

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

Alkaloidy Zephyranthes citrina (Amaryllidaceae):
izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ANETA ČEJDOVÁ

školitel: PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

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

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové, srpen 2023

Aneta Čejdová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli a mentorovi PharmDr. Rudolfovi Vrabcovi, Ph.D., který mi poskytl velice cenné rady jak v laboratoři, tak při psaní diplomové práce. Byl mi velikou oporou, jak při interpretaci plynového chromatogramu, měření inhibičních aktivit i změření optické aktivity izolovaných struktur a děkuji mu za každý čas, který mi byl schopen obětovat. A oceňuji jeho trpělivost při mojí experimentální práci v laboratoři. Další díky patří doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D., kteří změřili a vypracovali NMR analýzu získaných alkaloidů. Moc ráda bych také vyjádřila díky prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. vedoucí Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky za pomoc při studiu a dále všem zúčastněným pracovníkům Farmaceutické fakulty, kteří mi pomáhali při vypracování diplomové práce.

Obsah

1	CÍL PRÁCE.....	8
2	ÚVOD	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Rostliny čeledi Amaryllidaceae	11
3.1.1	Charakteristika amarylkovitých alkaloidů a jejich biosyntéza	11
3.1.2	Základní strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae.....	12
3.1.3	Přehled fytochemicky studovaných druhů rodu <i>Zephyranthes</i>	14
3.2	Biologická aktivita alkaloidů rodu <i>Zephyranthes</i>	17
3.2.1	Lykorinový strukturní typ.....	17
3.2.2	Homolykorinový strukturní typ	18
3.2.3	Narciklasinový strukturní typ	18
3.2.4	Galanthaminový strukturní typ.....	18
3.2.5	Krininový strukturní typ	19
3.2.6	Haemanthaminový strukturní typ	19
3.2.7	Plikaminový strukturní typ	19
3.2.8	Montaninový strukturní typ.....	19
3.2.9	Narcikachninový strukturní typ.....	20
3.2.10	Další strukturní typy alkaloidů z rodu <i>Zephyranthes</i>	20
3.3	Alzheimerova choroba	20
3.3.1	Patofyziologie AD	21
3.3.2	Farmakoterapie	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1	Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení.....	29
4.1.1	Chemikálie pro izolaci a stanovení struktury alkaloidů.....	29
4.1.2	Chemikálie a enzymy pro měření inhibice cholinesteras	30
4.1.3	Pomocný materiál pro izolaci a určení struktury alkaloidů	30
4.1.4	Rostlinný materiál.....	30
4.1.5	Přístroje a software	31
4.2	Obecné postupy.....	31
4.2.1	Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů.....	31
4.2.2	Příprava litých desek pro preparativní TLC	31
4.2.3	Preparativní TLC	32
4.2.4	Analytická metoda TLC	32

4.2.5	Analytická metoda HPLC/MS-ESI	32
4.2.6	Preparativní HPLC	33
4.2.7	Analýza GC/MS-EI	33
4.2.8	Analýza NMR.....	33
4.2.9	Měření optické otáčivosti	34
4.2.10	Měření inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám.....	35
4.3	Izolace alkaloidů ze <i>Zephyranthes citrina</i>	36
4.3.1	Vyvíjecí soustavy pro preparativní a analytickou metodu TLC	36
4.3.2	Postup získání čistých alkaloidů.....	37
5	VÝSLEDKY	44
5.1	Alkaloidy izolované ze <i>Zephyranthes citrina</i>	44
5.1.1	X-1: Lykorin.....	44
5.1.2	X-2: Zephyranin E	46
5.1.3	X-3: 6-Oxonarcissidin	47
5.1.4	X-4: Narcissidin.....	48
5.1.5	X-5: Maritidin.....	49
5.1.6	X-6: Galanthin	50
5.2	Výsledky biologické aktivity izolovaných alkaloidů.....	51
6	DISKUSE	52
7	ZÁVĚR.....	54
8	ABSTRAKT	55
9	ABSTRACT	56
10	REFERENCE	57

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAs	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidní prekurzorový protein
A β	β -amyloid
BACE 1	β -sekretasa 1
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BuChE	butyrylcholinesterasa
CREB	transkripční faktor
DMT	doplňková modifikující terapie
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
GFAP	gliový fibrilární kyselý protein
GSK-3 β	glykogen syntasa kinasa-3 β
HPA	hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iAChE	inhibitory acetylcholinesterasy
iBuChE	inhibitory butyrylcholinesterasy
MS	hmotnostní spektrometrie
NFTs	neurofibrilární klubka

NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové receptory
NMR	nukleární magnetická resonance
POP	prolyloligopeptidasa
PSEN1	presenelin 1
PSEN2	presenelin 2
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo získat alkaloidy z cibulí rostliny *Zephyranthes citrina* z čeledi Amaryllidaceae za účelem testování jejich biologických aktivit spojených zejména s terapií Alzheimerovy choroby. Dílčím cílem bylo určení přesné struktury izolovaných alkaloidů na podkladě jejich fyzikálně-chemických vlastností, které byly následně porovnány s literaturou. Po analýze a vyhodnocení výsledků bylo dalším cílem sepsání a obhájení diplomové práce.

2 ÚVOD

Už v dávných dobách měly rostliny důležitou roli na poli medicíny a vědy. V tradiční medicíně, kterou znaly civilizace už dlouhou řadu staletí před narozením Ježíše Krista, se využívaly rostlinné struktury, které jsou v moderní medicíně využívány dodnes nebo alespoň vycházejí z jejich původní struktury, např. papaverin, morfium, kokain, taxan. V rozvojových zemích se tradiční medicína využívá stále a neodmyslitelně patří k životu tamních lidí. Rostliny byly vždy součástí lidské evoluce, sběr a využití léčivých rostlin je tradice, která nás doprovází řadu let. Nejranějším případem, kdy můžeme najít první pokusy o samoléčení, je příběh ledové muže z italsko-rakouských Alp. V jeho střevech se našly vajíčka bičíkovce, pravděpodobně trpěl silnými gastrointestinálními křečemi a anémií. Proto se u něho našla houba jménem březovník obecný, který byl dříve využíván jako silné projímadlo. Nejstarší dochovaný dokument, kde se píše o rostlinách, pochází z Mezopotámie. Egypťané sepsali svoje poznatky na papyrus, nejznámější dílo je Ebersův papyrus, který byl nalezen kolem roku 1500 před naším letopočtem. Najdeme v něm seznam nemocí, empirické a také symbolické metody léčby. V Evropě se čerpal z díla nazvaného *De materia medica*. V Řecku byl považován za nejvýznamnějšího léčitele a otce medicíny Dioscoridés, za svůj život popsal více než 600 rostlin. Dalším významným řeckým vědcem byl Hippokratés z Kósu, jako první sepsal dílo o čeledi Amaryllidaceae, doba se datuje okolo 4. století před naším letopočtem. Hippokratés využíval při svých léčebných metodách olejovou emulzi z *Narcissus poeticus*, která měla sloužit k léčbě nádorů dělohy. Důležitým milníkem na poli objevů nových léčivých rostlin bylo objevení zemí tzv. nového světa, odkud byly dovezeny nové druhy rostlin i plodin. Obrovská škála nových léčivých rostlin a zavádění nových léčebných metod dala vzniknout další významné postavě na poli lékařství. Důležitost Theoprastuse Bombastuse z Hoheinhaimu, známějšího pod pseudonymem Paracelsus (1493–1541), nespočívala pouze v psaní děl, ale především v jeho přístupu k léčebným metodám a objevování nových lékařských postupů. Do praxe zavedl léčbu pomocí minerálů a vyzýval k extrakci účinných látek ze zvířat a rostlin. Ačkoli jeho názory a myšlenky se v jeho době nesetkaly s úspěchem a byly z velké části nepochopeny, v dnešní době je vnímáme jako samozřejmost, bez které by se vědecký výzkum nerozvinul do takových podob, jako ho známe teď. V 17. a 18. století se znalosti o léčivých rostlinách rozšířily, ale všechny pokusy o získání látek z rostlin dopadly špatně. Až v 19. století došlo k rozvoji vědy nazývané fytochemie. V roce 1804 německý chemik Sertürner izoloval alkaloid morfin z *Papaver somniferum*. Důležitou rostlinou drogou, která se používá dodnes, se stala kyselina acetylsalicylová, kdy její struktura byla původně

odvozena ze struktury vyizolované z kůry vrby Johannesem Buchnerem. Ve 20. století byl milníkem náhodný objev antibakteriálních léčiv. Ve snaze napodobit účinky antibakteriálních léčiv, vznikl nový obor syntetická chemie, kde se využívá rostlinných struktur jako předloh pro výrobu léčiv syntetických. Došlo tak na poli výzkumu i výrobě léčiv k velkým pokrokům a díky nim můžeme léčit obtížné nemoci, které se před 70 lety zdály nemožné.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Rostliny čeledi Amaryllidaceae

Nejstarší důkaz o čeledi Amaryllidaceae pochází ze 4. století našeho letopočtu. Z této čeledi bylo izolováno nespočet sekundárních metabolitů (flavonoidy, chalkony, lignany, terpenoidy). Nejvýznamnější složkou čeledi jsou alkaloidy, které tvoří převážnou část biologické aktivity rostliny. Nejznámějším alkaloidem je galanthamin. Účinek alkaloidu galanthaminu je dán jeho inhibiční aktivitou k enzymu acetylcholinesterase (AChE), která hraje důležitou roli v Alzheimerově chorobě (AD). Na základě provedení mnoha studií bylo zjištěno, že nejúčinnějšími typy alkaloidů v této čeledi jsou typy: narciklasinový, lykorinový a krininový (1). Tyto alkaloidy nemají pouze inhibiční aktivitu a nemusí být využity pouze v léčbě AD, ale díky tomu, že jeví i účinky antivirové, antifungální, antimalarické, antibakteriální, protizánětlivé i analgetické, mohou být použity v jiných případech onemocnění. Čeleď Amaryllidaceae obsahuje přibližně 1100 druhů rostlin a ty jsou rozděleny do zhruba 75 rodů. Jsou to vytrvalé suchozemské rostliny s podzemní cibulí, řidčeji je najdeme i s oddenkem. Vyskytují se nejčastěji v tropech a subtropích, centrum diverzity se nachází v Jižní Americe nebo v jižní Africe. V České republice můžeme najít sněženku (*Galanthus*), bleduli (*Leucojum*) a narcis (*Narcissus*). Tyto rostliny z největší části jejich sekundárních metabolitů obsahují amaryllkovité alkaloidy, které mají isochinolinovou strukturu (1; 2).

3.1.1 Charakteristika amaryllkovitých alkaloidů a jejich biosyntéza

Základní struktura amaryllkovitých alkaloidů je odvozena od aminokyselin L-lysinu a L-fenylalaninu, ze kterých začíná jejich biosyntéza. Alkaloidy jsou slabé baze, pKa se pohybuje mezi hodnotami 6–9. Většina izolovaných alkaloidů obsahuje jeden atom dusíku, který je sekundární, terciární i kvartérní. Výjimku tvoří alkaloidy izolované v posledních letech, kdy jejich alkaloidy obsahovaly 2 atomy dusíku, příkladem může být pallidiflorin (3). Na počátku biosyntézy dochází k enzymatické přípravě prekurzorů. Modifikace L-fenylalaninu, který je katalyzován L-fenylalaninlyasou (PAL), dá vzniknout trans-skořicové kyselině (3). Další dva hydroxylační kroky vedou ke ztrátě 2 atomů uhlíku za vzniku 3,4-dihydroxybenzylaldehydu (3,4-DHBA). Současně se dekarboxyluje L-tyrosin za pomoci tyrosindekarboxylasy (TYDC) na tyramin. Z tyraminu a 3,4-DHBA vzniká meziprodukt norbelladin, po kterém je tato biosyntetická cesta pojmenována. Pokud je norbelladin chráněn

methylem (*O*-methylnorbelladin), může dojít k intramolekulárnímu oxidativnímu spojení za vzniku několika typů amarylkovitých alkaloidů. Podle vzniku spojení (*ortho*–*para*, *para*–*para*, *para*–*ortho*) vzniká 9 základních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů: lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazzetinový (tazzetin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), haemanthaminový (haemanthamin) a belladinový (belladin) (1; 3).

3.1.2 Základní strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Uplynulo zhruba 150 let od izolace prvního alkaloidu lykorinu, za tuto dobu bylo izolováno na dalších 600 amarylkovitých alkaloidů, které se řadí do více než 9 strukturně popsaných typů této čeledi. Literatura popisuje řadu dalších amarylkovitých alkaloidů, které byly izolovány v různých podčeledích, ale v rostlině jsou ve stopovém množství (plikaminový, galasinový typ) (1).

- Belladinový strukturní typ potvrzuje správnost biosyntézy norbelladinového typu a najdeme ho v mnoha rodech čeledi Amaryllidaceae (*Crinum*, *Nerine*). Do této strukturní skupiny patří i kraugsodin, který je představitelem konkrétní Shiffovy baze, nacházející se v přírodě (1;4).
- Lykorinový strukturní typ je tvořen pyrrolo[d,e]phenantridinem. Je to nejrozmanitější skupina amarylkovitých alkaloidů, dosud bylo izolováno 120 strukturně podobných typů (4).
- Homolykorinový typ je odvozen od struktury benzopyrano-indolu. Prozatím bylo odvozeno a izolováno na zhruba 80 alkaloidů, které můžeme rozdělit na dvě skupiny podle toho, jestli obsahují nasycený nebo nenasycený kruh mezi uhlíky C3 a C4. Sloučeniny s nasycenou vazbou mezi uhlíky C3 a C4 jsou velmi vzácné a vyskytují se převážně v rodu *Clivia* (1;4).
- Krininový typ je odvozen od struktury 5,10*b*-ethanophenantridinu. Hlavní charakteristikou je, že obsahují ethanový můstek, který přemostňuje molekulu v polohách N5 a C10*b*. Krininový typ má ethanový můstek v absolutní konfiguraci beta a jeho dalším typickým znakem je přítomnost dioxalanového kruhu na uhlících C8 a C9, případně můžeme nalézt na uhlících methoxy- nebo hydroxy- skupinu. Patří sem alkaloidy jako: krinisin, krinin, makowin, powellamin (1;4).

- Heamanthaminový typ také vychází ze struktury 5,10*b*-ethanophenantridinu, ale substituovány jsou hlavně uhlíky C3, C6 a C11 hydroxy-, methoxy- a acetoxy-skupinami. Další důležitou charakteristikou je přítomnost ethanového můstku, která se nachází v absolutní konfiguraci alfa (1;4).
- Narciklasinový strukturní typ byl popsán už v roce 1967. Ve své struktuře obsahuje dvě základní struktury fenanthridinu a isokarbostyrlu, dusík je součástí amidové skupiny a díky tomu mají tyto alkaloidy slabě kyselý charakter. Dosud bylo identifikováno na 30 alkaloidů narciklasinového typu různých druhů v rodech *Zephyranthes*, *Habrantus*, *Lycoris* a *Pancreatum*. Je běžná jejich substituce na uhlících C1, C2, C3, C4, C7 a C10*b* hydroxy-, methoxy-, hydroxybutanoyl- a glukosyl-skupinami. Alkaloidy jsou nadále studovány pro svoji protinádorovou aktivitu. V rostlinách se nacházejí ve velmi malých množstvích, proto byla navržena jejich totální chemická syntéza (4).
- Montaninový strukturní typ tvořen 5,11-methanomorphanthridinovým skeletem. U většiny látek je přítomen 5,11-methanový můstek v konfiguraci alfa a vodík na uhlíku C4*a* v konfiguraci beta. V literatuře se vede diskuze, jestli tyto látky jsou opravdu přírodního původu nebo jestli se nejedná o izolační artefakty. Strukturní variabilita je dána substitucí na uhlících C2, C3 a C4*b* díky hydroxy- a methoxy- skupině. Alkaloidy toho strukturního typu byly popsány v rodech *Lycoris*, *Pancreatinum*, *Narcissus*, *Haemanthus* a *Hippeastrum* (1;4).
- Tazzetinový strukturní typ je tvořen benzopyranovým kruhem, dvojnou vazbu najdeme mezi uhlíky C1 a C2. Mezi uhlíky C8 a C9 je dioxalanový kruh. Podle několika publikací tazzetin vzniká v bazickém prostředí intramolekulárním přeskupením pretazzetinu, v případě této látky by se mělo jednat o izolační artefakt. Z těchto důvodů je pretazzetin upřednostňován před tazzetinem jako hlavní zástupce této struktury alkaloidů. V rostlinách najdeme pretazzetin pouze ve stopovém množství. Najdeme ho v rodech *Narcissus*, *Galanthus*, *Crinum* a *Lycoris* (1;4).
- Galanthaminový strukturní typ je tvořen benzofurobenzazepinem. Strukturní rozmanitost je dána různými substituenty na uhlících C3, C9, C11 a dusíku. Od těchto alkaloidů byly odvozeny i jim odpovídající *N*-oxidy. Rozlišujeme dva podtypy alkaloidů: galanthaminový typ s dvojnou vazbou mezi uhlíky C4 a C4*a* a lykoraminový typ s nasycenou vazbou mezi uhlíky C4 a C4*a*. Během izolace může galanthamin vlivem světla, kyselin nebo vzduchu konvertovat na galanthamin *N*-oxid,

epi-galanthamin, narwedín, 3,4-anhydrogalanthamin a další látky, díky tomu se může jednat o další izolační artefakty (4).

- Isminový strukturní typ vychází z fenanthridinu, který je více či méně modifikován. Pokud dojde k rozštěpení vazby mezi N5 a C6 v molekule fenanthridinu, získáme strukturu isminu nebo *O*-methylisminu. Za fenanthridinový alkaloid by se dal považovat i alkaloid asiaticumin B, který ve své molekule obsahuje další atom kyslíku. Alkaloidy tohoto typu byly izolovány z rodů *Galanthus*, *Pancratium* a *Zephyranthes* (1;4).

3.1.3 Přehled fytochemicky studovaných druhů rodu *Zephyranthes*

Rod *Zephyranthes* se vyskytuje na západní polokouli a najdeme ho ve vyšších nadmořských výškách jako je Mexiko a Argentina. Některé druhy se stále využívají jako okrasné květiny v zemích Indie, Havaji a Indonésie. Používají se cibule, listy i celé rostliny různých druhů *Zephyranthes* (2). V tradiční medicíně se používaly při léčbě rakoviny prsu (*Z. parulla*, *Z. rosea*), odvar z listů se používal k léčbě cukrovky (*Z. candida*) a v Číně se používal k léčbě kojenecké křeče, epilepsii a tetanu (44).

Následující kapitola uvádí nejvýznamnější studované druhy rodu *Zephyranthes*, ze kterých byly izolovány amarylkovité alkaloidy.

3.1.3.1 *Zephyranthes citrina*

Zephyranthes citrina Baker (Obr. 1–3) je jednoděložná rostlina z čeledi Amaryllidaceae, která se skládá z 85 rodů, ve kterých nalezneme přes 1100 druhů. Vyskytuje se v tropických a subtropických oblastech, kde byla pěstována jako okrasná rostlina pro barevné květy a vonné oleje. Léčivé vlastnosti těchto rostlin byly definovány již ve 4. století před naším letopočtem Hippokratem z Kósu. Ten používal olej z narcisu k léčbě nádorů dělohy. První amarylkovitý alkaloid byl lykorin, izolován v roce 1877 a další zástupci amarylkovitých alkaloidů vzbudily zájem díky své protinádorové, antibakteriální, antimalarické, antivirové, analgetické, antimykotické a anti-AChE aktivitě. *Zephyranthes citrina*, která byla popsána Bakerem v roce 1882, se pěstuje v jihovýchodním Mexiku, Haiti a Kubě. Izolací alkaloidů z mnoha získaných studií, se zjistila přítomnost látek jako je lykorin, lykorenin, galanthin, haemanthamin, oxomaritidin, maritidin, vittatin, narcissidin (5). Nový alkaloid z této rostliny narcieliin vykazoval nejslibnější inhibiční aktivitu vůči AChE i butyrylcholinesterase (BuChE) a byl čtyřikrát účinnější v inhibici BuChE než narcimatulin (2). Nedávno také došlo k izolaci

nových alkaloidů pojmenovaných jako carltonin A a carltonin B z *Narcissus pseudonarcissus*. Jejich struktura je velmi podobná molekulám s galantindolovým jádrem, jen se liší aromatickou substitucí na kruhu A, kde právě tato část molekuly je zodpovědná za vysokou inhibiční aktivitu (2). U struktury narcieliinu, který má velice složitou strukturu molekuly složenou ze dvou základních stavebních pilířů galanthaminu a galantindolu, se potvrdilo nepsané pravidlo, že čím více složitější struktura molekuly, tím silnější inhibiční aktivita vůči BuChE. Dalším významným alkaloidem vyskytujícím se v *Z. citrina* je haemanthamin, jež je zároveň nejvíce převažujícím strukturním typem alkaloidů v rodu *Zephyranthes*. Haemanthamin je intenzivně studován pro své protinádorové vlastnosti a používá se jako výchozí materiál pro přípravu dalších derivátů jako inhibitorů BuChE a AChE (1;5).



Obr. 1 *Zephyranthes citrina* – celá rostlina (6)



Obr. 2 *Zephyranthes citrina* – květy (7)



Obr. 3 *Zephyranthes citrina* – kořen, cibule, stonek, květ (7)

3.2 Biologická aktivita alkaloidů rodu *Zephyranthes*

V této kapitole je zmíněno několik vybraných strukturních typů alkaloidů z rodu *Zephyranthes*, u kterých je dále popsána jejich biologická aktivita související s možnou terapií AD.

3.2.1 Lykorinový strukturní typ

Hlavním zástupcem toho strukturního typu je lykorin, který se nachází ve všech rostlinných zástupcích rodu *Zephyranthes* (*Z. citrina*, *Z. rosea*, *Z. carinata*, *Z. candida*, *Z. concolor*, *Z. minuta*, *Z. texana*, *Z. robusta*, *Z. tubisphata*, *Z. flava*) (1). Pomocí Ellmanovy metody, která se využívá ke kvantifikaci inhibiční aktivity AChE, bylo zjištěno, že lykorin vykazuje potenciální neuroprotektivní aktivitu a má možnost chránit primární kortikální neurony proti glutamátem indukované excitotoxicitě (8). Má velmi slibné i protinádorové účinky, které vyplývají z jeho struktury pyrrolofenanthridinu, která je zásadní pro cytotoxickou aktivitu. Narušením této struktury dojde ke ztrátě aktivity (9). Ty samé protinádorové účinky vykazuje i látka pseudolykorin, která se nachází v rostlinách *Z. carinata*, *Z. tubisphata* a *Z. flava* (1). Dalším významným zástupcem toho strukturního typu je galanthin, který byl objeven v rostlinách jako *Z. carinata*, *Z. citrina*, *Z. minuta* a *Z. robusta* (1). Bylo zjištěno, že galanthin má velice slibnou inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE v nízkomolekulárních koncentracích ($IC_{50} = 6,10 \mu M$) (1). Podle analýzy se rovněž zjistilo, že galanthin má oproti galanthaminu odlišný způsob prezentace na periferním aniontovém vazebném místě enzymu. Váže oproti galanthaminu jiné konce aminokyselin (AMK) a díky vazbě PAS (peripheral anionic site), která působí na katalytickou účinnost enzymu tím, že může zachycovat substráty nebo inhibitory na cestě k aktivnímu místu, a také usnadňuje ukládání a agregaci amyloidního proteinu v mozku. V důsledku toho může galanthin navázaný na PAS inhibovat tvorbu a ukládání beta-amyloidu ($A\beta$), což z něj činí potenciálně účinnou látku pro farmakoterapii AD. Také se zdá, že galanthinový komplex má i výraznější stabilitu než komplex galanthaminový (10). Zephykarinatin I byl nalezen v rostlině *Z. carinata* a vykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE. Další látkou je zephyranthin, nalezen v *Z. candida*, který jevil inhibiční aktivitu vůči POP (prolyloligopeptidase). POP je zodpovědná za štěpení molekul, které obsahují prolinové zbytky. Její význam doposud nebyl zcela objasněn a přesně se neví, jaký význam sehrává v ukládání $A\beta$, ale zřejmě sehrává důležitou roli v procesech učení a paměti (1).

3.2.2 Homolykorinový strukturní typ

Důležitou látkou homolykorinového strukturního typu je tazzetin, který byl nalezen v rostlinách *Z. candida*, *Z. carinata*, *Z. minuta*, *Z. robusta* a *Z. tubisphata*. Vykazuje podobnou i vyšší hodnotu inhibiční aktivity k AChE jako má galanthamin (11). Dále tazzetin vykazoval inhibiční aktivitu ke glykogen-synthase-kinase-3 β (GSK-3 β), jednomu z proteinů zodpovědných za hyperfosforylaci tau proteinu, která je zodpovědná za snížení prozánětlivých cytokinů v oblasti hipokampu a neuroprotektivní aktivitu (12).

3.2.3 Narciklasinový strukturní typ

Narciklasin a pankratistatin jsou dvěma alkaloidy, které vykazují potenciální protinádorový účinek. Byly izolovány z rostlin *Z. flava*, *Z. candida*, *Z. carinata*, a *Z. minuta*. Za jejich protinádorovu aktivitu zodpovídá přítomnost tricyklického jádra a 8,9-methylendioxykupina na kruhu A. Pro aktivitu narciklasinu je potřebná dvojná vazba mezi uhlíky C1 a C10b, protože aktivita dihydro-derivátů narciklasinů je výrazně nižší (9).

3.2.4 Galanthaminový strukturní typ

Významným alkaloidem galanthaminového strukturního typu je lykoramin, objevený v rostlinách *Z. candida*, *Z. carinata*, *Z. minuta*, a *Z. robusta*. Jedná se o látku, která vykazuje podobnou hodnotu inhibiční aktivity k AChE jako galanthamin (11). Jeho účinek nespočívá pouze v inhibici AChE, ale také inhibuje peroxidaci lipidů, která je jedním z primárních zdrojů způsobující poranění mozku účinkem volných radikálů, které pak přímo poškozují neuronální membrány. Nadále dokáže zachovat zdravé vlastnosti neuronů, redukuje počet kondenzovaných jader a podporuje obnovu dendritické struktury (13). V patologických stavech AD je hlavním odpovědným faktorem A β pro indukci a podporu chronické aktivace gliových buněk. Reaktivní astrocyty se stávají součástí zánětlivého procesu, kdy začnou vylučovat řadu prozánětlivých cytokinů a mediátorů v reakci na depozita amyloidního proteinu. Tento zánět nazývaný jako astroglióza je patologickým znakem AD a dochází tak k vysokému nárůstu imunoreaktivity GFAP (gliový fibrilární kyselý protein) v hipokampu. Bylo zjištěno, že lykoramin by mohl mít protizánětlivý účinek na některé zánětlivé proteiny v oblasti hipokampu a zmírnit deficity v prostorové paměti pacientů (12). Nejvýznamnější zástupcem je galanthamin, který byl nalezen v rostlinách *Z. candida*, *Z. carinata*, *Z. concolor*, *Z. rosea*, a *Z. robusta* (1). Vykazuje inhibiční aktivitu vůči enzymu GSK-3 β (12). Jeho nejvýznamnějším účinkem je vysoká inhibiční aktivita vůči AChE, díky které byl zaveden i do farmakoterapeutické praxe jako jeden z předních léků na AD (8). Galanthamin *N*-oxid,

který byl izolován z rostliny *Z. concolor*, vykazoval menší inhibiční aktivitu k AChE než samotný galanthamin (13).

3.2.5 Krininový strukturní typ

Alkaloidem krininového typu je powellin, izolovaný ze *Z. tubisphata*. Powellin byl testován jako jediný pro inhibiční aktivitu k lidské AChE, ostatní alkaloidy se většinou testují vůči AChE elektrického úhoře. Výsledek jeho inhibice byl velice úspěšný ($IC_{50} = 29,1 \mu M$) (1).

3.2.6 Haemanthaminový strukturní typ

Hlavním zástupcem haemanthaminové struktury je haemanthamin samotný, který byl izolován z rostlin *Z. citrina*, *Z. carinata*, *Z. rosea*, *Z. minuta*, *Z. texana*, *Z. robusta*, *Z. candida*, *Z. concolor*, a *Z. tubisphata*. Studie ukázala, že má velice významné protinádorové účinky díky strukturním základům vycházející z fenanthridinového jádra a přítomností 5,10b-ethanového můstku, který se nalézá v konfiguraci α . Kdyby se ethanový můstek nacházel v konfiguraci β , jeho cytotoxická aktivita by byla výrazně nižší (1). Dále se haemanthamin využívá jako výchozí materiál pro přípravu inhibitorů BuChE/AChE (2). Dalšími zástupci tohoto typu jsou alkaloidy maritidin a epimaritidin, které byly nalezeny v rostlinách *Z. citrina*, *Z. rosea*, *Z. robusta*, *Z. tubisphata* a *Z. flava* (1). Maritidin nevykazoval žádné hodnoty inhibice vůči AChE nebo BuChE, ale zato vykazoval velice zajímavou cytotoxickou aktivitu proti buňkám adenokarcinomu tlustého střeva, karcinomu plic a karcinomu ledvinových buněk. Jeho strukturní analog 8-*O*-demethylmaritidin vykazoval inhibiční aktivitu vůči AChE (14).

3.2.7 Plikaminový strukturní typ

Alkaloidem plikaminového strukturního typu jsou zephykarinatin A, B a G, které byly objeveny v rostlině *Z. carinata*. Alkaloidy byly testovány na přítomnost inhibičních aktivit vůči AChE a testy byly úspěšné. Zjistilo se, že jejich inhibiční aktivity vůči AChE jsou nižší než třeba aktivita samotného galanthaminu, ale jejich struktura by se mohla potenciálně využít k přípravě účinnějších derivátů pro terapii AD (1).

3.2.8 Montaninový strukturní typ

Zástupcem montaninového strukturního typu je samotný montanin, který byl izolován z rostliny *Z. tubisphata* (1). Alkaloidy montaninového typu nesou unikátní pentacyklické 5,11-methanomorphanthridinové uskupení, které nese široké farmakologické rozmezí pro

cytotoxické, antimikrobiální a antirevmatické účinky, a dále má vysokou inhibiční aktivitu i vůči AChE a BuChE (15).

3.2.9 Narcikachninový strukturní typ

Narcieliin je zástupcem tohoto nově objeveného strukturního typu, který byl izolován z *Narcissus poeticus* a *Narcissus pseudonarcissus*. Vykazuje duální inhibiční účinnost k AChE i BuChE (2). Další zástupce narcimatulin byl izolovaný z *Narcissus pseudonarcissus* a *Zephyranthes citrina* (1). Ten byl testován pro svou aktivitu k POP, kdy bylo zjištěno, že jeho inhibiční aktivita k POP byla šestkrát vyšší než inhibice standardu ($IC_{50} = 29,2 \mu M$) (2).

3.2.10 Další strukturní typy alkaloidů z rodu *Zephyranthes*

Zephykandidin I a zephykandidin III byly izolovány z rostliny *Z. candida*, strukturní základ je složen ze dvou strukturních jader molekul typu 7-fenyl-hexahydroindolu a 5,2'-dimethyl-bifenyl-2-ylaminu. Podle dvou základních strukturních molekul tyto dvě látky spadají do mesenbrinového strukturního typu alkaloidů rodu *Zephyranthes*. Alkaloidy vykazovaly v testech silnou inhibiční aktivitu k AChE s hodnotou $IC_{50} = 8,82 \mu M$. Díky tomu můžeme strukturní typ molekuly 5,2'-dimethyl-bifenyl-2-ylamin zařadit mezi další potenciální adepty v terapii AD (16).

3.3 Alzheimerova choroba

Příznaky tohoto závažného neurodegenerativního onemocnění poprvé popsal německý psychiatr a neuropatolog Alois Alzheimer v roce 1906. Ve stejném roce jako Alois Alzheimer publikoval rovněž stejné výsledky psychiatr a neuropatolog Oskar Fischer, působící na pražské psychiatrické klinice, kde se věnoval výzkumům stejného onemocnění. AD je nejčastější ze všech demencí a čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti (17). Incidence nemoci stoupá exponenciálně s věkem. V současnosti postihuje více než 36 miliónů pacientů, v roce 2050 odhaduje světová zdravotnická organizace nárůst na 131 miliónu pacientů. Proto je nutně naléhavé hledat novou a účinnou terapii (2). Nejvýznamnější a neovlivnitelný problém je vzrůstající věk. Dalším neovlivnitelnými riziky jsou ženské pohlaví a nízký stupeň dosaženého vzdělání v mládí. Rizikové faktory částečně ovlivnitelné jsou metabolický syndrom ve středním a pozdním věku (obezita, hypertenze, diabetes, zvýšená hladina cholesterolu), kouření, nadměrná konzumace alkoholu a opakované úrazy hlavy v anamnéze. Mezi možné rizikové faktory, které zatím nebyly potvrzeny výzkumy, zahrnujeme i

perinatální faktory: porodní váha, nitroděložní vývoj fétu, počet sourozenců, pořadí narození a faktory, které ovlivňují růst i vývoj mozku v dětství (17).

3.3.1 Patofyziologie AD

Patogeneze AD je stále předmětem mnohých výzkumů, avšak stále se nepodařilo zcela objasnit všechny její příčiny a mechanismy. Nicméně existuje několik hypotéz, se kterými se pracuje. Pravděpodobně se jedná o geneticky heterogenní a multifaktoriální onemocnění (17). AD je mnohostranná porucha, která je charakterizována kumulováním extracelulárních β -amyloidních ($A\beta$) plaků, tau patologií, mitochondriální abnormalitou, snížením synaptické plasticity a neurozánětlivými procesy, které ničí neurony a brání tak schopnosti pamatovat si a ukládat nové informace (8).

Nejsilnějším rizikovým faktorem je stárnutí, prevalence u jednotlivých pacientů se odhaduje na 10 % nad 65 let a 40 % u pacientů starších 80 let (18). Důležitou roli v onemocnění hrají reaktivní formy kyslíku, způsobující peroxidaci lipidů buněčné membrány, dále zvýšené hladiny vápníku uvnitř buňky a nadměrná aktivace receptorů po excitaci neurotransmitery (17).

Aminokyselina L-glutamát je hlavní excitační neurotransmitter a její krátkodobé uvolňování je důležité pro procesy učení a paměť. Jednou z příčin AD je vysoká koncentrace glutamátu v buňkách a v závislosti na glutamátu se zvyšuje i hladina vápníku v buňce a vznikne tak nerovnováha mezi draselnými ionty s ionty sodíku oproti hladinám vápníku. Tyto všechny procesy přispívají ke zvýšené aktivitě nukleas, fosfatasy a proteas, což vede k apoptóze a smrti buňkách v neuronech.

Cholinergní hypotéza naznačuje, že dochází ke snížení hladiny acetylcholinu v mozku, kdy také dochází ke snížení kognice (8). Makroskopicky nalézáme ztenčení mozkové kůry, rozšířené sulky a rozšíření mozkové kůry. Atrofie je i v oblasti hipokampu. U zemřelých nemocných nalézáme v mozkové tkáni dva významné morfologické projevy: extracelulární amyloidní plaky (nerozpustné $A\beta$ plaky) a intraneuronální neurofibrilární klubíčka (nerozpustný tau-protein). Tělu vlastní $A\beta$ vzniká z transmembránového amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který za normálních podmínek by byl štěpen alfa-sekretasou na krátké fragmenty o 40 aminokyselinách. Výzkumy se shodují, že působí v těle neuroprotektivně a zřejmě ovlivňuje neuroplasticitu mozkové tkáně. Největší změnou v mozkové tkáni u AD zůstává akumulace tau-proteinu.

Tau-protein byl poprvé objeven v polovině 70. let 20. století. Jedná se o rozpustný a tepelně stabilní fosfoprotein, který je asociovaný s mikrotubuly. Zjistilo se, že v mozku pacientů s Alzheimerovou demencí je tau-protein fosforylován čtyřikrát více než v mozku zdravých lidí. Změny ve struktuře nebo množství tau-proteinu ovlivňují jeho roli při interakci s tubuly. Díky poruchám mikrotubulové sítě v ovlivněných neuronech se oslabuje axonální transport, který vede k retrográdní degeneraci jež způsobuje demenci. Tau-konformace a tau-patologie jsou možné popsat díky vysokému stupni rozlišení nukleární magnetické resonance (17). Apolipoprotein E (ApoE) je bílkovina, který je mediátorem metabolismu lipidů a zároveň se podílí na polymerizaci rozpustných fragmentů APP. Takto polymerovaný A β tvoří jádra, okolo nich dochází k neurodegeneraci, vzniká gliový lem a sterilní zánět. V oblasti plaku je spuštěna zánětlivá reakce, uvolnění cytokinů, volných radikálů a dalších neurotoxických produktů.

Z praktického hlediska dělíme AD podle dvou kritérií: podle začátku onemocnění (časná forma a pozdní forma) nebo podle dědičnosti (familiární forma a sporadická forma). Familiární formu bereme v úvahu, jestliže se v rodině vyskytuje AD minimálně ve dvou po sobě jdoucích generacích. Sporadickou formou rozumíme formu bez rodinného výskytu. Méně než 5 % pacientů trpí formou s časným začátkem a familiárním výskytem, 15–25 % má formu s pozdním začátkem a familiárním výskytem, 75 % trpí sporadickou formou s pozdním začátkem. Dosud byly popsány pouze 4 geny, kdy jejich mutace vede k familiární AD s časným začátkem: jedná se o amyloidový prekurzorový protein lokalizovaný na chromozomu 21, onemocnění začíná kolem 49. roku věku; presenilin 1 (PSEN1), lokalizovaný na chromozomu 14, onemocnění začíná kolem 44–46 roku a postiženo je cca 315 rodin; presenilin 2 (PSEN2) na chromozomu 1, začátek onemocnění kolem 58–59 lety a postiženo je kolem 18 rodin; posledním genem je gen pro tau-protein lokalizovaný na chromozomu 17 (17).

Pro stanovení diagnózy AD musí být splněna obecná kritéria pro demenci a zároveň musíme vyloučit jinou možnou příčinu demence, např. infekční onemocnění, cerebrovaskulární onemocnění, normotenzní hydrocefalus, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova nemoc, nedostatek vitamínu B12 nebo nedostatek kyseliny listové. Proto by měli pacienti s poruchami paměti podstoupit alespoň vyšetření CT mozku (pro vyloučení jiné příčiny demence – tumory, intrakraniální hematomy nebo vaskulární poruchy), vyšetření pomocí metody SPECT/PET pro detekci hypometabolismu parietálních a temporálních laloků. Dalším důležitým vyšetřením je psychologické a klinické testování k posouzení kognitivních

kategorií jako je paměť, pozornost, vnímání, řeč, konstrukční dovednosti, prostorová orientace, schopnost řešit problémy a schopnost normálního fungování. Je nutné dostatečně využít všechny testovací metody jako Addenbrookský test, který má v sobě známý test MMSE (Mini-Mental State Examination).

Faktory podporující diagnózu pravděpodobné AD jsou pozitivní rodinná anamnéza, snížení specifických kognitivních funkcí a motorických dovedností, průkaz mozkové atrofie zobrazovacími metodami (CT, MRI), postupné zhoršování schopností aktivit denního života, poruchy nálady – deprese, poruchy spánku – nespavost a obrácený spánkový režim, poruchy vnímání a myšlení, sexuální poruchy, neurologické příznaky, poruchy chůze, svalová rigidita, myoklonus, epileptické záchvaty, inkontinence a kachektizace. Nesmíme také opomenout nová diagnostická kritéria jako poruchy epizodické paměti, likvorový triplet proteinů (vzestup tau a fosfo-tau-proteinu a pokles A β), na MRI scanu snížený objem hipokampu, rozšíření temporálních rohů postranních komor, metoda PET – zjištění depozit A β v kortexu a prokázání hypometabolismu frontoparietálně. Pozornost také musíme věnovat biomarkerům AD a mechanismům vedoucím k poškození neuroplasticity a neurogeneze. Imunoneuroendokrinní a neurochemické cesty vedoucí k neurodegeneraci jsou propojeny přes vzájemné ovlivňování funkcí neurotransmiterových systémů a osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (HPA). Patofyziologické mechanismy AD zvyšují aktivitu osy HPA, chronické zánětlivé procesy, zvýšený oxidační a nitrosační stres, narušenou neuroplasticitu a neurogenezi. Biologicky aktivními molekulami studovanými při patogenezi AD jsou glukokortikoidy, prozánětlivé cytokiny, transkripční faktor (CREB) aktivovaný díky odezvě na zvýšení cAMP (cyklický adenosin monofosfát), mozkový neurotrofní faktor (BDNF) a GSK-3 β . Biochemické markery jsou odebírány z periferní krve a řadíme k nim: uptake serotoninu do krevních destiček, aktivitu monoaminoxidasy, plazmatickou koncentraci homocysteinu a kortizolu. Důležitým markerem aktivity osy HPA je zvýšený plazmatický kortizol. Kortizol je syntetizován z cholesterolu v kůře nadledvin (17). Hlavními stimuly pro jeho uvolnění jsou stres, adrenalin, vasopresin, pyrogeny, bolest a hypoglykémie. Denní produkce kortizolu má diurnální rytmus, kdy maxima dosahuje mezi 7. a 9. hodinou ráno a minimum má mezi 16. a 18. hodinou. Vyšší hladina kortizolu je tedy asociována s porušenou deklarativní paměťovou funkcí i u osob bez známek demence a vysoká koncentrace slinného kortizolu predikuje pokles paměťových schopností pro nejbližší 2–3 roky.

Pro regulaci mozkových funkcí je určující degradace a zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů, což je zajištěno monoaminoxidásou (MAO) a membránovými přenašeči.

Vedlejším produktem reakcí katalyzovaných MAO jsou látky s neurotoxickým potenciálem jako je peroxid vodíku, aldehydy a amoniak. Proto jsou inhibitory MAO účinné v terapii různých neuropsychiatrických poruch, zeslabují oxidační stres a mají dobrý antidepressivní a neuroprotektivní účinek.

Druhým důležitým markerem, který se podílí na aktivitě osy HPA, je již zmíněný homocystein, který se vyskytuje v živých buňkách všech vyšších organismů a účastní se základních životních procesů (hospodaření s kyslíkem, řízení tvorby energie, syntéza a recyklace klíčových metabolitů a rozmnožování buněk). Normální hodnoty homocysteinu jsou až do 40 let věku stabilní, pak rázem začnou prudce stoupat, především po 70. roce věku. Metabolismus homocysteinu závisí na přítomnosti vitamínů B, nedostatek těchto vitamínů vede ke zvyšující se koncentraci homocysteinu samotného.

U pacientů s AD byla zjištěna atrofie mediotemporálního laloku a zmenšení šířky hipokampu, což je považováno za hlavní příčinu poruch paměti. Vliv hyperhomocysteinémie na mozkové cévy a neurony je obrovský, přičemž bylo potvrzeno, že hlavní roli v těchto změnách hraje oxidativní stres (17). Nevhodným faktorem pro rozvoj AD je i polyfarmakoterapie u starších pacientů, kterou je potřeba kontrolovat, jak při výdeji léčiv běžně v lékárně, tak i v ordinacích pediatrických lékařů. Potenciálně nevhodné léky u AD jsou difenhydramin užívaný v kombinaci s acetaminofenem pro léčbu bolesti a nespavosti, benzodiazepiny proti úzkosti a anticholinergika (oxybutinin, tamsulosin) na terapii močové inkontinence (19).

3.3.2 Farmakoterapie

Léky dnešní doby zahrnují pouze symptomatickou léčbu a jsou určeny k léčbě kognitivních symptomů (poruchy paměti, poruchy vnímání). Používají se léky, které se dělí na 2 hlavní skupiny. NMDA antagonisté a inhibitory AChE, které jsou odvozeny od struktury amarylkovitých alkaloidů a jejich hlavním zástupcem je galanthamin. Dalšími zástupci těchto léčiv jsou rivastigmin, donepezil a takrin (8).

Nejčastějšími nežádoucími účinky inhibitorů acetylcholinesteras (iAChE), které jsou právě spojeny s cholinomimetickými účinky jsou průjem, nevolnost a zvracení. Podávání léků po jídle může tyto nežádoucí účinky zmírnit nebo úplně vymazat. Nežádoucí účinky postihují přibližně 5 až 20 % pacientů, ale většinou jsou přechodné a mírné. Proto terapeutická dávka iAChE by měla být pomalu titrována v průběhu měsíců až let na maximální tolerovanou dávku. IACHÉ jsou kontraindikovány u pacientů se stavy těžké srdeční arytmie, bradykardie,

synkopy a dále u pacientů s aktivním peptidickým vředem nebo s krvácením do GIT. Galanthamin, rivastigmin a donepezil mohou být podávány perorálně, ale můžeme se setkat i s jinými lékovými formami, například rivastigmin se může podávat ve formě transdermální náplasti. Farmakokinetika iAChE se liší primární cestou eliminace. Donepezil a galanthamin jsou metabolizovány přes játra, zatímco u rivastigminu je přítomen jaterní i střevní metabolismus. Donepezil a galanthamin inhibují selektivně i reverzibilně AChE, zatímco rivastigmin je pseudoreverzibilní inhibitor AChE a BuChE. Donepezil má dlouhý eliminační poločas 70 hodin oproti galanthaminu, který má poločas eliminace 6 až 8 hodin. Eliminační poločas rivastigminu je velice krátký a záleží i na způsobu podání, jestli se jedná o perorální podání 1–2 hodiny nebo transdermální podání 3–4 hodiny (19).

Takrin, který inhiboval pseudocholinesterasu, se mohl podávat jak perorálně tak intravenózně. Bohužel takrin měl obrovské množství nežádoucích účinků jako například: nevolnost, zvracení, průjem, nemotornost a jaterní cytotoxicitu, takže jeho užívání bylo nakonec v roce 2013 zcela ukončeno.

Jediným zástupcem antagonistů NMDA-receptoru je memantin, který blokuje zvýšené hladiny patologického glutamátu. Má několik lékových forem jako jsou tobolky s postupným uvolňováním, roztok anebo tablety, u kterých se musí postupně zvyšovat dávka, než se dosáhne dávky udržovací. Memantin se podává pacientům, kteří trpí středně těžkou až těžkou AD. Má spoustu nežádoucích účinků: závratě, bolesti hlavy, zmatenost, průjem, zácpa; méně častými nežádoucími účinky jsou: hypertenze, přibývání na váze, halucinace, zmatenost, agresivní chování, bolesti břicha a inkontinence moči (20).

Léčiva necílí pouze na enzym AChE, ale i na další enzym BuChE, který je také schopen hydrolyzovat acetylcholin. Hladiny BuChE jsou zvýšeny hlavně v pozdějším stádiu onemocnění, proto se BuChE jeví nejen jako další vhodný cíl pro obnovu hladin acetylcholinu v mozku, ale také jako látka modifikující onemocnění použitelné v prodromálních stádiích AD (20).

Další schválenou léčbou AD je fixní kombinace donepezilu a memantinu pro pacienty se středně těžkou až těžkou demencí AD, kteří jsou stabilizováni terapií donepezilem. V současné době na poli klinické farmacie probíhá tzv. doplňková modifikující terapie (DMT), která cílí na odlišná místa v mozkové tkáni jako například tau-protein, A β protein, tyrosin-kinasové receptory nebo prozánětlivé cytokiny a dále se kombinuje se základní léčbou AD. Doplňkovou léčbou můžeme chápat látky ze skupiny humanizovaných nebo plně

lidských monoklonálních protilátek proti A β proteinu, který vede ke zvýšení hladiny amyloidu (gantenerumab, crenezumab) (21).

Cromolyn je lék na astma schválený americkou FDA a je strukturně podobný anti-amyloidním látkám a proniká krví přes mozkovou bariéru. Cromolyn je schopen v mozku snižovat koncentraci a fibrilaci patologických variant A β ₄₀ a A β ₄₂ (21).

Prolyloligopeptidasa (POP) je cytosolická serin proteasa, která katalyzuje štěpení bioaktivních látek obsahující prolin peptidy na C-konci vnitřních prolinových zbytků. Nalezneme ji skoro ve všech orgánech těla včetně mozku. POP souvisí s učením a pamětí a může tak představovat zajímavou alternativu v léčbě AD (2).

Novými léky na poli farmakoterapie AD jsou lipozomy, které jsou modifikovány sojovým fosfatidylcholinem, cholesterolem, tetradecyltrifenylfosfonium bromidem s duálním plněním tokoferolu v lipidové dvojvrstvě a donepezil hydrochloridem v hydrofilním jádře, který se aplikuje intranazálně. Nanočástice modifikované kationtovým surfaktantem lépe pronikají do mitochondrií motoneuronů a zlepšují schopnosti učení a snížení rychlosti tvorby plaků v hipokampu. Studie od Eli Lilly se zaměřila na výzkum bezpečnosti a účinnosti pasivní imunizaci amyloidem, buďto samostatně nebo v kombinaci s inhibítozem receptorů BACE 1. Oba léky prošly klinickými studiemi samostatně jako monoterapie, nicméně se bude testovat jejich synergický účinek. Důvodem tohoto výzkumu je vyvolání imunitní odpovědi na A β a zpomalení další produkce apolipoproteinu v mozku. Inhibicí BACE 1 se předpokládá, že bude mít větší vliv na amyloidní kaskádu, než na zacílení kteréhokoliv jiného samostatného mechanismu (21).

Novým lékem schváleným v červnu roku 2021 americkou FDA je aducanumab. Aducanumab (Aduhelm®) je monoklonální protilátka, která je selektivní pro agregáty A β . Jedná se o první lék, který se zaměřuje na základ patofyziologie AD. Účinek aducanumabu je založen na schopnosti odstranit A β plaky. Rozhodnutí o schválení toho léku vyvolalo značnou kontroverzi, protože dvě provedené studie vykazovaly odlišné výsledky a byly pochyby i o jeho bezpečnostním profilu. Bohužel tento lék neschválila ani Evropská agentura pro léčivé přípravky. Navzdory těmto kontroverzím se ukázalo, že aducanumab ovlivňuje patologii tau-proteinu, což by mohlo otevřít dveře k novému vnímání léčby AD. Ukázalo se, že aducanumab se specificky zaměřuje na agregáty A β a má pravděpodobně neuroprotektivní aktivitu. Tyto agregáty, zejména rozpustné oligomery, jsou nejvíce neurotoxicke formy A β , zatímco monomerní A β má pravděpodobně neuroprotektivní aktivitu a podporuje clearance

agregátů A β spuštěním mikrogliaální fagocytózy. Lék se podává jako intravenózní infuze po dobu 45–60 minut každý měsíc (22).

Další novinkou na poli léčby AD je lecanemab (LEQEMBI™). Je to humanizovaný imunoglobulin gama 1 (IgG1) proti agregovaným rozpustným i nerozpustným formám A β proteinu. Léčba lecanemabem by měla být zahájena u pacientů s mírnou kognitivní poruchou nebo mírným stádiem demence a potvrzenou přítomností patologie A β . Eliminační poločas lecanemabu je 5–7 dní. Podává se v dávce 10 mg/kg každé 2 týdny. Nežádoucí účinky jsou hlášeny u 88,9 % – jedná se o bolest hlavy, cerebrální makrohemoragii, superficiální siderózu, síňové fibrilace, synkopa a angina pectoris. Lék byl schválen 6. ledna 2023 pro léčbu AD v USA v rámci zrychlené cesty schvalování (23).

Donanemab se ukazuje jako slibný kandidát pro významné snížení cerebrálních amyloidních depozit. Je to humanizovaná protilátka působící proti N-zkrácenému pyroglutamátovému A β peptidu v pozici 3. Byly provedeny celkem čtyři velké studie a do nich bylo zařazeno 396 pacientů ve věku od 69,7 do 75,2 let. Dávkovací režimy byly podávány na základě hmotnosti nebo jako fixní dávka a vše bylo podáno intravenózně. Během období předběžného testování byly u šesti pacientů ze 37-členné skupiny pozorovány nežádoucí účinky na podání infuze (zimnice, závratě, horečka, vyrážka a protilátky v plazmě). Pacienti, kteří byli zahrnuti do studie, měli prodromální, mírnou nebo střední AD a došlo k příznivému snížení hladin A β plaků, které záviselo na výchozích hladinách amyloidu, takže u pacientů s nižšími hladinami amyloidních plaků došlo k úplnému vymizení. Dalšími příznivými účinky jsou snížená akumulace celkových hladin tau a nižší funkční/kognitivní pokles. Další studie fáze III musí prozkoumat souhru mezi hladinami amyloidu a tau a stejně tak shrnout výsledky klinických studií, aby se získaly smysluplné výsledky pro pacienty s AD (24).

Dalším hráčem na poli monoklonálních protilátek je gantenerumab, plně lidská anti-amyloidní monoklonální protilátka. Je to imunoglobulin ze skupiny G1, který je navržen tak, aby podporoval clearance amyloidních plaků v mozku prostřednictvím disociace peptidových agregátů a fibrilární clearance A β . Díky kostře imunoglobulinu dochází k aktivaci mikrogliaální fagocytózy agregované s β -amyloidem prostřednictvím Fc receptoru gama. Má také vliv na snížení cerebrospinální tekutiny v závislosti na dávce a čase, snížení hladiny tau-proteinu a fosforylovaného tau-proteinu, snížení synaptického biomarkeru neurograninu a snížení neurofilamentního lehkého řetězce (NfL). V klinických studiích se uvažuje o podávání gantenerumabu subkutánně, protože infuze z hlediska zdravotního systému je vysoce nákladná

a pacient je neustále závislý na lékaři nebo ošetřovateli. Zatím je lék ve fázi klinických studií, ale jeho potenciál a potenciál monoklonálních látek obecně při farmakoterapii AD je obrovský (25).

Nefarmakologická léčba AD zahrnuje dietní opatření, které sehrává důležitou roli na poli prevence proti rozvoji demence v pokročilém stadiu věku. Dietními opatřeními se myslí: omega-3,6 nenasycené mastné kyseliny zajišťující správné ukládání energie a mající klíčovou roli v integritě, vývoji, udržování neuronů a funkcí, včetně synaptických procesů a neuronového růstu; rybí olej je vynikajícím zdrojem DHA (dokosahexaenová kyselina), která má neuroprotektivní účinky, podporuje synaptickou plasticitu a má klíčovou roli při stárnutí, paměti, zraku a regeneraci rohovkového nervu (26).

Dalšími nefarmakologickými postupy při léčbě AD je aerobní cvičení, které má ochranný účinek na kognitivní funkce u starších pacientů. Spánek ovlivňuje řadu biologických procesů v organismu, proto je velice důležitým faktorem pro prevenci AD. V posledních letech se výzkum zaměřil i na neuroprotektivní aktivitu spánkového hormonu melatoninu. Melatonin totiž moduluje expresi a funkci sekretasy, zlepšuje neurotoxicitu indukovanou A β a podporuje clearance A β prostřednictvím lymfatické drenáže. Díky melatoninu se zkoumají i alternativní postupy při léčbě AD jako je terapie jasným světlem anebo agonisté melatoninu: ramelteon, agomelatin a tasimelteon. Alternativou pro léčbu doprovázejících symptomů AD jako je úzkost a deprese, se využívá aromaterapie, terapie hudbou anebo ergoterapie (20).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení

4.1.1 Chemikálie pro izolaci a stanovení struktury alkaloidů

- Aceton ACS čistota (VWR International, Francie), (Me₂CO)
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) (MeCN)
- Amoniak 25% vodný roztok p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (NH₃)
- Benzin lékařský RN (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha)
- Cyklohexan p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (C₆H₆)
- Diethylamin p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (Et₂NH)
- Diethylether p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (Et₂O)
- Dichlormethan (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (CH₂Cl₂)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- Ethanol absolutní ACS čistota (VWR International, Francie)
- Ethylacetát HPLC gradient (VWR International, Francie) (EtOAc)
- *n*-Hexan (Lach-Ner, Neratovice) (C₆H₁₄)
- Chloroform čistý (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (CHCl₃)
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom% D (Sigma-Aldrich, Praha) (CDCl₃)
- Jodid draselný čistý (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (HCl)
- Kyselina mravenčí LC/MS gradient (VWR International, Francie) (HCCOH)
- Kyselina trifluoroctová, ReagentPlus®, 99% (Sigma-Aldrich, Německo) (TFA)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- Methanol HPLC gradient (VWR International, Francie) (MeOH)
- Methanol LC/MS (VWR International, Francie)
- Methanol p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha)
- Toluén p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (C₆H₅CH₃)
- Uhličitan sodný bezvodý p. a. (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha) (Na₂CO₃)

4.1.2 Chemikálie a enzymy pro měření inhibice cholinesteras

- 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoová) kyselina (Sigma-Aldrich, Praha) (DTNB) (Ellmanovo činidlo)
- Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, Praha) (ATCh)
- Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, Praha) (BuTCh)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (DMSO)
- Eserin (Sigma-Aldrich, Praha)
- Fosfátový pufr (pH = 7,4), (Sigma-Aldrich, Praha)
- Galanthamin (Sigma-Aldrich, Praha)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2PHO_4)
- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- Lidská rekombinantní acetylcholinesterasa (Sigma-Aldrich, Praha) (*hAChE*)
- Lidská rekombinantní butyrylcholinesterasa (Sigma-Aldrich, Praha) (*hBuChE*)

4.1.3 Pomocný materiál pro izolaci a určení struktury alkaloidů

- Analytické TLC desky Silica gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 (Merck, Německo)
- Běžné laboratorní sklo
- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)
- Neutrální oxid hlinitý (63–200 m) (Lach-Ner, Neratovice)
- Silikagel Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, Německo)
- Silikagel (63–200 m) (Fluka, USA)
- Silikagel sušící perly (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha)

4.1.4 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule *Zephyranthes citrina* dodala firma Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Záložní vzorek je uchován v herbáriu Katedry farmakognosie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod kódem: CUFPH-16130/AL-212.

4.1.5 Přístroje a software

- Spektrometr MS-EI na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr MS-ESI Waters Acquity qDa a detektor s diodovým polem Waters 2998 na HPLC systému Waters Autopurification™ (Milford, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- Rotační vakuová odparka (RVO 004, INGOS, Praha)
- Rotační vakuová odparka pro poloprovozní použití (Laborota 20 Heidolph, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Německo)
- UV reader Synergy HT (Biotec, USA)
- GraphPad Prism v. 6,07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů

Zásobní roztok se připraví smísením roztoku A (1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody) a roztoku B (roztok 32 g KI v 80 ml vody) v poměru 1:1. Detekční roztok pro postřik TLC desek je připraven smísením 10 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody s 5 ml zásobního roztoku. Zásobní roztok i detekční roztok je skladován při teplotě 4 °C, nejlépe v lednici a není zbytečně vystavován slunečním paprskům. Detekční roztok s TLC deskami tvoří při nálezu alkaloidů tmavě červené až hnědé skvrny na světle žlutém pozadí.

4.2.2 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Preparativní TLC desky byly připraveny nalitím a rozprostřením suspenze komerčního silikagelu Kieselgel 60 GF₂₅₄ v destilované vodě na skleněnou desku. Na skleněné desky otřeny ethanolem s rozměrem 15 × 15 cm byla nalita suspenze v poměru 6,5 g silikagelu a 18,5 ml vody. Desky byly před použitím vysušeny volným ponecháním při laboratorní teplotě po dobu minimálně 24 hodin.

4.2.3 Preparativní TLC

Preparovaná směs alkaloidů byla rozpuštěna v chloroformu a ethanolu v objemovém poměru 1:1 s její výslednou koncentrací 5–8 % a v tenkém pruhu (1,5 cm od spodní hrany a 1 cm od okrajů desky) nanášecím perem na chromatografickou desku. TLC desky byly vyvíjeny v chromatografických komorách nasycených parami použité vyvíjecí soustavy. Množství desek pro preparativní TLC bylo počítáno pro každou preparativní tenkovrstvou chromatografii tak, aby množství dělené směsi nepřesáhlo 3 mg/cm u litých desek a 1 mg/cm u komerčních desek. Po vyvíjení byly desky sušeny volně v digestoři nebo fénem. Detekce zón byla provedena pod UV světlem ($\lambda = 254 \text{ nm}$, $\lambda = 366 \text{ nm}$). Zóna s alkaloidy byla detekována postřikem krajní části desky pomocí Dragendorffova činidla. Separované zóny se stejným retenčním faktorem byly vyškrábány a byla provedena eluce separovaných zón. K separovaným zónám se přidala křemelina v poměru 1:1 a došlo k promytí směsi rozpouštědly chloroformu a ethanolu (1:1) v chromatografické koloně za sníženého tlaku. Objem směsi elučních rozpouštědel tvořil 15-ti násobek objemu eluovaného adsorbentu. Na konci byla ještě směs promyta 5-násobným objemem čistého ethanolu, aby došlo k úplnému vymytí látek ze směsi.

4.2.4 Analytická metoda TLC

Průběžná analytická/kontrolní TLC byla provedena v průběhu experimentální práce za laboratorních podmínek v chromatografických komorách, které byly nasyceny parami připravovaných mobilních fází. Použity byly komerční analytické desky TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 20 × 20 cm. Desky byly stříhány na výšku 10 cm se šířkou dle potřeby.

4.2.5 Analytická metoda HPLC/MS-ESI

Vzorky (0,2–0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC/MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC/MS (Milford, USA). Přístroj je složen z modulů Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm × 4,6 mm, 5 μm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly využity voda s 0,1 % kyselinou mravenčí (rozpouštědlo A) a methanol s 0,1 % kyselinou mravenčí (rozpouštědlo B) s průtokem mobilní fáze 1 ml/min. Eluční program s gradientem byl naprogramován (v/v): 0 min 5 % B, 5 min 100 % B, 8,5 min 5 % B, poté 1,5 min v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů

byly MS/ESI byly: kapilární napětí 0,8 kV; teplota próby byla 600 °C; kuželové napětí 15 V. HPLC/MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200 do 800 *m/z*. Pro detekci byl rozsah PDA detektoru nastaven od $\lambda = 190$ do $\lambda = 700$ nm. HPLC/MS-ESI analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu.

4.2.6 Preparativní HPLC

Množství vzorku bylo rozpuštěno v MeOH čistoty LC/MS v koncentraci cca 10 mg/ml. Separace byla provedena na stejném systému jako analytická HPLC. S podmínkami přizpůsobenými pro preparační proces. Byla použita kolona s větším průměrem XSelect® CSH™ Prep C18 OBD™ (100 mm × 19 mm, 5 μ m) (Milford, USA). Mobilní fáze byly opět použity voda s 0,1 % kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a methanol s 0,1 % kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 25 ml/min s nastříknutým objemem vzorku 900 μ l a eluční program s gradientem pro preparační podmínky byl nastaven (v/v): 0 min 0 % B, 8 min 26,7 % B, 9 min 0 % B.

4.2.7 Analýza GC/MS-EI

Vzorky pro analýzu (0,2–0,5 mg) byly rozpuštěny v 1 ml MeOH čistoty LC/MS a změřeny na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC 5975 s kolonou HP-5. Na kolonu byl aplikován objem 1 μ l analyzovaného vzorku se splitem 1:10 při teplotě 280 °C. Pro analýzu byl použit tento teplotní gradient: 0 min 100 °C, 1 min 180 °C, 15 min 300 °C. Nosným plynem bylo helium s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací při 70 eV. Výsledky analýz izolovaných alkaloidů byly porovnány s knihovnou spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA).

4.2.8 Analýza NMR

Vzorky (5–10 mg) byly rozpuštěny v CDCl₃ a jejich NMR spektra změřena na přístroji VNMR S500 s frekvencí magnetického pole 499,87 MHz pro jádra ¹H a frekvencí 125,70 MHz pro jádra ¹³C. Pro ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty OneNMR a hodnota chemických posunů byla naměřena jako δ ppm (pars per milion) nepřímou vztažena ke standardu TMS (tetramethylsilan) pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Pro rozpouštědlo CDCl₃ jsou chemické hodnoty posunu pro atom ¹H $\delta = 7,26$ ppm a pro atom ¹³C $\delta = 77,0$ ppm. Zisk dat z měření je uveden v pořadí: chemický posun δ , integrovaná intenzita světél ¹H, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet

dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a integrační konstanta J [Hz]. Měření bylo provedeno za laboratorní teploty 25 °C.

Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty gCOSY, gHSQC, gHMBC a NOESY byly měřeny standardními sekvencemi dodanými firmou Varian. Parametry měření byly stanoveny podle množství vzorku, jeho čistoty a molekulové hmotnosti.

gCOSY (gradient correlation spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes 3 vazby, $3J_{HH}$.

gHSQC (gradient heteronuclear single quantum coherence): jedna osa představuje 1H a druhá ^{13}C . Tato spektra představují korelace mezi H a C přes jednu vazbu.

gHMBC (gradient heteronuclear multiple bond coherence): technika, která pomáhá určit korelace H s C přes 3 vazby (případně i přes 2 nebo 4 vazby).

NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony od sebe vzdálenými do 6 Å a jeho intenzita klesá se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru.

4.2.9 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost izolovaných alkaloidů rozpuštěných v MeOH byla změřena pomocí polarimetru P3000 jako specifická otáčivost podle následujícího vzorce:

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

kde t je teplota při měření [°C]; D je vlnová délka D-linie sodíkového polarizovaného světla ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$); a je naměřená optická otáčivost [°]; c je koncentrace dané látky [g/100 ml]; l je délka měřicí kyvety [dm]. Výsledek byl vypočítán jako průměr z pěti měření.

4.2.10 Měření inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám

4.2.10.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterasám

Ke stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči rekombinantní hAChE a rekombinantní hBuChE byla použita modifikovaná Ellmanova metoda. Měření bylo provedeno na 96-jamkových mikrodestičkách z polystyrenu (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Medium bylo složeno z 10 μ l roztoku cholinesterasy o potřebné aktivitě, 20 μ l DTNB (0,1 M) a 40 μ l fosfátového pufru (0,1 M). Roztoky testovaných alkaloidů (10 μ l v několika koncentracích potřebných k sestavení inhibiční křivky IC₅₀) byly 5 min v testovacím mediu preinkubovány a poté bylo přidáno 20 μ l substrátu (0,01 M ATCh, nebo BuTCh), které zahájilo reakci. Měření probíhalo 1 min při vlnové délce světla $\lambda = 412$ nm na přístroji Multimode microplate reader Synergy 2 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA). Pro výpočet naměřené aktivity byl použit následující vzorec:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_o}\right) \times 100$$

kde ΔA_i vyjadřuje změnu absorbance přímo úměrné inhibici enzymu a ΔA_o znázorňuje změnu absorbance slepého vzorku, kdy místo roztoku inhibitor byl přidán stejný objem fosfátového pufru. Čím větší je inhibice enzymu, tím menší je nárůst absorbance. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako IC₅₀ a porovnána s referenčními standardy známých inhibitorů (galanthamin, eserin). K výpočtům byl použit program GraphPad Prism v. 6.07 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.2.10.2 Roztoky činidel pro měření inhibiční aktivity hAChE a hBuChE

Roztok 5 mM DTNB byl připraven rozpuštěním naváženého množství DTNB ve 100 mM fosfátovém pufru o pH 7,4. Roztok byl čirý a až mírně nažloutlý. Roztok uchován při teplotě 4 °C v lednici maximálně po dobu jednoho týdne.

Roztok 10 mM ATChI byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství dané látky ve vodě, aby byla výsledná koncentrace 10 mM. Připravený čirý roztok byl uchován v lednici při teplotě 4°C po dobu jednoho týdne.

Roztok 10 mM BuTChI byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství dané látky ve vodě, aby se dosáhlo výslední koncentrace 10 mM. Připravené čiré činidlo bylo uchováno při 4 °C v lednici maximálně po dobu jednoho týdne.

4.2.10.3 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr o koncentraci 100 mM s pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A byl 200 mM roztokem NaH_2PO_4 (1 l roztoku obsahoval 24,0 g NaH_2PO_4). Zásobní roztok B byl 200 mM roztokem Na_2HPO_4 (1 l roztoku obsahoval 28,4 g Na_2HPO_4).

4.2.10.4 Příprava enzymů

Enzymy byly připraveny rekombinantní technologií na Katedře chemie Přírodovědecké fakulty, Univerzity Hradec Králové. Bylo použito médium obsahující enzymy, které byly v čas potřeby naředěny 100 mM fosfátovým puforem o pH 7,4 tak, aby bylo dosaženo hodnoty absorbance pro AChE 0,08–0,15 a pro BuChE 0,15–0,20. Médium bylo podle potřeby rozděleno, zamraženo a uchováváno při teplotě $-22\text{ }^\circ\text{C}$ do doby použití.

4.2.10.5 Stanovení vlastní aktivity enzymů

Do šesti jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 8,3 μl fosfátového roztoku lidské rekombinantní cholinesterasy (*hAChE* nebo *hBuChE*), bylo přidáno 283 μl 5 mM DTNB a 8,3 μl DMSO. Po promíchání byla směs inkubována v komoře readeru při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 33,3 μl roztoku substrátu (10 mM ATCh nebo BuTCh) a byla změřena absorbance při vlnové délce světla $\lambda = 412\text{ nm}$ v časovém rozmezí 1 minuty. Byla stanovena aktivita a vypočten průměr se směrodatnou odchylkou.

4.3 Izolace alkaloidů ze *Zephyranthes citrina*

4.3.1 Vytvájecí soustavy pro preparativní a analytickou metodu TLC

- S1: To : EtOAc : DEA (60 : 30 : 10)
- S2: EtOAc : MeOH : DEA (45 : 5 : 2,5)
- S3: cHx : EtOAc : IPA : DEA (45 : 45 : 5 : 5)
- S4: cHx : EtOAc : IPA : DEA (25 : 65 : 5 : 5)
- S5: AcN : MeOH : TFAA (10 : 40 : 0,1)
- S6: EtOH : MeOH : DEA (180 : 20 : 6)
- S7: EtOH : MeOH : DEA (45 : 5 : 1,5)
- S8: EtOAc : MeOH : NH_3 (100 : 8 : 3)
- S9: CHCl_3 : MeOH : TFAA (40 : 5 : 0,2)

- S10: EtOAc : MeOH : H₂O (17 : 3 : 2)
- S11: EtOAc : MeOH : H₂O (50 : 6,5 : 5)
- S12: To : CHCl₃ : DEA (14 : 5 : 1)
- S13: CHCl₃ : MeOH : TFAA (20 : 25 : 1)
- S14: CHCl₃ : MeOH : TFAA (200 : 25 : 1)
- S15: AcN : MeOH : TFAA (40 : 10 : 0,1)
- S16: cHx : EtOAc : DEA (30 : 60 : 10)
- S17: cHx : EtOAc : IPA : DEA (5 : 85 : 5 : 5)
- S18: EtOAc : MeOH : H₂O (30 : 26,5 : 5)
- S19: cHx : EtOAc : To : DEA (35 : 20 : 35 : 10)
- S20: EtOAc : MeOH : H₂O (10 : 35 : 5)

4.3.2 Postup získání čistých alkaloidů

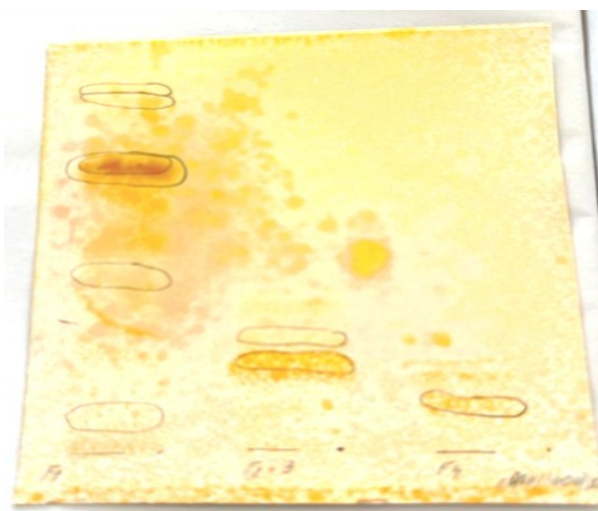
4.3.2.1 Zpracování rostlinného materiálu a příprava alkaloidního extraktu

Zpracování rostlinného materiálu i příprava extraktu nebyla předmětem této diplomové práce a byla provedena PharmDr. Eliškou Kohelovou Ph.D., která se zpracováním i přípravou zabývala ve své disertační práci (1). Pro úplnost publikace je na následujících řádcích uveden postup ve zkrácené podobě. Čerstvé cibule (35 kg) *Z. citrina* byly pokrájeny a rozemlety v mlýnku. Rozdrobněný rostlinný materiál byl 2 × extrahován dvojnásobným množstvím 95% EtOH za varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Spojené extrakty byly zfiltrvány a odpařeny za vzniku odparů ve formě hnědého sirupu. Takto připravený ethanolický extrakt byl postupně rozpuštěn v 7 litrech 5% HCl a naředěn destilovanou vodou na 10 l roztoku o pH ~ 2. Kyselý roztok byl zfiltrován přes vliselín a posléze přes vrstvu křemeliny Celite 535. Kyselý vodný roztok byl alkalizován 10% vodným roztokem Na₂CO₃ na pH 9–10 a vytřepán 4 × 12 litry CHCl₃. Organická fáze byla odpařena za zisku 312 g sumárního alkaloidního extraktu konzistence hnědého sirupu. Tento primární alkaloidní extrakt byl přečištěn vytřepáváním. Odparek byl rozpuštěn v 5 litrech 2% HCl a výsledný roztok byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535 a následně promyt 1 litrem destilované vody. Vodná fáze byla odtučněna 2 × 3 l Et₂O, alkalizována Na₂CO₃ na pH 9–10 a vytřepána 4 × 5 litry CHCl₃. Chloroformový výtřepek byl vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄ a bylo získáno 210 g alkaloidního výtřepku, který byl dále přečištěn. Alkaloidní výtřepek byl rozpuštěn ve 4 litrech 2% HCl a výsledný roztok zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535, která byla poté

promyta 0,5 litry destilované vody. Vodná fáze byla opět odtučněna 2 × 2 litry Et₂O, následně alkalizována pomocí Na₂CO₃ na pH 9–10 a vytřepána 4 × 4 litry EtOAc a 2 × 4 litry CHCl₃. Oba výtřepky byly vysušeny pomocí bezvodého Na₂SO₄ a na základě kontrolního TLC spojeny dohromady za zisku 151 g koncentrovaného alkaloidního extraktu, který byl dále podroben sloupcové chromatografii na neutrálním Al₂O₃ deaktivovaným 6 % destilované vody. Bylo získáno 21 frakcí pomocí TLC a sloupcové chromatografie (1). Z těchto frakcí byl do této diplomové práce jako výchozí materiál pro izolaci alkaloidů vybrán nezpracovaný zbytek matečného louhu spojených frakcí č. 16 a 17 (1,18 g) a matečný louh ethylacetátového výtřepku frakce č. 19 (2,57 g). Dle předběžné TLC a GC/MS analýzy bylo zjištěno, že tyto nezpracované zbytky jsou bohaté na alkaloidy a poslouží jako vhodný zdroj pro získání čistých látek.

4.3.2.2 *Vlastní izolace alkaloidů*

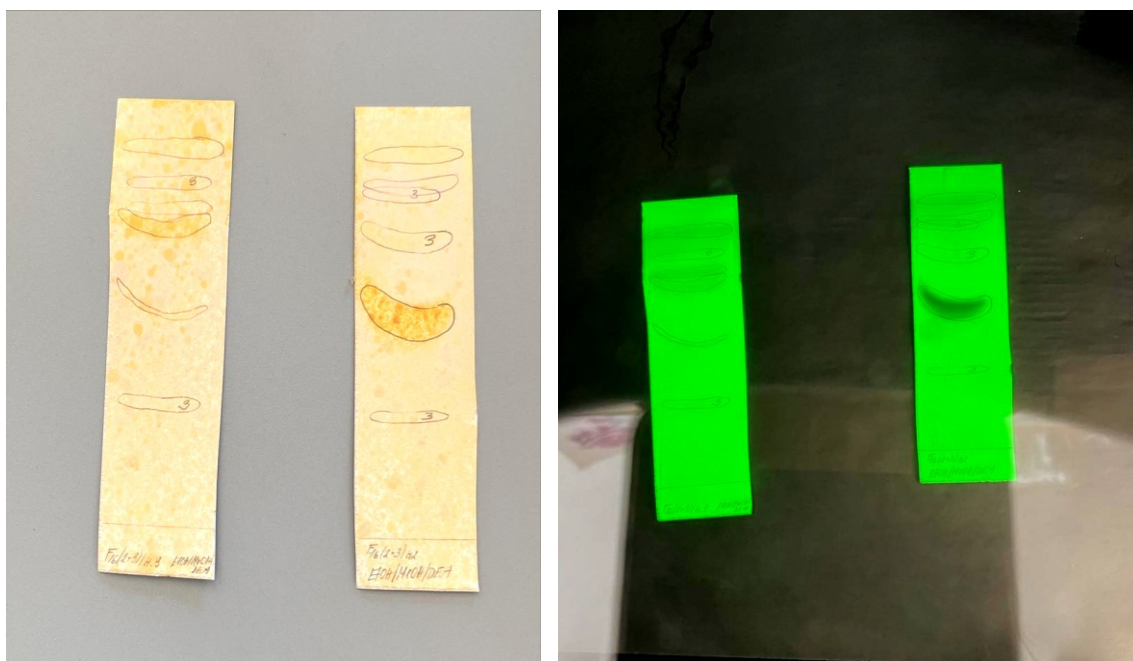
Ze zbytku matečného louhu spojených frakcí č. 16 a 17 (**F16**) bylo naváženo 0,4 mg na GS/MS analýzu. Na GS/MS analýze se objevily 2 hlavní píky, které vykazovaly předběžnou strukturu lykorinu a narcissidinu. Krystalizací z roztoku EtOH bylo z této frakce vyloučeno 486,3 mg bílé práškovité látky alkaloidní povahy (**X-1**). Následně byla provedena kontrolní analytická TLC v mobilní fázi S1 zbylého filtrátu, kde došlo k objevení 3 alkaloidních zón bez obsahu látky X-1. Následně byla provedena preparativní TLC v mobilní soustavě S2 a byly vyškrábány 3 alkaloidní zóny (**F16/1**: 64,0 mg, **F16/2+3**: 288,8 mg a **F16/4**: 339,4 mg). Následně bylo provedeno kontrolní TLC v mobilní soustavě S3 (Obr. 4).



Obr. 4 Preparativní TLC po postřiku Dragendorffovým činidlem (zóny F16/B-1, -2+3 a -4)

Alkaloidní zóna **F16/1** byla 2 × přečištěna na komerčních TLC deskách v soustavách S4 a S5 za zisku 8,3 mg potenciální látky **F16/1/A**, avšak vzhledem k malému množství vzorku a množství těžce oddělitelných nečistot nebylo bohužel možné určit její strukturu.

Alkaloidní zóna **F16/2+3** byla pomocí preparativní TLC v mobilní fázi S6 rozdělena na 2 alkaloidní podzóny (**F16/2+3/A**: 197,9 mg a **F16/2+3/B**: 25 mg). Jejich následnou kontrolní TLC v mobilních soustavách S6 a S7 zobrazuje Obr. 5. Podzóna **F16/2+3/A** při kontrolním TLC jevila pouze jednu alkaloidní skvrnu, kterou však bylo potřeba přečistit. Přečištění proběhlo nanesením na 8 litých desek při preparativní TLC v mobilní soustavě S8. Výsledný produkt bylo potřeba dále přečistit v mobilní soustavě S9. Tímto přečištěním se nakonec podařilo získat 3 další alkaloidní zóny – **F16/2+3/A/1**: 99,8 mg; **F16/2+3/A/2**: 18,4 mg a **F16/2+3/A/3**: 51,6 mg.



Obr. č. 5 Kontrolní TLC frakce **F16/2+3/A** a **/B** (zprava do leva)

Frakce **F16/2+3/A/1** byla separována na komerčních analytických TLC deskách ve vyvíjecí soustavě S10. Byly objeveny 2 alkaloidní zóny (**F16/2+3/A/1/A**: 18,7 mg a **F16/2+3/A/1/B**: 55,8 mg), které byly vyškrábány a zeluovány. Obě zóny vykazovaly podobné spektrum látek, ale bylo potřeba je přečistit.

Frakce **F16/2+3/A/1/A** byla pomocí preparativní TLC na analytických deskách s vyvíjecí soustavou S11 přečištěna za vzniku 15,2 mg čisté látky **X-2**.

Frakce **F16/2+3/A/1/B** byla preparována na TLC s vyvíjecí soustavou S12. Ve frakci byly nalezeny a získány další 2 alkaloidní zóny (**F16/2+3/A/1/B/1**: 30,5 mg a **F16/2+3/A/1/B/2**: 2,7 mg). Ze zóny **F16/2+3/A/1/B/1** se po přečištění na analytických TLC deskách povedlo získat 10,5 mg čisté alkaloidní látky, která vykazovala dle analýzy stejnou strukturu jako látka **X-2**. Ze zóny **F16/2+3/A/1/B/2** se ale získat čistou látku nepodařilo.

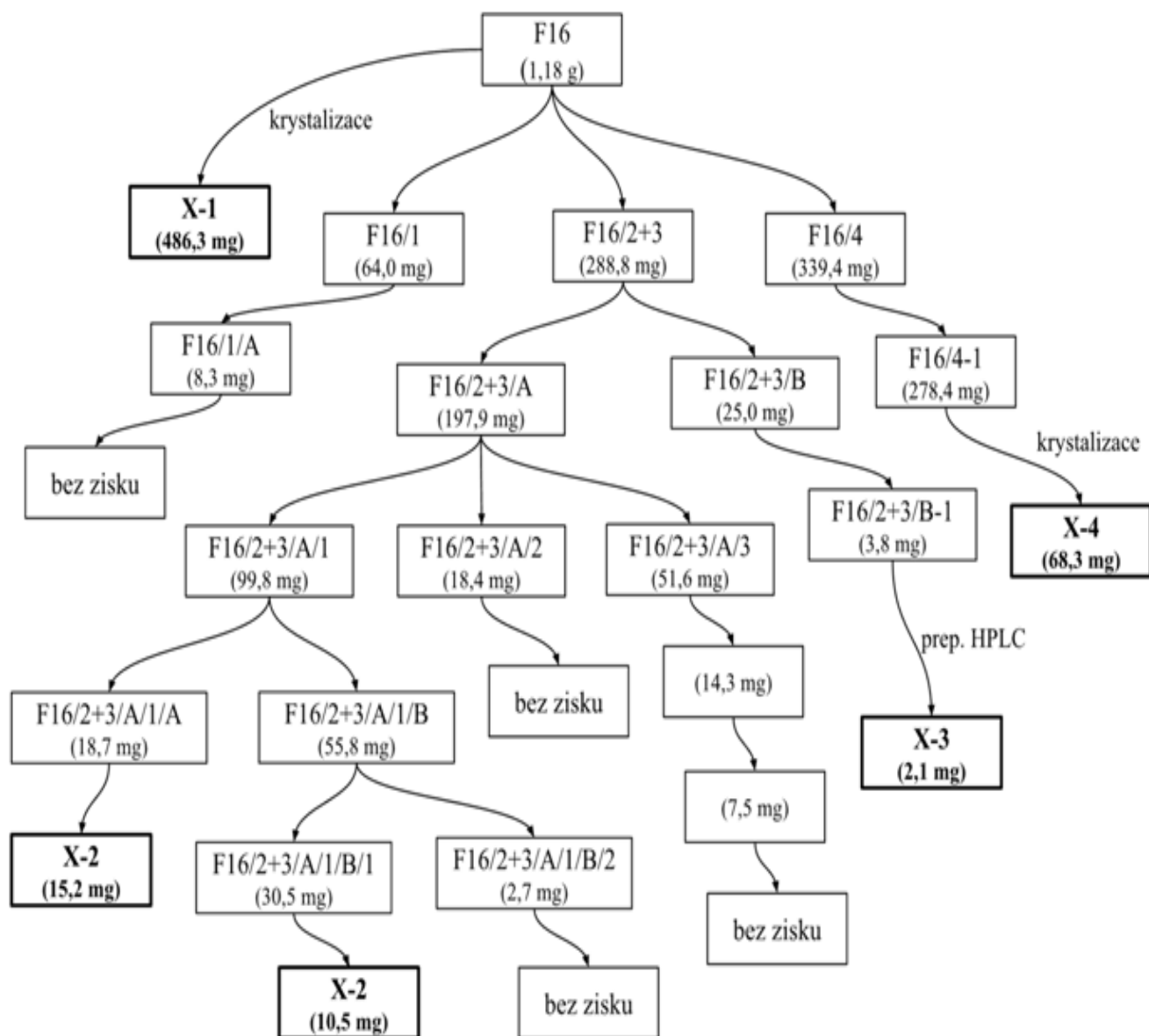
Z podfrakce **F16/2+3/A/2** se po přečišťování v několika TLC soustavách rovněž nepodařilo získat žádnou čistou látku.

Krystalizací zóny **F16/2+3/A/3** v MeOH se po přidání kapky Et₂O vyloučily 4 mg bílých krystalků. NMR analýza však kvůli velkému množství tuku nedokázala určit přesnou strukturu, a tak byly krystalky spolu s matečným louhem přečištěny na několika analytických TLC deskách ve vyvíjecí soustavě S13. Získaných 14,3 mg muselo být znovu přečištěno kvůli vysokému obsahu diethylaminů, díky kterým opět nešlo určit přesnou strukturu látky. Po provedení dalšího přečištění na analytických TLC deskách v mobilní fázi S14 bylo už však získáno pouze 7,5 mg dále neanalyzovatelné směsi minimálně tří látek, které pravděpodobně vznikly v důsledku degradace opakovaným přečišťováním a působením rozpouštědel.

Zóna **F16/2+3/B** (Obr. 5) při kontrolním TLC obsahovala více skvrn, ale jen jedna z nich obsahovala alkaloidní látku. Proto bylo provedeno analytické TLC v jiné mobilní soustavě S15. Mobilní soustava S15 byla optimální, takže v ní byla provedena i preparativní TLC za zisku látky **F16/2+3/B-1** s hmotností 3,8 mg. Vzhledem k obsahu dalších nečistot a malému množství vzorku, byla látka přečištěna pomocí preparativní HPLC metody za zisku 2,1 mg bílých krystalků (látka **X-3**).

Frakce **F16/4** byla nejprve přečištěna na několika litých preparativních TLC deskách za použitá mobilní fáze S16. Hmotnost takto přečištěné frakce **F16/4-1** byla 278,4 mg. Po kontrolním TLC v mobilní fázi S16 byla nalezena pouze jedna alkaloidní zóna. Následnou krystalizací z roztoku EtOH vypadly velké bezbarvé krystaly, které byly promyty na fritě. Po vysušení čistých krystalů bylo jejich množství zváženo na 68,3 mg (látka **X-4**).

Pro přehlednou ilustraci izolace alkaloidů ze zbytku matečného louhu spojených frakcí č. 16 a 17 (F16) je na Obr. 6 uveden detailní diagram.



Obr. 6 Diagram izolace alkaloidů z frakce F16

Část matečného louhu ethylacetátového výtřepku frakce č. 19 (**F19**) (1,0 g) byla rozdělena pomocí preparativní TLC na 35 litých silikagelových deskách ve vyvíjecí soustavě S17. Byly objeveny a získány 2 alkaloidní zóny (**F19/A**: 85,7 mg a **F19/B**: 300,0 mg).

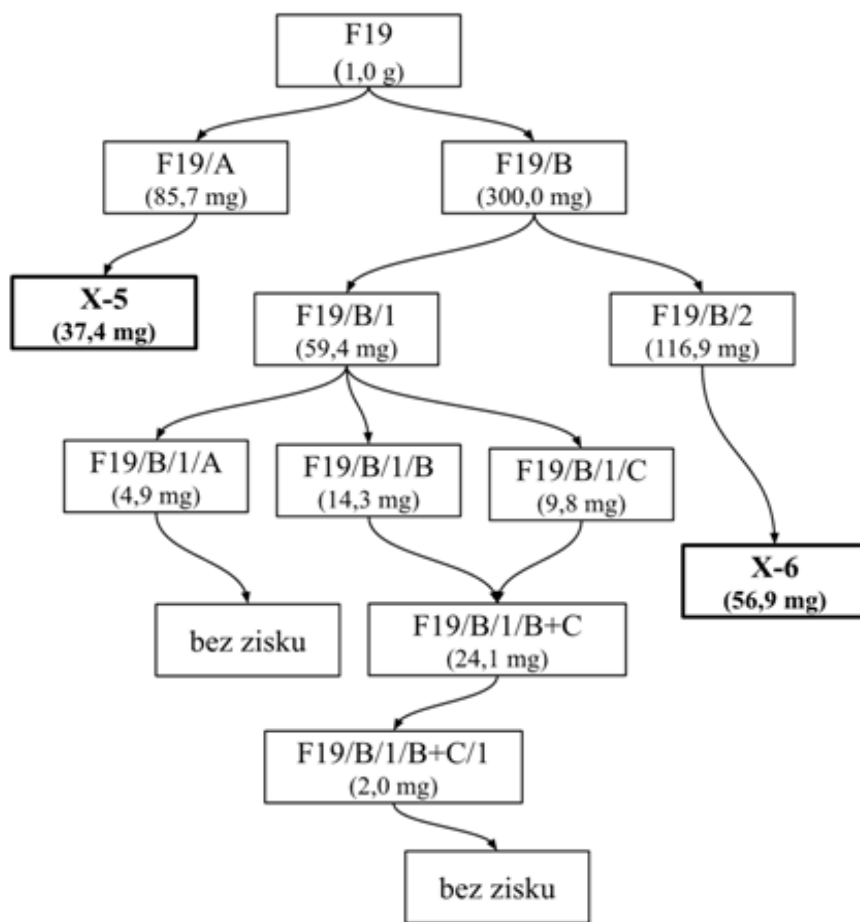
Alkaloidní zóna **F19/A** podle kontrolního TLC i GC/MS obsahovala pouze jednu látku. Po neúspěšném pokusu o přečištění krystalizací v několika rozpouštědlech byla zóna přečištěna na analytických TLC deskách v mobilní fázi S18. Tímto bylo získáno 37,4 mg bílých krystalků látky **X-5**.

Druhá alkaloidní zóna **F17/B** byla nanášena na 10 litých preparativních TLC desek a vyvinuta v mobilní soustavě S19. Po vysušení preparativních desek byly nalezeny a získány 2 další alkaloidní zóny (**F19/B/1**: 59,4 mg a **F19/B/2**: 116,9 mg).

Alkaloidní zóna **F19/B/1** byla přečištěna na 6 deskách pomocí analytických TLC desek v mobilní fázi S20. Po vysušení desek se objevily 3 alkaloidní podzóny (**F19/B/1/A**: 4,9 mg; **F19/B/1/B**: 14,3 mg; **F19/B/1/C**: 9,8 mg). Po kontrolní TLC a GC/MS však bylo zjištěno, že podzóny **F19/B/1/B** a **/C** vykazovaly prakticky stejný profil látek, a proto byly opět sloučeny dohromady (**F19/B/1/B+C**). U podzóny **F19/B/1/A** se po GC/MS analýze zjistilo, že obsahuje několik dalších látek, a proto vzhledem k malému množství nebyla nadále zpracována. Spojená frakce **F19/B/1/B+C** byla rozdělena na několika analytických TLC deskách ve vyvíjecí soustavě S21. Po vyškrábání a vysušení hlavní alkaloidní zóny byly získány pouze 2 mg látky **F19/B/1/B+C/1**. NMR analýza však vzhledem k vysokému obsahu tuku nebyla bohužel schopna určit strukturu látky.

Zóna **F19/B/2** obsahovala dle kontrolní TLC pouze jednu alkaloidní látku, kterou bylo potřeba ještě přečistit. Přečištění proběhlo na několika komerčních analytických deskách za použití mobilní fáze S20. Výsledkem bylo získání 56,9 mg bílé práškovité látky **X-6**.

Pro přehlednou ilustraci izolace alkaloidů z části matečného louhu ethylacetátového výtřepku frakce č. 19 (**F19**) je na Obr. 7 uveden detailní diagram.

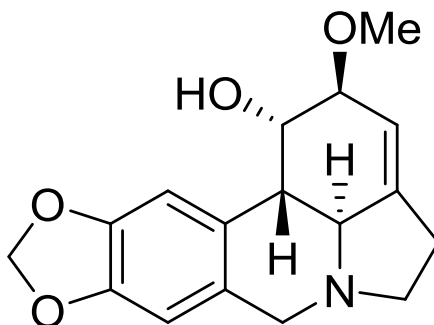


Obr. 7 Diagram izolace alkaloidů z frakce F19

5 VÝSLEDKY

5.1 Alkaloidy izolované ze *Zephyranthes citrina*

5.1.1 X-1: Lykorin



Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄

Látka byla na základě provedených měření (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání s literaturou charakterizována jako alkaloid lykorinového strukturního typu lykorin.

Molekulová hmotnost:

Mr = 287,32

GC/MS analýza:

[M+H]⁺ m/z (%) = 288(4), 287(22), 286(15), 270(4), 268(20), 266(5), 252(8), 251(5), 250(23), 249(4), 248(5), 240(4), 228(10), 227(61), 226(100), 212(4), 211(4), 147(11), 135(4), 119(7), 111(6), 91(6), 89(4), 77(4), 65(5)

NMR analýza:

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.98 (1H, s, H-11), 6.80 (1H, s, H-8), 5.95 (1H, s, H2-12), 5.77 (1H, br s, H-3), 4.58 (1H, br s, H-1), 4.48 a 4.19 (1H each, d, $J = 14.0$ Hz, H2-7), 4.26 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-11c), 3.75 a 3.49 (1H each, m, H2-5), 2.99 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-11b), 2.88 (1H, m, H2-4).

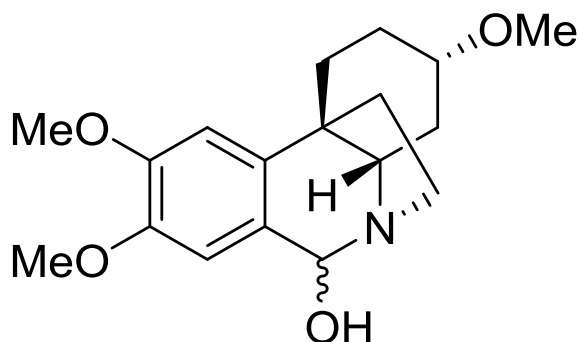
¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

149.6 (C9), 148.1 (C10), 137.9 (C3a), 130.7 (C7a), 125.7 (C11a), 122.9 (C3), 108.8 (C8), 106.4 (C11), 102.8 (C12), 71.9 (C2), 70.1 (C1), 61.8 (C11c), 55.1 (C5), 54.2 (C7), 38.2 (C11b), 30.3 (C4).

Optická otáčivost

$[\alpha]_{23}^D = -36^\circ$ ($c=0,1$; MeOH)

5.1.2 X-2: Zephyranin E



Sumární vzorec: C₁₈H₂₅NO₄

Látka byla na základě provedených měření (MS, NMR) a porovnání s literaturou charakterizována jako směs dvou stereoizomerů alkaloidu zephyraninu E.

Molekulová hmotnost:

Mr = 320,19

GC/MS analýza:

[M+H]⁺ m/z (%) = 319(30), 300(17), 276(26), 275(100), 270(14), 260(32), 258(13), 246(27), 244(32), 243(41), 232(15), 218(16), 203(12), 190(12), 115(19), 91(12)

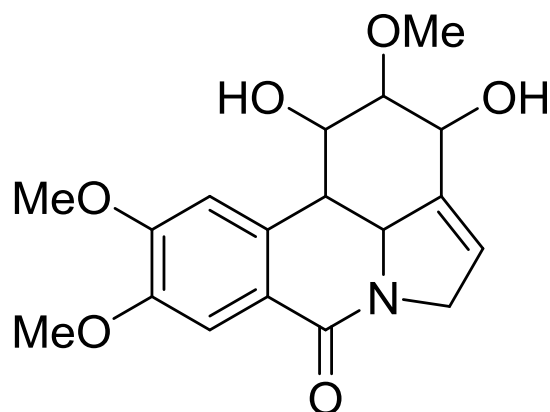
NMR analýza:

Uhlíková i vodíková spektra byla v naprosté shodě s prací publikovanou v roce 2023, v rámci které byl tento alkaloid izolován a detailně popsán vůbec poprvé (45).

Optická otáčivost:

Nebyla měřena kvůli směsi stereoizomerů.

5.1.3 X-3: 6-Oxonarcissidin



Sumární vzorec: C₁₈H₂₁NO₆

Struktura látky byla na základě provedených měření (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání dat s literaturou určena na konstituci alkaloidu 6-oxonarcissidinu, který však v literatuře nebyl dosud popsán.

Molekulová hmotnost:

$M_r = 347,37$

GC/MS analýza:

Látka nezplyňuje.

NMR analýza:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ:

7.61 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.96–5.92 (m, 1H), 4.85 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.67 (ddd, $J = 16.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.42–4.35 (m, 1H), 3.96 (d, $J = 10.5$ Hz, 6H), 3.90–3.86 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.20 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 2.85 (s, 1H).

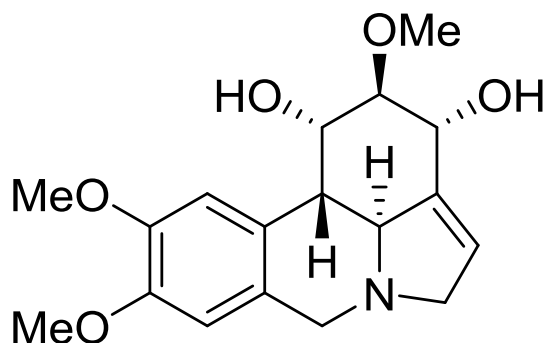
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ:

162.5, 151.9, 147.8, 138.5, 131.3, 124.9, 122.9, 111.6, 105.6, 80.6, 67.9, 67.6, 59.4, 58.4, 56.2, 56.2, 52.5, 43.2.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{23}^D = -84^\circ$ ($c=0,1$; MeOH)

5.1.4 X-4: Narcissidin



Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₅

Látka byla na základě provedených měření (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání s literaturou charakterizována jako alkaloid lykorinového strukturního typu narcissidin.

Molekulová hmotnost:

Mr = 333,38

GC/MS analýza:

[M+H]⁺ m/z (%) = 332(23), 315(48), 295(34), 294(28), 285(20), 284(100), 266(42), 264(20), 258(47), 241(27), 240(30), 230(53), 228(50)

NMR analýza:

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ:

7.01 (1H, s), 6.89 (1H, s), 5.78–5.73 (1H, m), 4.78–4.73 (1H, m), 4.62 (1H, bs), 4.10 (1H, d, překryv, *J* = 12.8 Hz), 4.07–3.96 (2H, m), 3.87 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.72 (1H, t, *J* = 2.9 Hz), 3.67–3.57 (1H, m, překryv), 3.65 (1H, d, překryv, *J* = 12.8 Hz), 3.47 (3H, s), 2.85 (1H, dd, *J* = 11.1 Hz, *J* = 1.9 Hz);

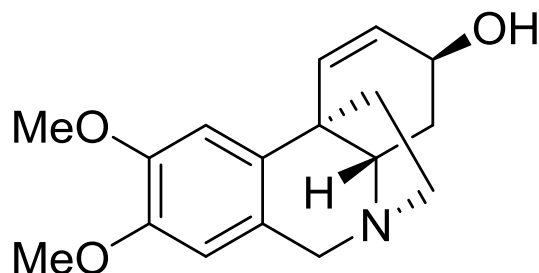
¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ:

149.7, 148.7, 141.6, 131.8, 130.0, 122.9, 112.5, 109.8, 82.8, 69.2, 69.1, 63.9, 63.0, 58.3, 56.7 (2×), 55.6, 42.1.

Optická otáčivost

[α]₂₃^D = - 56° (c=0,1; MeOH)

5.1.5 X-5: Maritidin



Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₃

Látka byla na základě provedených měření (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání s literaturou charakterizována jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu maritidin.

Molekulová hmotnost:

Mr = 287,36

GC/MS analýza:

[M+H]⁺ m/z (%) = 288(18), 287(95), 268(22), 244(31), 217(18), 216(25), 215(100), 203(54), 189(20), 128(22), 115(25)

NMR analýza:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ:

6.87 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.06 (ddd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 5.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 4.45–4.39 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.78–3.70 (m, 2H), 3.10 (ddd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 9.0 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.35–2.26 (m, 2H), 2.14–2.05 (m, 1H), 1.83 (td, *J* = 13.3 Hz, *J* = 4.1 Hz, 1H).

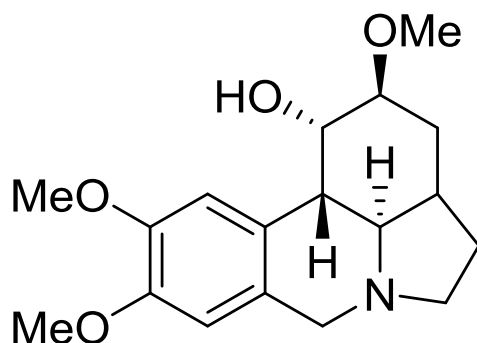
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ:

148.1, 135.0, 129.7, 128.4, 121.0, 109.8, 106.0, 63.7, 62.9, 60.4, 56.1, 55.9, 52.9, 44.4, 42.4, 31.3.

Optická otáčivost

[α]₂₃^D = + 96° (c=0,1; MeOH)

5.1.6 X-6: Galanthin



Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄

Látka byla na základě provedených měření (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání s literaturou charakterizována jako alkaloid lykorinového typu galanthin.

Molekulová hmotnost:

Mr = 317,39

GC/MS analýza:

[M+H]⁺ m/z (%) = 317(20), 316(14), 298(8), 286(8), 284(10), 268(15), 266(10), 252(7), 244(14), 243(90), 242(100), 236(5), 228(8), 162(10), 125(10)

NMR analýza:

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.57 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-7), 4.8 (1H, m, H-1), 3.98 (1H, m, H3), 3.92 (1H, d, *J* = 15 Hz, H-6a), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, *J* = 15 Hz, H-6), 3.12 (1H, t, H-12), 2.96 (1H, t, H-12), 2.4 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-2), 2.29 (3H, s, NCH₃), 1.4 – 1.9 (1H, m, H-2), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4a), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

147.8 (C₉), 147.7 (C₈), 144.0 (C₄), 129.5 (C_{6a}), 126.1 (C₁₀), 115.2 (C₃), 110.8 (C₇), 107.4 (C₁₀), 80.8 (C₂), 68.7 (C₁), 61.1 (C_{4a}), 57.6 (2 OCH₃), 56.7 (C₆), 56.0 (9 OCH₃), 55.9 (8 OCH₃), 53.9 (C₁₂), 41.7 (C_{10b}), 28.6 (C₁₁)

Optická otáčivost

[α]₂₃^D = - 68° (c=0,1; MeOH)

5.2 Výsledky biologické aktivity izolovaných alkaloidů

Izolované alkaloidy byly změřeny na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám *hAChE* a *hBuChE*, které souvisí s klíčovými patofyziologickými procesy při AD. Několik ze získaných alkaloidů bylo už v rámci předchozích prací na tuto inhibiční aktivitu změřeno, avšak pro úplnost jsou uvedeny v tabulce výsledků s příslušnou referencí (Tab. 1).

Tab. 1 Výsledky inhibiční aktivity získaných alkaloidů vůči cholinesterasám

Látka	IC ₅₀ <i>hAChE</i> [μM]	IC ₅₀ <i>hBuChE</i> [μM]
Lykorin	> 100 ^a	> 100 ^a
Zephyranin E	> 100	> 100
6-Oxonarcissidin	> 100	> 100
Narcissidin	> 100 ^a	> 100 ^a
Maritidin	> 100 ^a	> 100 ^a
Galanthin	> 100 ^a	> 100 ^a
Galanthamin*	1,72 ± 0,12 ^b	42,3 ± 1,3 ^b
Eserine*	0,063 ± 0,005 ^b	0,13 ± 0,01 ^b

*pozitivní standard; ^ahodnota převzata z jiné publikace (1); ^bhodnota převzata z jiné publikace (2)

6 DISKUSE

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou studovány pro svůj obsah sekundárních metabolitů již mnoho let. Prvním izolovaným alkaloidem z této čeledi byl lykorin v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* (2). Jediným schváleným alkaloidem pro terapii AD z čeledi Amaryllidaceae (AA) je galanthamin, který se používá již řadu let. Z toho důvodu je galanthamin využíván i jako standard při měření inhibičních aktivit alkaloidů vůči lidským cholinesterasám (27). AA byly studovány z pohledu jejich různých biologických aktivit a byly u nich popsány nejrůznější účinky, k těm nejdůležitějším patří antivirový, protinádorový, antimalarický, protizánětlivý, antibakteriální a hlavně jejich inhibiční aktivita vůči cholinesterasám (28). Zájem vědecké komunity není jen o přírodní alkaloidy, ale i o polosyntetické deriváty, protože celá řada biologicky aktivních AA byla použita jako „lead structure“ pro přípravu nových biologicky aktivnějších látek – hovoříme o narciklasinu, pankratistatinu a lykorinu (1). Předložená diplomová práce cílí na izolaci alkaloidních látek z rodu *Zephyranthes*, konkrétně druhu *Zephyranthes citrina*, kterou jako první popsal Baker. Rod *Zephyranthes* patří spolu s rody *Crinum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Lycoris* a *Pancreatum* k nejvíce studovaným rodům čeledi Amaryllidaceae (4).

Jako zdroj pro izolaci látek byly vybrány zbytky matečných louhů a výtřepků frakcí č. 16, 17 a 19, které byly získány sloupcovou chromatografií alkaloidního extraktu z cibulí *Z. citrina* v rámci předchozí studie a nebyly ještě zpracovány (1). V průběhu izolační fytochemické práce bylo z těchto frakcí pomocí chromatografických metod (TLC, HPLC) a krystalizace získáno 6 alkaloidů, jejichž strukturní analýza byla provedena pomocí běžných instrumentálních metod jako GC/MS, HPLC/MS, 1D a 2D-NMR a optická otáčivost. U jedné struktury, konkrétně 6-oxonarcissidinu, se jednalo o dosud nepopsanou látku.

Získané látky lykorin, maritidin, narcissidin a galanthin byly ze stejné rostliny získány už v předchozí studii, kde se stanovila i jejich inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám. Žádný z nich však nevykazoval významnou inhibiční aktivitu proti studovaným enzymům hAChE i hBuChE (viz Tab. 1) (1). V případě izolované látky zephyraninu E se jednalo o směs dvou stereoisomerních látek, která v literatuře již byla popsána dříve. Tato látka již byla vyizolovaná z příbuzné rostliny *Zephyranthes candida* (44), kde byla studována i její inhibiční schopnost vůči AChE. Látka v této studii nevykázala významnou aktivitu ($IC_{50} > 200 \mu M$), avšak studie neuvádí zdroj enzymu, což je zásadní informace, protože výsledky

měření se v této závislosti mohou lišit (např. enzym lidský rekombinantní vs. z elektrického úhoře). Z tohoto důvodu byla látka změřena na inhibici lidské AChE i v této diplomové práci. Bohužel ani v této práci nebyla zjištěna významná aktivita ani proti jedné z lidských cholinesteras – hodnota obou inhibičních aktivit byla velice nízká ($IC_{50} > 100 \mu M$). Nově popsaná látka, 6-oxonarcissidin, byla rovněž podrobena testu inhibice vůči *hAChE* a *hBuChE*, avšak ani tato nově popsaná látka nevykazovala významnou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterásam ($IC_{50} > 100 \mu M$). V rámci screeningu při koncentraci $100 \mu M$ však bylo zjištěno, že zephyranin E měl vyšší potenciál k inhibici lidské AChE (13,69 %) i vůči lidské BuChE (25,42 %) než 6-oxonarcissidin (vůči AChE 1,93 % a vůči BuChE 15,86 %). I přes tyto negativní výsledky je stále velice přínosné izolovat alkaloidy i jiné rostlinné metabolity, které mohou přispět jako potenciální výchozí struktury pro nově syntetizovaná léčiva pro léčbu AD. Nově nalezené struktury mohou významně přispět jak v časných tak i pozdějších stádiích léčby. Uvádí se, že v roce 2050 bude postiženo AD zhruba 131 miliónů lidí (2). Proto je důležité neustále hledat nové látky, ať už rostlinného nebo syntetického původu. Izolované alkaloidy mohou sloužit jako nové inhibitory AChE nebo mohou cílit i na BuChE. Potenciál AA není stále vyčerpán a je jasné, že i v budoucnu bude zdroj alkaloidů čeledi Amaryllidaceae neustálým přínosem pro nově zkoumané látky, které mohou hrát zásadní roli při léčbě demence a obzvláště AD.

7 ZÁVĚR

V rámci experimentální části diplomové práce za využití analytické i preparativní TLC, HPLC a následné krystalizace se podařilo izolovat 6 alkaloidů z původních frakcí číslo 16, 17 a 19 z cibulí rostliny *Zephyranthes citrina*. Izolované alkaloidy byly identifikovány pomocí běžných analytických metod a porovnáním s literaturou. Jednalo se o Amaryllidaceae alkaloidy lykorinového strukturního typu (lykorin, 6-oxonarcissidin, narcissidin, galanthin) a haemanthaminového strukturního typu (maritidin, zephyranin E). U alkaloidu zephyraninu E šlo o směs dvou stereoizomerů; 6-oxonarcissidin byl dosud nepopsanou látkou. U získaných alkaloidů byla změřena schopnost inhibice vůči lidským cholinesterásám. Izolované alkaloidy lykorin, narcissidin, galanthin a maritidin už byly z hlediska inhibiční aktivity vůči těmto enzymům studovány a popsány v mnoha jiných studiích, proto se tato práce zaměřila na studium dvou doposud méně známých alkaloidů. Šlo o alkaloidy 6-oxonarcissidin a zephyranin E, které při změření inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterásám v rámci této práce však významnou aktivitu v porovnání se standardy (galanthamin, eserein) rovněž neprokázaly ($IC_{50} > 100 \mu M$).

8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Řešitel: Aneta Čejdová

Školitel: PharmDr. Rudolf Vrabec, Ph.D.

Název diplomové práce: Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita

Klíčová slova: Amaryllidaceae, alkaloidy, *Zephyranthes citrina*, biologická aktivita, izolace

Z vybraných alkaloidních frakcí získaných z cibulí *Zephyranthes citrina* bylo chromatografickými metodami izolováno 6 různých alkaloidů, které byly identifikovány pomocí analytických metod (NMR, MS, HRMS, optická otáčivost). Získané látky patřily do lykorinového strukturního typu (lykorin, galanthin, 6-oxonarcissidin, narcissidin) a haemanthaminového strukturního typu (maritidin, zephyranin E). Látka 6-oxonarcissidin byla dosud v literatuře nepopsaná. U izolovaných alkaloidů byla změřena inhibiční aktivita vůči lidské AChE a BuChE. Lykorin, galanthin, narcissidin a maritidin byly změřeny už v mnoha studiích a pracech, proto byla pozornost zaměřena na dvě dosud méně známé alkaloidy zephyranin E a 6-oxonarcissidin. Výsledky IC_{50} jak zephyraninu E tak i 6-oxonarcissidinu vůči lidské AChE a BuChE však byly nad hranicí 100 μ M, což poukazuje na jejich nevýznamný inhibiční potenciál.

9 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Aneta Čejdová

Title of diploma thesis: Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): isolation, determination of structure, biological activity

Key words: Amaryllidaceae, alkaloids, *Zephyranthes citrina*, biological activity, isolation

From the selected alkaloidal fractions obtained from the bulbs of *Zephyranthes citrina*, six different alkaloids were isolated by chromatographic methods. They were identified using standard analytical methods (NMR, MS, HRMS, and optical rotation). The obtained compounds belong to the lycorine structural type (lycorine, galanthine, 6-oxonarcissidine, narcissidine) and haemanthamine structural type (maritidine, zephyranine E). The alkaloid 6-oxonarcissidine has not been described in the literature yet. The inhibitory activity against human AChE and BuChE was measured for the isolated alkaloids. Lycorine, galanthine, narcissidine, and maratidine have already been measured in many studies before; therefore, the attention was focused on the two less-known alkaloids: zephyranine E and 6-oxonarcissidine. However, the resulting IC₅₀ values of both alkaloids against human AChE and BuChE were above 100 μM, which indicates their insignificant inhibitory potential.

10 REFERENCE

1. **Kohelová E.**, Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. *Alkaloidy Zephyranthes citrina (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita*. 2021.
2. **Kohelová E., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Jun D., Chlebek J., Jenčo J., Šafratová M., Hrabínová M., Ritomská A., Malaník M.** Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer disease: isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*. 2021, Sv. 107, str. 104567
3. **Desgagne-Penix I.**, Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Review*. 2020, Sv. 20, str. 409-431.
4. **Berkov S., Osorio E., Viladomat F., Bastida J.** *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Německo: Academic Press, 2022, Sv. 88, str. 1-387.
5. **Herrera M. R., Machocho A. K., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J.** Crinine and lycorane types alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica*. 2001, Sv. 67, str. 191-193.
6. icflora.blogspot. [Online] <https://icflora.blogspot.com/2012/06/yellow-rain-lily-zephyranthes-citrina.html> (staženo 17.06.2023)
7. **Cortes N., Posada-Duque A. R., Alvarez R., Alzate F., Berkov S.**, Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species, A comparative study. *Life Science*. 2015, Sv. 122, str. 42-50.
9. **Nair, J. J., Van Staden, J. a Bastida, J.** Cytotoxic alkaloid constituents of the Amaryllidaceae. *Studies in natural products chemistry*. 2016, Sv. 49, str. 107-156.
10. **Sierra K., Andrade de P. J., Tallini R. L., Osorio H. E.** In vitro and in silico analysis of galanthine from *Zephyranthes carinata* as an inhibitor of acetylcholinesterase. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022, Sv. 150, str. 113016
11. **Cortes N., Alvarez R., Osorio H. E., Alzate F., Berkov S.** Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of

five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, Sv. 102, str. 222-228.

12. **Cortes N., Sabogal-Guaqueta M. A., Cardona-Gomez P. G.** Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019, Sv. 110, str. 482-492

13. **Zhan G., Zhou J., Liu J., Huang J., Zhang H., Liu R., Yao G.** Acetylcholinesterase Inhibitory Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes carinata*. *Journal of Natural Products*. 2017, Sv. 80, str. 2462-2471.

14. **Jánská L.** *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod Zephyranthes*.

15. **Maafi N., Pidaný F., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Schmidt M., Shammari Al L., Špulák M., Catapano C. M., Mecava M., Prchal L., Kuneš J., Janoušek J., Kohelová E.** Derivatives of montanine-type alkaloids and their implication for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological activity and in silico study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2021, Sv. 51, str. 128374

16. **Zhan G., Liu J., Zhou J., Sun B., Aisa A. H., Yao G.** Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, Sv. 127, str. 771- 780.

17. **Zvěřová M.** *Alzheimerova demence*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2017.

18. **DeTure A. M., Dickson D.W.** The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2019, Sv. 14, str. 32

19. **Yiannopoulou K., Papageorgiou S.** Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*. 2020, Sv. 12, str. 1179573520907397

20. **Pardo-Moreno T., Gonzáles-Acedo A., Rivas-Dominguez A., García-Morales V., Garcia-Cozar J.F., Ramos-Rodriguez J. J., Melguizo-Rodriguez L.** Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease: Current Treatments and New Perspectives. *Pharmaceutics*. 2022, Sv. 1117, str. 1117

21. **Vasileva L., Gaynanova G., Valeeva F., Belyaev G., Zueva I.** Mitochondria-Targeted Delivery Strategy of Dual-Loaded Liposomes for Alzheimer's Disease Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, Sv. 10494, str. 10494.
22. **Vaz M., Silva V., Monteiro C., Silvestre S.** Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. *Dovepress*. 2022, Sv. 17, str. 797-810
23. **Sheridan M. H.** Lecanemab: First Approval. *Drugs*. 2023, Sv. 83, str. 359-365.
24. **Rashad A., Rasool A., Shaheryar M., Sarfraz A., Sarfraz Z., Robles-Velasco K., Cherrez-Ojeda I.** Donanemab for Alzheimer's disease: A systematic review of clinical trials. *Healthcare*. 2020, Sv. 11, str. 32.
25. **Bateman J. R., Cumming J., Schobel S., Salloway S., Vellas B., Boada M., Black E. S., Blennow K., Fontoura P., Klein G.** Gantenerumab: an anti-amyloid monoclonal antibody with potential disease-modifying effects in early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*. 2022, Sv. 178, str. 178.
26. **Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K., Linder M., Tamayol A., Malaplate C., Yen T. F., Arab-Tehrany E.** Alzheimer's disease: Treatment strategies and their limitations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, Sv. 23, str. 13954.
27. **Al Mamun A., Maříková J., Hulcová D., Janoušek J., Šafratová M., Nováková L., Kučera T., Hrabínová M., Kuneš J., Korábečný J., Cahlíková L.** Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules*. 2020, Sv. 10, str. 800.
28. **Bastida J., Lavilla R., Viladomat F.** *Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids*. 2006. Sv. 63, str. 87-179.
29. **Hoskovec, L. Zephyranthes candida (Lindl.) Herb.** [Online] <https://botany.cz/cs/zephyranthes-candida>. (staženo 17.06.2023)
30. **Lindl., WFO Zephyranthes rosea.** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752515>. (staženo 17.06.2023)
31. **Lindl., World flora online. Zephyranthes rosea.** [Online] <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names> (staženo 17.06.2023)

32. **Lindl., WFO Zephyranthes rosea.** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752515>. (staženo 17.06.2023)
33. **Karakoyun C., Bozkurta B., Coban G., Masi M., Cimmino A., Evidente A., Unver Somer N.** A comprehensive study on narcissus tazetta subsp. tazetta L: Chemo-profiling, isolation, anticholinesterase activity and molecular docking of amaryllidaceae alkaloids. *South African Journal of Botany*.2020, Sv. 140, str. 148 -154
34. **Hoskovec, Zephyranthes candida, Plants of the world online.** [Online] <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67201>. (staženo 17.06.2023)
35. **WFO, Zephyranthes citrina Baker.** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752509>. (staženo 17.06.2023)
36. **Dietr D.** Plants of the world online, Zephyranthes minuta (Kunth). [Online] <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names>. (staženo 17.06.2023)
37. **WFO, Zephyranthes minuta (Kunth).** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752405>. (staženo 17.06.2023)
38. **Herb, WFO Zephyranthes candida (Lindl.).** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752298>. (staženo 17.06.2023)
39. **Herb.,** Plants of the world online. Zephyranthes carinata. [Online] <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:270933-2> (staženo 17.06.2023)
40. **Herb., WFO Zephyranthes carinata.** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752542>. (staženo 17.06.2023)
41. **Benth, Hook. WFO Zephyranthes concolor (Lindl.) Benth.** [Online] <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752513>. (staženo 17.06.2023)
42. Plants of the world online. Zephyranthes concolor (Lindl.). [Online] <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:330336-2>. (staženo 17.06.2023)
43. **Dietr D., Hooker J.** *Plants of the royal gardens of kew. Curtis's Botanical Magazine.* Anglie: Forgotten Books, 1875, Sv. 86, str. 1-285.

44. **Kohelová E., Maříková J., Korábečný J., Hulcová D., Kučera T., Jun D., Chlebek J., Jenčo J., Šafratová M., Hrabínová M., Ritomská A., Malaník M., Peřinová R., Breiterová K., Kuneš J., Nováková L., Opletal L., Cahlíková L.** Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*. 2021, Sv. 107, str. 104567
45. **Zhan G., Gao B., Zhou J., Liu T., Zheng G., Jin Z., Yao G.** Structurally diverse alkaloids with nine frameworks from *Zephyranthes candida* and their acetylcholinesterase inhibitory and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*. 2023, Sv. 207, str. 113564