tissue culture and metabolomic study on Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Industrial Crops and Products*.
- <sup>6</sup> Al Shammari L., Hulcová D., Maříková J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany*.
- <sup>7</sup> Atrahimovich D., Harris R., Eitan R., Cohen M., Khatib S.: Galantamine quantity and alkaloid profile in the bulbs of *Narcissus tazetta* and daffodil cultivars (Amaryllidaceae) grown in Israel. *Metabolites*. 2021.
- <sup>8</sup> Spilková J. a kolektiv: *Farmakognozie*, str. 193–216, Karolinum. Praha 2016.
- <sup>9</sup> Votrubová O.: *Anatomie rostlin*, str. 159–175, Karolinum. Praha 2010.
- <sup>10</sup> <http://www2.biologie.fu-berlin.de/sysbot/poster/poster1.pdf>. staženo 15.11.2021.
- <sup>11</sup> Kunte L., Zelený V.: *Okrasné rostliny tropů a subtropů*, str. 7–12. Grada Publishing, a.s., Praha 2009.
- <sup>12</sup> Novák J.: *Jedovaté rostliny kolem nás*, str. 141–146, Grada Publishing, a.s., Praha 2011.
- <sup>13</sup> Shammari Ajaj Al L.: Dissertation (Alkaloids of the genus *Hippeastrum* (Amaryllidaceae): isolation, identification, biological activity), Faculty of pharmacy in Hradec Králové, Charles University, 2021.
- <sup>14</sup> De Andrade J. P., Pigni N. B., Torras-Claveria L., et al.: Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: Chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Quimica*.
- <sup>15</sup> <https://www.trianglenursery.co.uk/77647-amaryllis-ferrari>. Staženo 17.01.2022.
- <sup>16</sup> Desgagné-Penix I.: Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2021.

- <sup>17</sup> Takos A. M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. 2013.
- <sup>18</sup> Koutová D., Maafi N., Havelek R., et al. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules*.
- <sup>19</sup> Jin Z., Yao G.: Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*. 2019.
- <sup>20</sup> Nair J.J., Van Staden J.: The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South African Journal of Botany*. 2021.
- <sup>21</sup> Šafratová M., Hostalková A., Hulcová D., et al.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*. 2018.
- <sup>22</sup> Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., et al.: Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021.
- <sup>23</sup> Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., et al.: The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*. 2007.
- <sup>24</sup> Nair J.J., Van Staden J.: Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural Product Communications*. 2014.
- <sup>25</sup> Koutová D., Havelek R., Peterová E., et al.: Pancracine, a montanine-type amaryllidaceae alkaloid, inhibits proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells and induces apoptotic cell death in molt-4 leukemic cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
- <sup>26</sup> Jin Y.H., Min J.S., Jeon S., et al.: Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections. *Phytomedicine*. 2021.
- <sup>27</sup> Szlávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J.: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*. 2004.
- <sup>28</sup> Likhitwitayawuid K., Angerhofer C. K., Chai H., Pezzuto J. M., Cordell G. A., Ruangrunsi N.: Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*. 1993.
- <sup>29</sup> Cahlíková L., Breiterová K., Opletal L.: Chemistry and biological activity of alkaloids from the genus *lycoris* (Amaryllidaceae). *Molecules*. 2020.
- <sup>30</sup> Cheesman L., Nair J. J., Van Staden J.: Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2012.

- <sup>31</sup> Doležal M. a kolektiv: *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*, str. 50–58. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 2016.
- <sup>32</sup> Ka S., Koirala M., Mérindol N., Desgagné-Penix I.: Biosynthesis and biological activities of newly discovered amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020.
- <sup>33</sup> Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., et al.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2019.
- <sup>34</sup> Holmes C., Amin J.: *Dementia. Medicine* (United Kingdom). 2020.
- <sup>35</sup> Gale S. A., Acar D., Daffner K. R.: *Dementia. American Journal of Medicine*. 2018.
- <sup>36</sup> Vlček J., Fialová D. a kolektiv: *Klinická farmacie I*, str. 276–290. Grada Publishing, a.s., Praha 2010.
- <sup>37</sup> Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*, str. 123–132. Grada, Praha 2006.
- <sup>38</sup> Sahyouni R., Verma A., William Chen J.: *Alzheimer's Disease Decoded: The History, Present, and Future of Alzheimer's Disease and Dementia*. World Scientific Publishing. 2017.
- <sup>39</sup> Jack C. R., Lowe V. J., Weigand S. D., et al.: Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimers disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimers disease. *Brain*. 2009.
- <sup>40</sup> Zheng W. H., Bastianetto S., Mennicken F., Ma W., Kar S.: "Amyloid  $\beta$  peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures," *Neuroscience*. 2020.
- <sup>41</sup> Peng Y., Xing C., Xu S. et al: "L-3-n-butylphthalide improves cognitive impairment induced by intracerebroventricular infusion of amyloid- $\beta$  peptide in rats," *European Journal of Pharmacology*. 2009.
- <sup>42</sup> Xian Y. F., Lin Z. X., Mao Q. Q., et al.: Bioassay-guided isolation of neuroprotective compounds from *uncaria rhynchophylla* against beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.
- <sup>43</sup> Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L. et al: Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 1997.
- <sup>44</sup> Arribas-Ayllon M.: The ethics of disclosing genetic diagnosis for Alzheimers disease: Do we need a new paradigm? *British Medical Bulletin*. 2011.
- <sup>45</sup> Gustaw-Rothenberg K., Lerner A., Bonda D. J., et al.: Biomarkers in Alzheimers disease: Past, present and future. *Biomarkers in Medicine*. 2010.
- <sup>46</sup> Pidrman V.: *Demence*, str. 13–15. Grada, Praha 2007.

- <sup>47</sup> Levy K., Lanctôt K. L., Farber S. B., Li A., Herrmann N.: Does pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimers disease relieve caregiver burden? *Drugs and Aging*. 2012.
- <sup>48</sup> Mátl O., Mátlová M., Holmerová I.: Zpráva o stavu demence 2016. Vydala Česká alzheimerská společnost, o. p. s., s podporou MZ ČR, Praha 2016.
- <sup>49</sup> Baron S., Ulstein I., Werheid K.: Psychosocial interventions in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment: Evidence for gender bias in clinical trials. *Aging and Mental Health*. 2015.
- <sup>50</sup> <https://www.czso.cz/csu/xu/nadeje-do-ziti-aneb-kolika-let-se-muzeme-do-zit-v-nasem-kraji>. Staženo 20.01.2022.
- <sup>51</sup> Viña J., Lloret A.: Why women have more Alzheimer's disease than men: Gender and mitochondrial toxicity of amyloid- $\beta$  peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010.
- <sup>52</sup> McKhann G. M., Knopman D. S., Chertkow H., et al.: The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2011.
- <sup>53</sup> Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R.: "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975.
- <sup>54</sup> Doležal M. a kolektiv: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*, str. 91–93 Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- <sup>55</sup> Tabet N.: Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: Anti-inflammatories in acetylcholine clothing. *Age and Ageing*. 2006.
- <sup>56</sup> Hausner L., Frölich L.: Antidementia Drug Therapy of Alzheimer's Dementia: Status 2018 and Outlook. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2019.
- <sup>57</sup> Chen Y. D., Zhang J., Wang Y., Yuan J. L., Hu W. L.: Efficacy of cholinesterase inhibitors in vascular dementia: An updated meta-analysis. *European Neurology*. 2016.
- <sup>58</sup> Loy C., Schneider L.: Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Published online 2006.
- <sup>59</sup> McShane R., Westby M. J., Roberts E., et al.: Memantine for dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019.
- <sup>60</sup> Doležel Z., et al.: Farmakoterapeutické informace – Měsíčník pro lékaře a farmaceuty: Novinky v léčbě Alzheimerovy nemoci, 2022. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/fi-leden-2022>.

- <sup>61</sup> Mayer S. C., Kreft A. F., Harrison B., et al.: Discovery of begacestat, a Notch-1-sparing  $\gamma$ -secretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008.
- <sup>62</sup> Stahl E.: *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*, 2.; Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- <sup>63</sup> Dušek J., Kašpárová M., Siatka T., Spilková J., Tůmová L.: *Praktická cvičení z farmakognosie*, str. 80, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha 2014.
- <sup>64</sup> Hostalkova A., Marikova J., Opletal L., Korabecny J., Hulcova D., Kunes J., Novakova L., Perez D. I., Jun D., Kucera T., Andrisano V., Siatka T., Cahlikova, L.: Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Natural Products*. 2019.
- <sup>65</sup> Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková, L.: Cytotoxic Activities of Amaryllidaceae Alkaloids against Gastrointestinal Cancer Cells. *Phytochemistry Letters*, 2015.
- <sup>66</sup> Havelek R., Muthna D., Tomsik P., Kralovec K., Seifrtova M., Cahlikova L., Hostalkova A., Safratova M., Perwein M., Cermakova E., et al: Anticancer Potential of Amaryllidaceae Alkaloids Evaluated by Screening with a Panel of Human Cells, Real-Time Cellular Analysis and Ehrlich Tumor-Bearing Mice. *Chemico-Biological Interactions* 2017.
- <sup>67</sup> Ploemen I. H. J., Prudêncio M., Douradinha B. G., Ramesar J., Fonager J., Gemert G. J. van, Luty, A. J. F., Hermsen, C. C., Sauerwein, R. W., Baptista F. G., et al: Visualisation and Quantitative Analysis of the Rodent Malaria Liver Stage by Real Time Imaging. *Plos one*, 2009.
- <sup>68</sup> Viladomat et al.: Alkaloids from *Brunsvigia josephinae*, 1994
- <sup>69</sup> Via J., Arriortua M. I., Ochando L. E., Reventos M. M., Amigó J. M., Bastida J.: Structure of eugenine, an alkaloid from *Narcissus eugeniae*. *Acta Crystallographica Section C*, 1989.