

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE
ALKALOIDY RODU *NARCISSUS*: ISOLACE, STRUKTURNÍ IDENTIFIKACE, BIOLOGICKÁ
AKTIVITA**

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

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

Hradec Králové, srpen 2021

Hana Šimková

**CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY**

**DIPLOMA THESIS
ALKALOIDS OF GENUS *NARCISSUS*: ISOLATION, STRUCTURAL IDENTIFICATION, BIOLOGICAL
ACTIVITY**

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

Head of Department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, august 2021

Hana Šimková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem a že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením a odborným dohledem vedoucí diplomové práce prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D.

Všechna literatura a další zdroje, které byly při zpracování této práce využity, jsou řádně citované a uvedené v seznamu literatury. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, srpen 2021

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, poskytnuté rady a materiály a za pomoc během zpracování experimentální části. Zároveň jí patří velké poděkování za trpělivost a čas strávený nad touto prací. Na tomto místě také děkuji všem zúčastněným pracovníkům Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kteří se podíleli na stanovení biologických aktivit, určování struktury a za jejich pomoc při interpretaci.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV UK 260 548 a OPVVV 02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	11
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	13
3 TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae	14
3.1.1 Rod <i>Narcissus</i>	14
3.1.2 <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Carlton	15
3.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	16
3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů	16
3.2.2 Alkaloidy izolované z rodu <i>Narcissus</i> L.....	20
3.2.2.1 Alkaloidy druhu <i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. Carlton	23
3.3 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	24
3.3.1 Protinádorová aktivita.....	24
3.3.1.1 Lykorinový strukturní typ.....	25
3.3.1.2 Pankratiostatínový strukturní typ	27
3.3.1.3 Haemanthaminový strukturní typ.....	29
3.3.2 Inhibiční aktivita vůči cholinesterasám	30
3.3.2.1 Alzheimerova choroba	30
3.3.2.2 Norbelladinový strukturní typ.....	38
3.3.2.3 Galanthaminový strukturní typ.....	39
3.3.2.4 Lykorinový strukturní typ.....	40
3.3.3 Antivirová aktivita	42
3.3.4 Antimalarická a další antiprotozoální aktivity	43
3.3.5 Další biologická aktivita	45
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
4.1 Použitý materiál a přístroje	47
4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie.....	47
4.1.2 Pomocný materiál	47
4.1.3 Detekční činidla	47
4.1.4 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	48
4.1.5 Chromatografické adsorbenty	48
4.1.6 Přístroje	48

4.2	Všeobecné postupy	48
4.2.1	Příprava rozpouštědel	48
4.2.2	Odpařování rozpouštědel.....	49
4.2.3	Příprava litých desek pro preparativní TLC	49
4.2.4	Tenkovrstvá chromatografie	49
4.3	Izolace alkaloidů	50
4.3.1	Rostlinný materiál	50
4.3.2	Extrakce drogy a zpracování extraktu	50
4.3.3	Proces izolace alkaloidů	51
4.3.3.1	Zpracování podfrakce Fj 3	51
4.3.3.2	Zpracování matečného louhu frakce 7	58
4.4	Určení struktury izolovaných alkaloidů	59
4.4.1	GC-MS analýza.....	59
4.4.2	LC-MS analýza.....	60
4.4.3	NMR analýza.....	60
4.4.4	Měření optické otáčivosti.....	61
4.5	Testování biologické aktivity	61
4.5.1	Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity	61
4.5.1.1	Použité chemikálie	61
4.5.1.2	Pufry	61
4.5.1.3	Biologický materiál.....	61
4.5.1.4	Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	62
4.5.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči POP	63
4.5.3	Stanovení cytotoxické aktivity.....	63
5	VÝSLEDKY	64
5.1	Strukturální analýza izolovaných látek	64
5.1.1	Fj 3-4/kr: Lykorenin	64
5.1.1.1	GC-MS analýza	64
5.1.1.2	NMR analýza	64
5.1.1.3	Optická otáčivost	65
5.1.2	F 7/2-1: Homolykorin	65
5.1.2.1	GC-MS analýza	65
5.1.2.2	NMR analýza	65
5.1.2.3	Optická otáčivost	66
5.1.3	F 7/2-3: Hippeastrin	66

5.1.3.1	GC-MS analýza	66
5.1.3.2	NMR analýza	66
5.1.3.3	Optická otáčivost	67
5.2	Biologická aktivita	67
6	DISKUZE A ZÁVĚR	69
7	ABSTRAKT	72
8	ABSTRACT	73
9	LITERATURA	74

SEZNAM ZKRATEK

A2780	karcinom vaječníku
A549	buňky plicního karcinomu
A β	β -amyloid
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
Akt	proteinkinasa B
AmA	amarylkovité alkaloidy
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosin trifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
Caco-2	buňky kolorektálního karcinomu
CDK-5	cyklin dependentní kinasa-5
CEM	T-lymfoblastická leukemie
cv.	pěstovaná odrůda - kultivar
DMARD's	Disease-modifying antirheumatic drugs
DR4	Death receptor 4
DU145	buněčná linie karcinomu prostaty
EBM	Evidence-based medicine, medicína založená na důkazech
GSK 3 β	glykogen syntasa 3 β
GTP	guanosin trifosfát
HCT116	buňky kolorektálního karcinomu
HeLa	lidský adenokarcinom děložního hrdla
HepG2	buňky jaterního hepatocelulárního karcinomu
HeyB1	buňky nádoru vaječník
H460	buňky plicního karcinomu
HL-60	akutní promyelocytární leukemie
Hs683	buňky lidského mozkového gliomu

HT-29	buňky kolorektálního karcinomu
Jurkat	T-lymfoblastická leukemie
K562	chronická myeloidní leukemie
KM-3	lidský mnohočetný myelom
L5178	buňky myšního lymfomu
LNCaP	androgen senzitivní buňky lidského adenokarcinomu prostaty
MEK 2	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MCF-7	buňky adenokarcinomu prsu
MOLT-4	T-lymfocytární buněčná linie
MRC-5	zdravé plicní fibroblasty
mTOR	mammalian target of rapamycin
N40MT	4'-O-methyltransferasa
NCI-H460	buňky karcinomu plic
NFTs	neurofibrilární klubka
NHF	normální lidský fibroblast
NMDA-	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NT-2	buňky lidského teratomu
OE21	human Caucasian oesophageal squamous cell carcinoma
PC-3	buňky karcinomu prostaty
PAL	fenylalanin amonium-lyasa
PANC-1	epiteliální karcinom pankreatu
POP	prolyloligopeptidasa
RHS	Royal Horticultural Society
RIP-1	receptor-interacting protein 1
RIP-3	receptor-interacting protein 3
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAOS-2	buňky osteosarkomu
SHSY-5Y	buňky lidského neuroblastomu
SKMEL	buňky lidského melanomu
SK-OV-3	buňky ovariálního karcinomu
SW1573	buňky plicního karcinomu

T47-D	buňky rakoviny prsu
TCRP1	tongue cancer resistance-associated protein 1
TYDC	tyrosin dekarboxylasa
VM-48	melanomové buňky rezistentní vůči apoptóze
VpVAN	vanilin syntasa

1 ÚVOD

Již v dávných dobách se lidé spoléhali na přírodu a její zdroje. Rostliny byly využívány nejen jako obživa a zdroj základních potřeb, ale i pro své účinky, které byly léčivé, nebo naopak toxické. Z počátku bylo používání rostlin pro léčebné účely založeno pouze na empirii. Získávání těchto zkušeností bylo doprovázeno mnoha šťastnými náhodami, ale i tragickými omyly. Ty postupně vedly k formování celé skupiny léčivých rostlin a jejich cílenému používání^{1,2}. To, že je léčitelství staré jako lidstvo samo, dokazují nejrůznější historické artefakty. Nejstarším písemným záznamem, který dokládá používání léčivých rostlin k přípravě léčiv, je sumerská deska z Nagpuru, jejíž stáří se odhaduje na 5000 let. Deska obsahovala 12 receptů popisujících přípravu léčiv s odkazem na více než 250 rostlin. Jako další z mnoha důkazů můžeme zmínit Ebersův papyrus, který obsahuje záznamy s více než 800 léčivými rostlinami a způsoby jejich užití, jehož vznik se datuje do doby kolem roku 1500 př.n.l.³

S jistotou tedy můžeme říct, že se lidé již odnepaměti pokoušeli najít způsob, jak léčit nejrůznější onemocnění. V každém z historických období byly identifikovány a zaznamenány nové vlastnosti léčivých rostlin. Tyto nově nabyté poznatky byly předávány z generace na generaci a dále rozšiřovány, a to po celá staletí až do současnosti. Trvajícím zájemem lidstva o léčivé rostliny vedl až k vývoji současných moderních způsobů pro jejich zpracování a použití³.

Přibližně dvě třetiny nových léčivých přípravků registrovaných v posledních letech mají předlohu právě v přírodních látkách⁴. Velké množství těchto biologicky účinných látek, patří mezi sekundární metabolity, kam řadíme i alkaloidy. Alkaloidy jsou bazické organické látky, které vznikají biosynteticky z různých aminokyselin. Ve své chemické struktuře obsahují atom dusíku. Výskyt alkaloidů je pozorován převážně ve vyšších rostlinách, méně pak v rostlinách nižších⁵.

Jednou z významných skupin alkaloidů, které jsou známé pro své široké spektrum biologických aktivit, jsou amarylkovité alkaloidy (AmA). Důležitým zástupcem je galanthamin, který je indikován při léčbě mírné a střední formy Alzheimerovy choroby (AD)⁶.

V současné době je velká pozornost věnována výzkumu a vývoji nových účinných léčiv využitelných v terapii civilizačních onemocnění. S prodlužující se délkou života, stoupá i prevalence těchto nepřenositelných, chronických onemocnění, které představují stále větší

problém novodobé moderní společnosti. Předpokládá se, že jejich vznik je výsledkem kombinace genetických, fyziologických, environmentálních a behaviorálních faktorů. K těmto onemocněním patří například kardiovaskulární choroby, nádorová onemocnění, onemocnění dýchacího ústrojí, diabetes a demence. Nejčastější formou demence je AD, o které se mluví také jako o tiché epidemii. Civilizační choroby způsobují přibližně 71 % celosvětových úmrtí ročně^{7,8,9}.

Vědecká skupina ADINACO, která působí na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK v HK, se dlouhodobě věnuje intenzivnímu výzkumu sekundárních metabolitů rostlin a hub, které mohou být potenciálně využity při terapii AD a nádorových onemocnění.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma alkaloidy rodu *Narcissus* a jejich biologická aktivita
- Zpracování přidělené podfrakce za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čisté formě z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton
- Strukturní identifikace izolovaných alkaloidů, stanovení jejich biologické aktivity ve vztahu k Alzheimerově chorobě a nádorovým onemocněním
- Vyhodnocení získaných výsledků a sepsání diplomové práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Rostliny čeledi Amaryllidaceae (česky amarylkovité) se řadí mezi jednoděložné rostliny. Tato čeleď zahrnuje vytrvalé byliny, které mají podzemní cibule, oddenky nebo cibulové hlízy. Jejich listy jsou přízemní, čárkovité, úzké, výjimečně bývají i lodyžní. Květy amarylkovitých rostlin jsou pravidelné, oboupohlavní se spodním semeníkem ze tří plodolistů. Okvětí se skládá ze šesti lístků (3+3), které mohou být srostlé, a z tyčinek (3+3). Plodem bývají bobule nebo tobolky^{10,11}.

Čeleď Amaryllidaceae je velmi rozsáhlá a obsahuje více než 85 rodů a přes 1100 druhů¹². Mezi známé rody patří například rody *Leucojum* (bledule), *Galanthus* (sněženka), *Narcissus* (narcis), *Crinum* (křín), *Amaryllis* (amarylka), *Clivia* (klívie) a další¹⁰. Výskyt rostlin čeledi amarylkovitých je velice rozmanitý a můžeme je najít v tropických a subtropických oblastech Jižní Afriky a Jižní Ameriky. V Evropě jsou často využívány jako okrasné rostliny. V České republice se nejčastěji setkáme s rody *Narcissus*, *Galanthus* a *Leucojum* (Obr. 1)¹³.



Obr. 1: *Galanthus nivalis* (sněženka bílá)¹⁴, *Narcissus pseudonarcissus* (narcis žlutý)¹⁵, *Leucojum vernum* (bledule jarní)¹⁶

3.1.1 Rod *Narcissus*

Rod *Narcissus* zahrnuje 80–100 druhů. To jej řadí k nejobsáhlejšímu rodu čeledi Amaryllidaceae. Většina těchto druhů podléhá hybridizaci, čehož je s oblibou využíváno k získávání širokého spektra narcisů jako okrasných rostlin. Početné množství kultivarů vede také k identifikaci těch, které obsahují vyšší koncentrace AmA a slouží pak jako jejich zdroje.

V současné době je v The International Dafoddil Register registrováno více než 27 000 kultivarů¹⁷.

Rod *Narcissus* je rozšířený převážně na území jihozápadní Evropy a severní Ameriky, některé druhy se vyskytují také na území Balkánu, Itálie a Francie⁶. Stanoviště, na kterých můžeme najít rostliny narcisů, jsou velmi různorodá. Jejich výskyt je široký a to od nížinných travnatých luk, břehů řek, lesů až po horské oblasti, kde můžeme narcisy najít ve skalnatých puklinách¹⁸.

Taxonomické řazení a klasifikace rodu *Narcissus*¹⁰

Říše: Plantae (Rostliny)

Podříše: Tracheobionta (Cévnaté rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta (Krytosemenné)

Třída: Liliopsida (Jednoděložné)

Řád: Asparagales (Chřestotvaré)

Čeleď: Amaryllidaceae (Amarylkovité)

Rod: *Narcissus*

3.1.2 *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton

Klasifikační systém RHS (Royal Horticultural Society) rozděluje narcisy do 13 divizí, a to podle počtu květů, které se nachází na stonku, a podle nejrůznějších poměrů ve velikosti a tvaru okvětí a pakorunek. Tato pěstovaná odrůda narcisů spadá do divize 2 a řadí se tak k narcisům s velkou korunkou. Stonek nese jeden květ a velká korunka je delší než jedna třetina okvětních lístků, ale ne delší. Kultivar Carlton dorůstá výšky 40–50 cm. Má dvoubarevné žluté květy, které mají jemnou vanilkovou vůni. Kvete během rané a střední fáze sezóny a stejně jako ostatní druhy narcisů je opylován hmyzem^{19,20,21}.

Narcissus pseudonarcissus cv. Carlton je pěstován pro komerční izolaci galanthaminu, který se nachází v cibulích ve vysokých koncentracích (0,10–0,13 %). Tento kultivar byl vybrán i z důvodu výhodné velikosti cibulí, které mají v průměru 4–5 cm. Stal se tak hlavním zdrojem pro izolaci galanthaminu. Nizozemsko a Spojené Království jsou největšími pěstiteli cibulí rodu *Narcissus* a přibližně 70 % celosvětové produkce pochází právě z těchto dvou zemí^{22,23}.

3.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou v lidovém léčení používány již po několik tisíciletí. První záznam potvrzující tuto skutečnost je datován již ve 4. století př. n. l., kdy Hippokratés z Kósu použil extrakt z *Narcissus poeticus* pro léčbu rakoviny dělohy. Použití olejových extraktů narcisů pro léčbu nádorových onemocnění se v období středověku rozšířilo i do Číny, oblasti Blízkého Východu, severní Afriky a střední Ameriky^{13,24}.

Studii o významu AmA pro samotné rostliny je v porovnání se studii jejich farmakologické aktivity o dost méně. Z dosud dostupných informací se předpokládá, že AmA nejsou nezbytné pro růst a vývoj rostlin. Hrají ale velkou roli jako obrana proti mikroorganismům, býložravcům a predátorům^{18,25}.

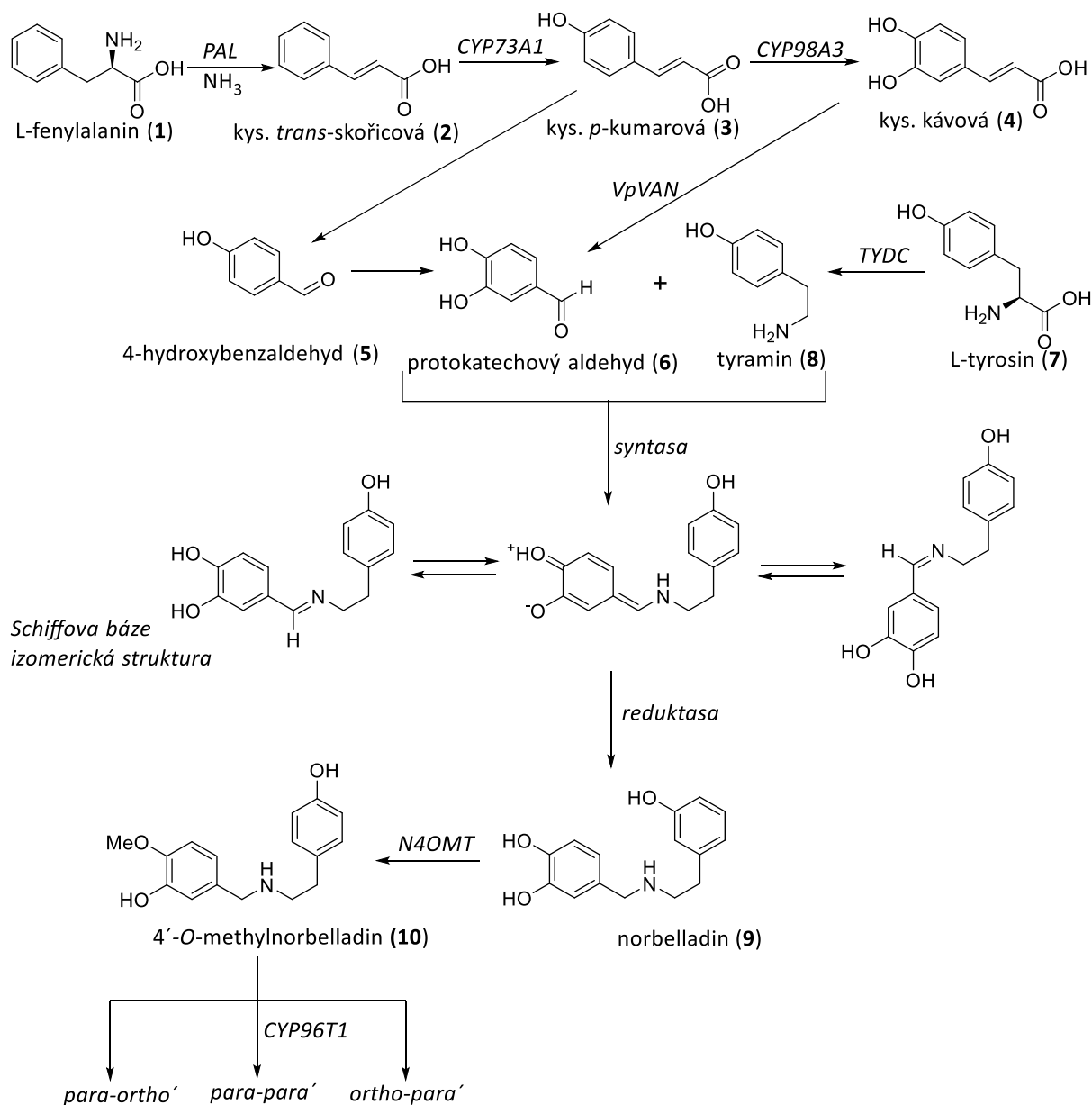
AmA představují rozsáhlou a stále se rozrůstající skupinu isochinolinových alkaloidů, které jsou typické pro tuto čeleď. Jako první byl v roce 1877 izolován z *Narcissus pseudonarcissus* lykorin²¹. Od té doby bylo izolováno více než 650 amaryllidových alkaloidů a jejich počet se nadále zvyšuje¹².

AmA mají široké spektrum biologických aktivit. Mezi ty doposud známé patří jejich schopnost inhibovat cholinesterasy. Dále se jedná o aktivitu protinádorovou, antivirovou, antimalarickou, protizánětlivou, antimikrobiální a další²⁵.

3.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů

Společným znakem AmA je jejich syntéza, která probíhá norbelladinovou cestou. Nezbytná je přítomnost dvou aromatických aminokyselin, L-fenylalaninu a L-tyrosinu, které jsou transformovány. Přeměna L-fenylalaninu probíhá v několika reakčních krocích. V prvním kroku je L-fenylalanin (**1**) přeměněn fenylalanin amonium-lyasou (*PAL*) na kyselinu *trans*-skořicovou (**2**). Dále je kyselina *trans*-skořicová hydroxylována na kyselinu *p*-kumarovou (**3**) a to pomocí enzymu cinnamát-4-hydroxylasy, cytochromu P450 CYP73A1. Kyselina *p*-kumarová je metabolizována CYP98A3 na kyselinu kávovou (**4**) a 4-hydroxybenzaldehyd (**5**). Prokatechový aldehyd (**6**) může vznikat z 4-hydroxybenzaldehydu nebo z kyseliny kávové, která je transformována pomocí enzymu vanilin syntasy (*VpVAN*). L-Tyrosin (**7**) je přeměněn tyrosin dekarboxylasou (*TYDC*) na tyramin (**8**), který v dalším kroku kondenzuje s protokatechovým aldehydem za vzniku Schiffovy báze.

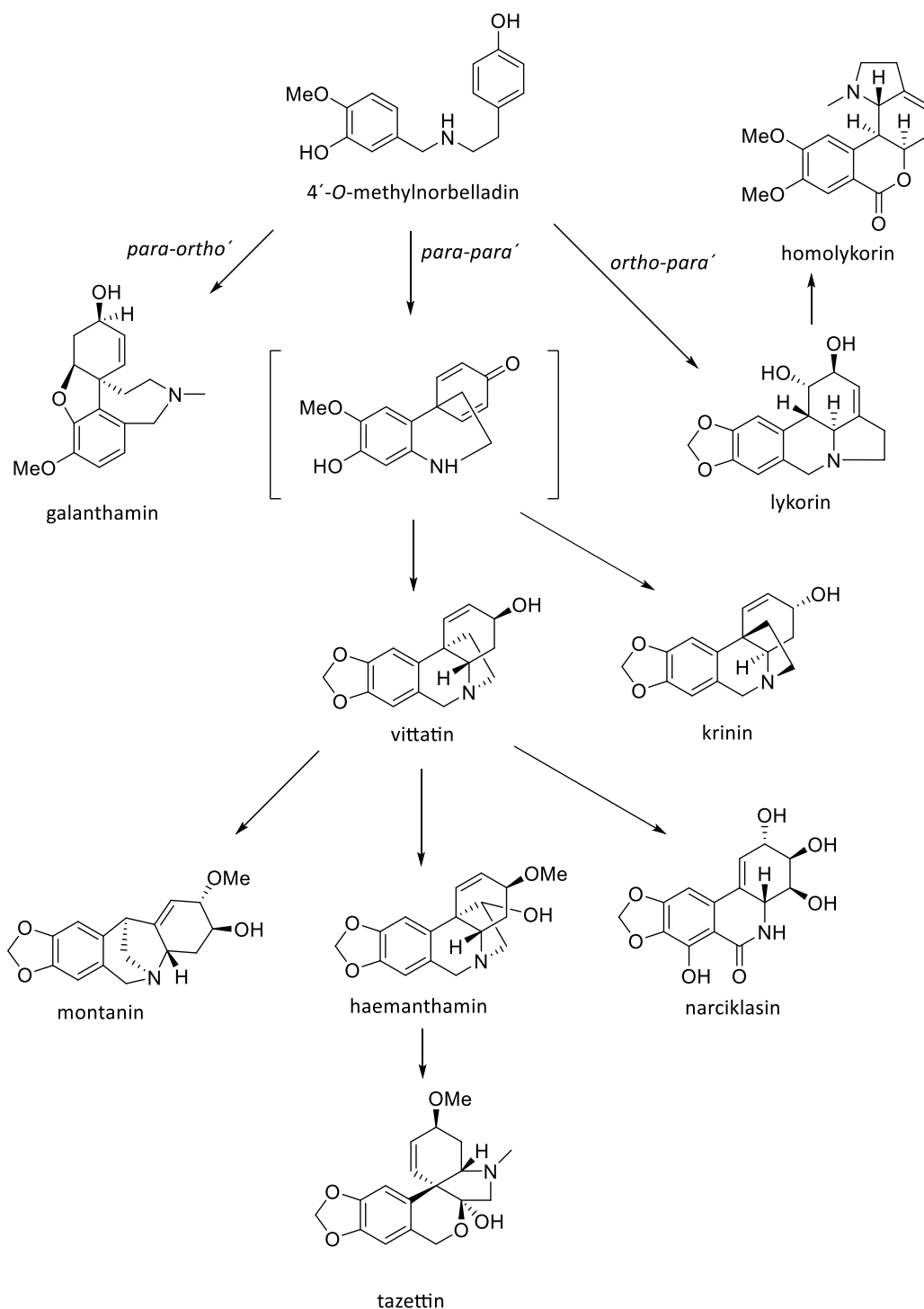
Schiffova báze je reduktasou přeměněna na norbelladin (**9**). Působením enzymu 4'-O-methyltransferasy (*N4OMT*) dochází k methylaci norbelladinu a vzniká klíčový meziprodukt 4'-O-methylnorbelladin (**10**). 4'-O-Methylnorbelladin podléhá cyklizaci pomocí oxidace fenol-fenol za vzniku vazby C-C. Jsou rozlišovány tři typy cyklizace: *para-ortho'*, *para-para'* a *ortho-para'*. Tato spojení vedou k tvorbě nejrůznějších strukturních typů AmA. Obr. 2 uvádí schéma popisující tyto reakční kroky. Cyklizace *ortho-para'* umožňuje vznik lykorinového a homolykorinového typu. Cyklizací *para-para'* vznikají alkaloidy krininového, narciklasinového, tazettinového a montaninového typu. *Para-ortho'* cyklizací vzniká galanthaminový typ AmA^{12,13,26}.



Obr. 2: Biosyntéza 4'-*O*-methylnorbelladinu²⁶

Jak již bylo zmíněno výše, intramolekulárním oxidativním spojením vznikají základní skelety AmA, které můžeme rozdělit do devíti základních skupin. Tyto základní strukturní typy jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce. Jedná se o typ lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin) a krininový (krinin). K těmto sedmi skupinám dále řadíme i osmý typ, montaninový (montanin), jehož biosyntéza nebyla doposud zcela jasně popsána. Posledním, devátým základním strukturním typem je typ

norbelladinový (*O*-methylbelladin), který je klíčovým meziproduktem pro vznik výše zmíněných alkaloidů (Obr. 3)^{13,26}.

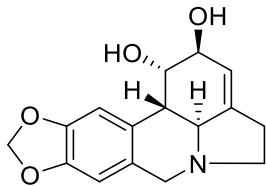


Obr. 3: Biosyntéza základních typů AmA^{13,26}

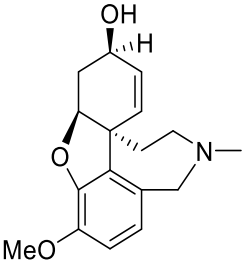
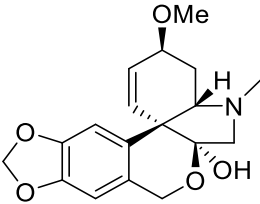
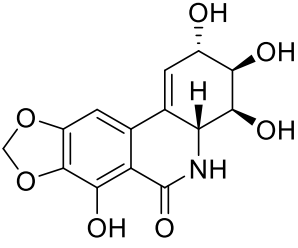
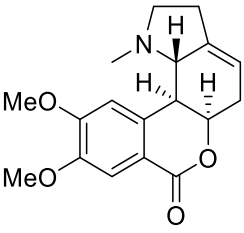
3.2.2 Alkaloidy izolované z rodu *Narcissus* L.

Z rodu *Narcissus* bylo doposud izolováno více než 100 AmA patřících mezi různé strukturální typy¹⁷. Tab. 1 uvádí hlavní zástupce základních strukturálních typů AmA a druhy rodu *Narcissus* L., ze kterých byly tyto alkaloidy izolovány²⁷. Popsána byla také přítomnost alkaloidů, jejichž struktura je charakterizována spojením dvou strukturálních typů. Příkladem je alkaloid pallidiflorin (Obr. 4), izolovaný z *Narcissus pallidiflorus*. Tato sloučenina je tvořena galanthaminovým a tazettinovým strukturálním typem. Výzkum probíhající na katedře farmaceutické botaniky FaF UK v HK vedl k izolaci a identifikaci tří nových alkaloidů, jejichž struktura představuje kombinaci již známého galanthaminového a galantindolového typu, tento nový strukturální typ byl nazván jako narcikachninový. Konkrétně se jedná o alkaloidy narcipavlin a narcikachnin (Obr. 4), získané z druhu *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol, a alkaloid narcimatulin (Obr. 4) obsažený v *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master^{17,28,29,30}. Zvláštním typem AmA jsou alkaloidy mesembranového typu, které byly identifikované i ve dvou druzích narcisů, *Narcissus pallidulus* a *Narcissus triandrus*²¹. V *N.pallidulus* byl tento typ zastoupen z více než 95%, detekovanými alkaloidy byly mesembrenon (Obr. 4), mesembrenol a mesembrin. Alkaloidy mesembranového typu jsou typické pro rod *Sceletium* (Aizoaceae), výskyt i u rodu *Narcissus* je vysvětlován možnou mutací genů kódujících první kroky biosyntézy AmA¹⁸.

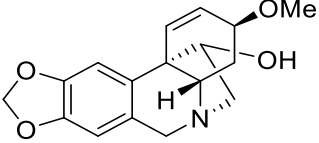
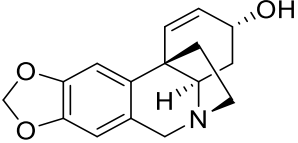
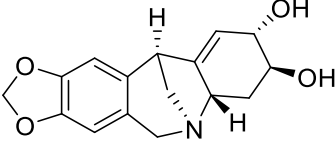
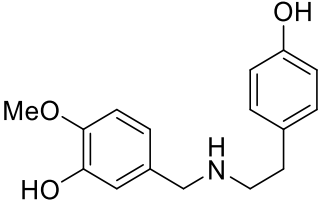
Tab. 1: Vybraní zástupci AmA jednotlivých základních strukturálních typů izolovaných z rodu *Narcissus* L.²⁷

Strukturální typ ^a	Hlavní zástupci	Druhy rodu <i>Narcissus</i>
	<u>Lykorin</u>	<i>N. leonensis</i> Pugsley
	Galanthin	<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Grand Maître
	Karanin	<i>Narcissus</i> L. cv. Ice Follies
	Pluviin	<i>Narcissus</i> L. cv. Twink
	Norpluviin	<i>Narcissus</i> L. cv. Texas
	Narcissidin	<i>N. tazetta</i> L.

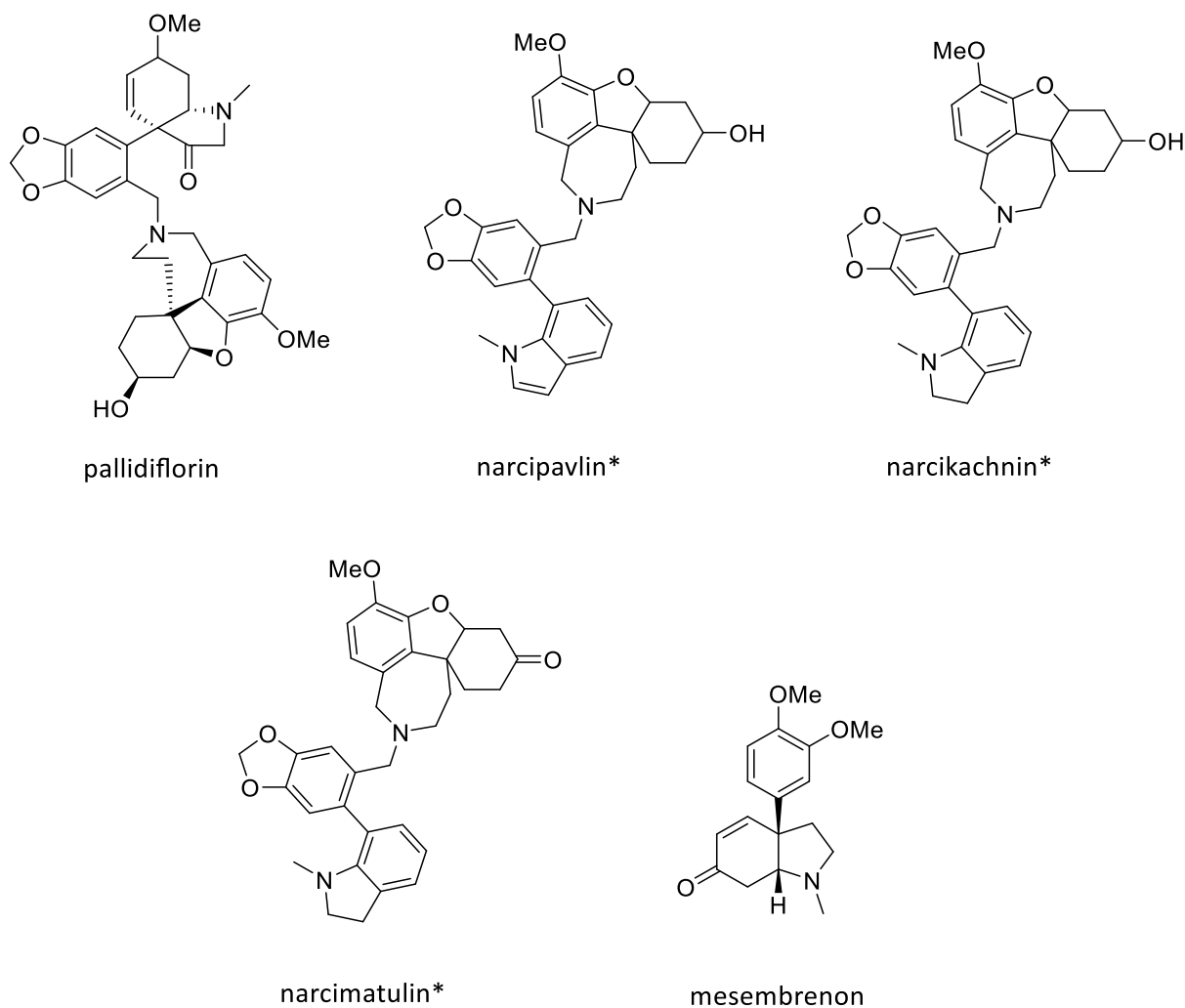
Tab. 1 pokračování: Vybraní zástupci AmA jednotlivých základních strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus* L.²⁷

<p>Galanthaminový</p> 	<p><u>Galanthamin</u></p> <p>Narwedín</p> <p>Lykoramin</p> <p>Norlykoramin</p> <p>Epinorgalanthamin</p>	<p><i>N. poeticus</i> L.</p> <p><i>N. cyclamineus</i> DC.</p> <p><i>N. cyclamineus</i> DC.</p> <p>cv. February Gold</p> <p><i>Narcissus</i> L. cv. Ice Follies</p> <p><i>N. leonensis</i> Pugsley</p>
<p>Tazettinový</p> 	<p><u>Tazettin</u></p> <p>Pretazettin</p> <p>3-Epimakronin</p>	<p><i>N. bujei</i> (Fdez. Casas) Fdez. Casas, <i>N. cantabricus</i> DC.</p> <p><i>N. bicolor</i> L., <i>N. tazetta</i> L.</p> <p><i>N. bicolor</i> L.</p>
<p>Pakratistatinový</p> 	<p><u>Narciklasin</u></p> <p>Ismin</p>	<p><i>N. pseudonarcissus</i> L.</p> <p>cv. Golden Harvest</p> <p><i>N. bicolor</i> L.</p>
<p>Homolykorinový</p> 	<p><u>Homolykorin</u></p> <p>9-O-Demethylhomolykorin</p> <p>Masonin</p> <p>Hippeastrin</p> <p>Odulin</p>	<p><i>N. eugeniae</i> Fdez. Casas</p> <p><i>N. bicolor</i> L.</p> <p><i>N. tazetta</i> L.</p> <p><i>N. pseudonarcissus</i> L.</p> <p>cv. Carlton</p> <p><i>N. pseudonarcissus</i> L.</p> <p>cv. Carlton</p>

Tab. 1 pokračování: Vybraní zástupci AmA jednotlivých základních strukturních typů izolovaných z rodu *Narcissus* L.²⁷

<p>Haemanthaminový</p> 	<p><u>Haemanthamin</u></p> <p>Haemanthidin</p> <p>Maritidin</p> <p>8-O-Demethylmaritidin</p> <p>Vittatin</p>	<p><i>N. pseudonarcissus</i> L.</p> <p><i>N. tazetta</i> L.</p> <p><i>N. tazetta</i> L. var. <i>chinensis</i> Roem</p> <p><i>N. primigenius</i> (Laínz) Fdez. Casas and Laínz</p> <p><i>N. cantabricus</i> DC.</p>
<p>Krininový</p> 	<p><u>Krinin</u></p>	<p><i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. cv. Dutch Master¹⁷</p>
<p>Montaninový</p> 	<p><u>Pankracin</u></p>	<p><i>N. poeticus</i> L.</p>
<p>Norbelladinový</p> 	<p><u>O-Methylnorbelladin</u></p>	<p><i>N. pseudonarcissus</i> L.</p>

^a vzorec ve sloupci Strukturní typ patří vždy prvnímu uvedenému zástupci daného typu.



*Absolutní konfigurace nebyla doposud určena^{17,28}

Obr. 4: Struktury pallidiflorinu, narcipavlinu, narcikachninu, narcimatulinu a mesembrenonu

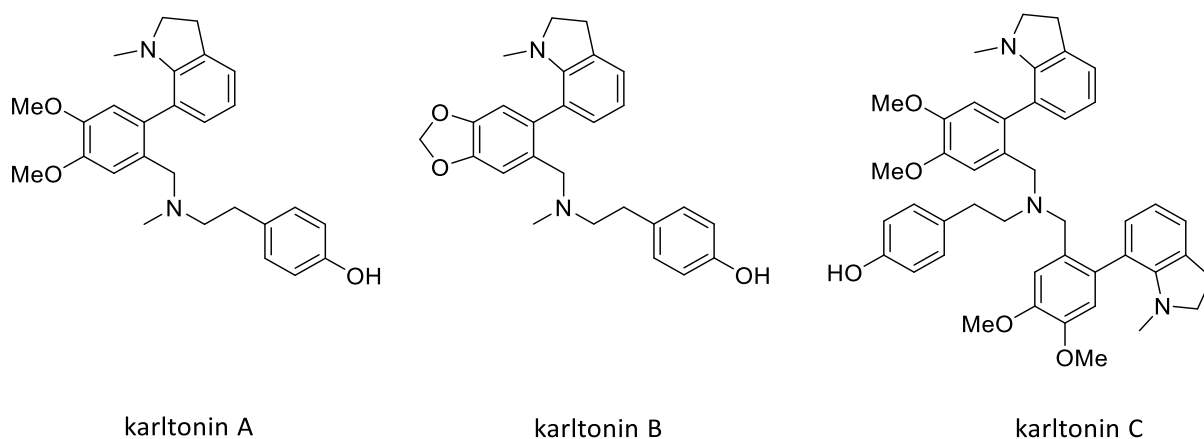
3.2.2.1 Alkaloidy druhu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton

Jak již bylo výše uvedeno, kultivar Carlton je pěstován nejen pro okrasné účely, ale také pro přítomnost galanthaminu, který je používán při léčbě mírných a středně těžkých forem AD. Díky této skutečnosti stále vzrůstá zájem o tuto rostlinu a snaha izolovat nové typy alkaloidů, které by mohly vykazovat zajímavé a využitelné biologické aktivity²³.

Koncentrace jednotlivých metabolitů se mění v závislosti na růstovém cyklu rostliny a jejím stáří. Pro získání maximálních výtěžků je nezbytné znát období, kdy je obsah alkaloidů v cibuli nejvyšší a tomu přizpůsobit jejich sklizeň. Tím se zabývala jedna ze studií²³, která zjišťovala, jaký vliv má stáří cibulí na obsah alkaloidů u *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Ve studii byly porovnávány cibule staré jeden, dva a tři roky. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší

obsah alkaloidů se nachází ve dvouletých cibulích. Jednoroční cibule obsahovaly vyšší množství cholinu, kyseliny octové, glukosy a aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. V tříletých cibulích byly detekovány vyšší hladiny haemanthaminu, mastných kyselin a valinu²³.

Izolací alkaloidů z cibulí tohoto kultivaru a zjišťováním jejich biologické aktivity se zabývá i výzkumná skupina ADINACO. Z výsledků vyplývá, že nejvíce obsaženými alkaloidy v *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton jsou galanthamin a haemanthamin. Dále bylo izolováno třináct již známých AmA, jmenovitě lykosinin B, trisphaeridin, 3,4-anhydrogalanthamin, odulin, masonin, galanthamin, galanthin, lykorenin, lykoramin, homolykorin, haemanthamin, vittatin a 9-*O*-demethylhomolykorin. Izolovány byly i tři nové AmA. Nově izolované sloučeniny byly pojmenovány jako karltonin A, karltonin B a karltonin C, (Obr. 5). Tyto alkaloidy se řadí k norbelladinovému typu⁶.



Obr. 5: Tři nově izolované alkaloidy norbelladinového typu

3.3 Biologická aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

3.3.1 Protinádorová aktivita

Rakovina je celosvětově považována za jeden z hlavních zdravotních problémů. Představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí. V důsledku nádorových onemocnění ročně zemře téměř 10 milionů osob³¹. V České republice jsou nádorová onemocnění zodpovědná za úmrtí více než 27 000 lidí ročně, což je téměř čtvrtina celkové úmrtnosti³².

Již několik let jsou pro léčbu nádorových onemocnění využívány látky, které byly získány z rostlinných zdrojů. K nejznámějším patří vinka alkaloidy (vinkristin a vinblastin),

taxany (paklitaxel, docetaxel), alkaloid podofylotoxin a jeho deriváty topotekan a irinotekan, a v neposlední řadě také antracykliny (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin). V posledních letech je čím dál větší pozornost směřována i k AmA, které vykazují široké spektrum biologických aktivit^{33,34}.

Pro svůj cytotoxický potenciál byly intenzivně studovány alkaloidy lykorin, pankratistatin, narciklasin, haemanthamin a montanin. Jejich cytotoxická aktivita byla pozorována u širokého spektra buněčných linií MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF-7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, A2780 a dalších³⁵.

3.3.1.1 Lykorinový strukturní typ

Lykorin (Obr. 6) je hojně se vyskytující AmA. Patří do skupiny alkaloidů, které jsou deriváty pyrrolo[de]fenanthridinu. Lykorin je cytotoxicky aktivní již při velmi nízkých koncentracích, působí vysoce selektivně proti nádorovým buňkám, a to za současného výskytu jen mírných vedlejších účinků. Aktivitu vykazuje i u nádorových buněk rezistentních vůči apoptóze. Jeho cytotoxické vlastnosti byly pozorovány *in vitro* i *in vivo* studiích. Protinádorová aktivita lykorinu a jeho derivátů byla zkoumána například u linie lidských T lymfocytů (Jurkat). Tyto výzkumy ukázaly, že za indukci apoptózy jsou zodpovědné hydroxylové skupiny, umístěny v poloze 1 a 2 na C kruhu, které umožňují vazbu s guanosin trifosfátem (GTP)^{12,34,36}.

Za protinádorovou aktivitu lykorinu je zodpovědných několik mechanismů. Lykorin je schopen indukovat apoptózu u nádorových buněk. Tento efekt byl pozorován u rakoviny prsu, močového měchýře a hematologických malignit (leukemie a myelomů). K apoptóze dochází vnitřní mitochondriální cestou nebo vnější cestou, a to přes receptory smrti. Dále dochází ke zvýšené aktivitě kaspas-3, kaspas-8 a kaspas-9. Lykorin zvyšuje aktivitu proapoptických proteinů BAX a snižuje aktivitu anti-apoptických proteinů Bcl-2³⁴.

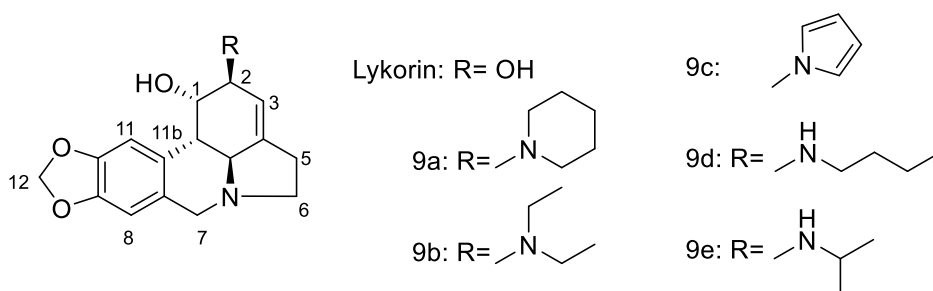
Dalším z mechanismů je zástava cyklu buněčného dělení ve fázi G0/G1 nebo ve fázi G2/M. Zástava buněčného dělení ve fázi G0/G1 byla popsána během studie prováděné na buňkách lidského mnohočetného myelomu (KM-3). Výsledky vedly k poznání, že při působení lykorinu na tyto buněčné linie dochází k akumulaci buněk, ireverzibilnímu poškození DNA a indukci apoptózy. Zástava dělení v G2/M fázi byla pozorována při testování linie lidských leukemických promyeocytů (HL-60) a u buněčné linie nádoru vaječníku (HeyB1)^{13,34}.

Mezi dosud zjištěné účinky lykorinu patří i jeho schopnost zahájit programovanou nekrózu. Ta je spojena se zvyšováním exprese RIP-1 (receptor-interacting protein 1) a RIP-3 (receptor-interacting protein 3), které fungují jako spouštěče nekrózy. Tyto jevy jsou dále spojeny s deplecí ATP, poškozením DNA a dysfunkcí mitochondrií, což je doprovázeno vznikem reaktivních forem kyslíku³⁴.

V jedné z *in vitro* studií byla protinádorová aktivita lykorinu a jeho derivátů sledována u sedmi nádorových buněčných linií. A549 (karcinom plic), HCT116 (kolorektální karcinom), SK-OV-3 (ovariální karcinom), NCI-H460 (karcinom plic), K562 (myeloidní leukemie), MCF-7 (rakovina prsu) a HL-60 (promyelocytární leukemie). Z výsledků bylo zjištěno, že v porovnání s ostatními deriváty, deriváty substituované v poloze C2 aminoskupinami (Obr. 6) vykazují velmi dobrou protinádorovou aktivitu. Naměřené hodnoty lykorinu a jeho aminoderivátů jsou uvedeny v Tab. 2³⁷.

Tab. 2: *In vitro* působení lykorinu a jeho derivátů na nádorové linie, hodnoty IC₅₀ (μM)³⁷.

	A549	HCT116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	MCF-7	HL-60
Lykorin	6,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	7,5 ± 0,5	3,9 ± 0,2	4,1 ± 0,1
Derivát 9a	14,2 ± 0,5	7,9 ± 0,3	4,5 ± 0,3	9,9 ± 0,4	>20	>20	8,3 ± 0,2
Derivát 9b	15,2 ± 0,6	6,4 ± 0,2	16,8 ± 0,4	8,0 ± 0,4	12,8 ± 0,5	5,2 ± 0,3	>20
Derivát 9c	>20	>20	15,5 ± 0,3	8,1 ± 0,7	12,0 ± 0,8	20,9 ± 0,6	9,1 ± 0,5
Derivát 9d	16,3 ± 1,3	10,1 ± 0,1	12,6 ± 0,7	6,5 ± 0,2	6,1 ± 0,3	>20	9,7 ± 0,2
Derivát 9e	>20	20,5 ± 0,7	13,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3	>20	19,7 ± 0,5	>20



Obr. 6: Vzorec lykorinu a jeho aminoderivátů testovaných *in vitro*³⁷

Další studie se zabývaly působením lykorinu vůči buňkám kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom je celosvětově třetím nejčastěji diagnostikovaným maligním nádorem. I přesto, že detailní mechanismus působení lykorinu při léčbě kolorektálního karcinomu je

dosud neobjasněný, byla v testech *in vitro* a *in vivo*, zjištěna interakce lykorinu s doménami MEK 2 (mitogenem aktivované proteinkinasy). To bylo dále potvrzeno degradací fosforylované MEK 2 a jejich dalších cílů, ke kterým docházelo během terapie lykorinem. Navíc kombinace s léčivem verumafenibem vedla k lepším výsledkům a tato kombinace se jeví jako možná léčba kolorektálního karcinomu³⁶. Lykorin působil cytotoxicky i na buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29³⁸.

Lykorin také potlačuje růst buněk hepatocelulárního karcinomu. Studie probíhaly se třemi buněčnými liniemi hepatocelulárního karcinomu a kontrolní nenádorovou buněčnou linií. Z výsledku vyplývá, že lykorin podporuje autofágií a indukovanou apoptózu cestou TCRP1/Akt/mTOR. Tato aktivita je popisována snížením hladin proteinu TCRP1 (tongue cancer resistance-associated protein 1), což vede ke snížení fosforylace Akt (proteinkinasa B) a útlumu Akt/mTOR signalizace³⁹.

Další studie popisují protiinvazivní účinky lykorinu u buněčných linií karcinomu plic (A549 a H460). Protinádorové účinky lykorinu byly spojeny s potlačením Wnt/ β -katenin signalizační kaskády⁴⁰.

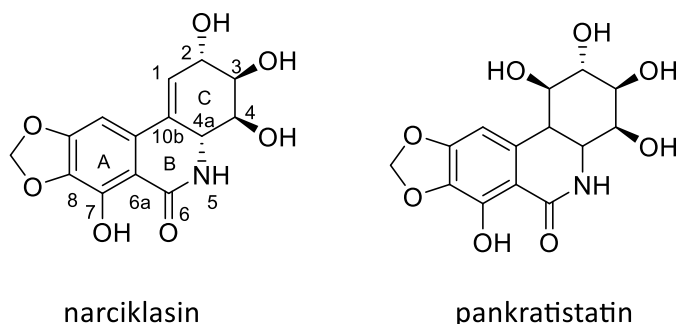
3.3.1.2 Pankratistatinový strukturní typ

Narciklasin (Obr. 7) je jedním z nejdůležitějších AmA, které působí jako antineoplastika. Byl objeven v druhích *Narcissus* v roce 1967. Od té doby je narciklasin pro své selektivní a vysoce silné cytotoxické působení na rakovinové buňky intenzivně studován. Jeho protinádorová aktivita byla sledována *in vitro* na 60 lidských nádorových buněčných liniích, nejvíce citlivými buňkami byly buňky melanomu. Byly prováděny také *in vivo* studie na myších modelech^{13,41}.

Narciklasin narušuje buněčné dělení ve stadiu metafáze. Interaguje s 60S podjednotkou ribozomu a brání tvorbě peptidové vazby a navázání 3'terminálního konce donorového substrátu na centrum peptidyltransferasy. Tyto procesy vedou k inhibici proteosyntézy. Předpokládá se, že tato aktivita je závislá na konformaci C kruhu a volné hydroxylové skupině v poloze 7. Dalším z popsaných mechanismů účinku narciklasinu je inhibice eukaryotického translačního elongačního faktoru eEF1A. Tato aktivita byla sledována během studie na imunodeficientních myších, do kterých byly vpraveny melanomové vůči apoptóze rezistentní buňky VM-48. Terapeutické účinky byly sledovány při podávání

narciklasinu v dávkách 1mg/kg. Narciklasin užívaný ve vysokých koncentracích 1 μ M způsobuje smrt rakovinových buněk, a to mechanismem aktivace receptorů smrti Fas a DR4 (death receptor 4). Narciklasin také působí proti celé řadě nádorových buněk, jako je lidská a myší lymfocytární leukemie, karcinomy děložního čípku a hrtanu. Vykazuje inhibiční aktivitu vůči linii HeLa buněk a Ehrlichovým nádorovým buňkám. Další studie také potvrdily schopnost indukce apoptózy u buněk adenokarcinomu prsu MCF-7, karcinomu prostaty PC-3 a u nádorových buněk žaludku^{13,21,41,42}.

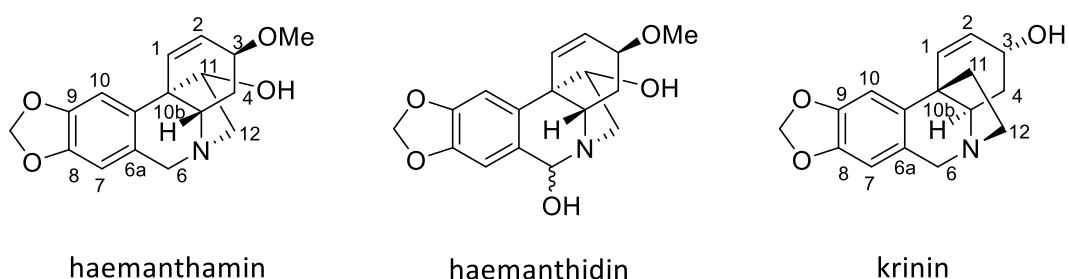
Pankratistatin (Obr. 7) byl poprvé izolován roku 1984 z rostliny *Hymenocallis littoralis*. Následně bylo zjištěno, že má antineoplastické a cytotoxické účinky. Jedna ze studií⁴³ potvrdila, že pankratistatin v koncentraci 1 μ M, je schopen indukovat apoptózu a působit vysoce selektivně proti nádorovým buňkám. Jeho aktivita byla hodnocena například u buněčné linie MCF-7 (rakovina prsu), SHSY-5Y (lidský neuroblastom), NT-2 (lidský teratom), Jurkat (T-akutní lymfoblastická leukémie) a nenádorové, kontrolní linie NHF (normální lidský fibroblast). Z výsledků vyplývá, že pankratistatin nevyvolává apoptózu u zdravých buněk, jelikož u těchto buněk nedošlo k žádným morfologickým změnám. Pankratistatin během působení na nádorové buňky zvyšuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a snižuje koncentraci molekul ATP v buňkách^{43,44}. Dále bylo zjištěno, že indukce apoptózy je spojená s aktivací kaspasy-3. Následně dojde k nerovnováze mezi vnitřním a vnějším prostředím a produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), což vede ke změnám membránového potenciálu mitochondrií a ztrátě jejich funkce. Tento průběh byl sledován při působení pankratistatinu proti buněčné linii Jurkat, kdy byla zároveň znovu potvrzena vysoká selektivita proti nádorovým buňkám, jelikož u zdravých lymfocytů nebyly evidovány žádné změny⁴⁵. Tato aktivita byla dále sledována i u buněk karcinomu prostaty, konkrétně na buněčných liniích DU145 a LNCaP. U obou těchto buněčných linií byla zvýšena produkce ROS a kolaps funkce mitochondrií⁴⁶.



Obr. 7: Struktury vybraných AmA alkaloidů pankratistatinového typu

3.3.1.3 Haemanthaminový strukturní typ

Dalšími alkaloidy s cytotoxickou aktivitou jsou haemanthamin a haemanthidin, které patří k hlavním zástupcům haemanthaminového strukturního typu⁴⁷. Základem haemanthaminového, ale i krininového typu je 5,10b-etanofenanthridin²¹. Tyto dva typy se liší pouze v prostorové orientaci etylového můstku vedoucího z atomu dusíku na uhlík C10b, důsledkem toho vznikají dvě stereoizomerní formy, α -krininová (haemanthaminový strukturní typ: haemanthamin) a β -krininová (krininový typ: krinin) (Obr. 8). Tato skutečnost vede k tomu, že jsou tyto dva typy někdy společně řazeny do skupiny krininového typu⁴⁸.



Obr. 8: Struktura haemanthaminu, haemanthidinu a krininu

Cytotoxické působení haemanthaminu bylo potvrzeno u rozličných buněčných nádorových linií, například MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF7, CEM, K562, A549, Caco-2, HT-29, A2780, SW1573 a T47-D. Působení haemanthaminu bylo sledováno i na buněčné linii Jurkat, která je využívána ke studiu akutní lymfoblastické leukemie. Haemanthamin v koncentracích od 5 μ M do 20 μ M zvyšoval apoptózu Jurkat buněk. Dále byla pozorována aktivita kaspasy-3, kaspasy-7, kaspasy-8 a kaspasy-9, snížení membránového potenciálu mitochondrií a zastavení buněčného cyklu v G1 a G2/M fázi⁴⁷. Předpokládaným mechanismem účinku haemanthaminu je jeho schopnost inhibovat proteosyntézu, a to zabráněním vazby peptidyltransferasy na 60S ribozomální podjednotku⁴⁸.

Druhým zástupcem je haemanthidin, který může vznikat ireverzibilní enzymatickou přeměnou z haemanthaminu. Haemanthidin působil v *in vitro* studiích cytotoxicky proti nádorovým liniím A549, OE21, Hs683 a SKMEL. Další jeho vlastností je schopnost inhibovat růst buněk myšího lymfomu L5178. Efekt haemanthidinu sledovaný u buněčné linie Jurkat byl velmi podobný účinku haemanthaminu⁴⁷.

V jedné ze studií byly alkaloidy haemanthamin a haemanthidin spolu s dalšími 11 alkaloidy testovány a hodnoceny pro svou cytotoxickou aktivitu. Cytotoxicita byla testována u dvou p53-mutovaných gastrointestinálních rakovinových buněčných liniích HT-29 a Caco-2 (buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu). Semisyntetický vinka alkaloid vinorelbin, byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledné hodnoty experimentu byly srovnány s účinkem na nenádorové buňky střevního epitelu FHS-74Int (Tab. 3)³⁸.

Tab. 3: Cytotoxicita testovaných alkaloidů proti dvěma nádorovým buněčným liniím (Caco-2, HT-29) a nenádorové gastrointestinální buněčné linii (FHS-74Int), vyjádřena jako hodnota IC₅₀ uvedena v μM³⁸.

Alkaloid	Caco-2	HT-29	FHS-74Int
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemanthidin	3,3 ± 0,9	1,70 ± 0,10	11,6 ± 0,9
Vinorelbin	0,03 ± 0,00	-	4,0 ± 0,3

3.3.2 Inhibiční aktivita vůči cholinesterasám

3.3.2.1 Alzheimerova choroba

3.3.2.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Demence patří mezi jedny z nejčastějších a nejobávanějších onemocnění, které se vyskytují u osob vyššího věku⁴⁹. Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, jejichž typickým klinickým obrazem je nejprve zhoršení a následně postupná ztráta paměti a orientace, poruchy myšlení a snížená schopnost učení⁵⁰.

Podle odhadů trpí demencí více než 6 % populace nad 65 let. Se stoupajícím věkem se výskyt zvyšuje a může postihovat až 50 % osob starších 80 let⁴⁹. Celosvětově trpí některou z forem demence více než 47 milionů obyvatel. Podle WHO se počet pacientů s touto indikací do roku 2050 ztrojnásobí na více než 135 milionu případů⁵¹. Česká alzheimerovská společnost ve svých odhadech uvádí, že na území České republiky žije přibližně 150 000 lidí trpících demencí a více než polovina všech těchto demencí je způsobena AD⁵².

3.3.2.1.2 HISTORIE AD

Alzheimerova choroba byla pojmenována podle německého neuropatologa a psychiatra Aloise Alzheimera (1864-1915). Alois Alzheimer začal po úspěšném ukončení studia medicíny pracovat v psychiatrické léčebně ve Frankfurtu nad Mohanem, kde se společně s uznávaným neurologem Franzem Nisslem věnoval experimentálnímu studiu anatomie mozkové kůry. Později směřoval svou působnost na velmi známé pracoviště univerzitní psychiatrické kliniky v Mnichově. Alois Alzheimer poprvé popsal symptomy této choroby v roce 1906. Jednalo se o případ 51leté ženy, u které byl pozorován rapidně se zhoršující stav paměti a psychické potíže. Pacientka zemřela o 4 roky později, ve věku 55 let za stavu úplné demence. Při pitvě mozku zemřelé, objevil Alzheimer množství abnormálních vláken a plaků^{51,53}.

3.3.2.1.3 CHARAKTERISTIKA AD

AD je závažné progresivní a ireverzibilní neurodegenerativní onemocnění. Začátek onemocnění je většinou nenápadný, nebývá mu věnována taková pozornost a je často mylně spojován s fyziologickým procesem stárnutí. Většinou na projevy a změny upozorní pacientovi nejbližší, nikoliv on sám. V začátcích onemocnění dochází k oslabení kognitivních funkcí, poruchám paměti, ztrátám pozornosti a změnám chování, které se manifestují jako anxieta, deprese a apatie. U pacientů se objevují potíže s logickým myšlením a orientací v prostoru^{9,51,54}. Progrese onemocnění vede až k pozdnímu, těžkému stádiu. Pacienti v této fázi nejsou schopni poznat své příbuzné. Snižuje se jejich mobilita, a často zůstávají upoutáni na lůžko. Objevují se také potíže s polykáním a inkontinence⁵⁵.

Podle věku, ve kterém se u pacienta vyskytnou klinické projevy, se AD dělí na dvě formy. Presenilní forma se vyskytuje nejčastěji u pacientů mezi 30. až 50. rokem života. Její výskyt je vzácný (méně než 0,5 % případů). Příčinou vzniku jsou mutace genu pro amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN 2). Podstatně častější je senilní forma, která se manifestuje u osob starších 65 let^{9,56}.

3.3.2.1.4 ETIOPATOGENEZE

K charakteristickým patologickým nálezům patří extracelulární senilní plaky tvořené β -amyloidem ($A\beta$) a intracelulární depozita neurofibrilárních klubek (NFTs), které jsou tvořeny

τ -proteinem⁵⁷. Pozorována je také zvýšená aktivita acetylcholinesteras (AChE), která vede ke štěpení acetylcholinu a snížení jeho hladin. Zaznamenávána je i dysregulace hladin butyrylcholinesteras (BuChE)¹². Makroskopicky pozorovatelné změny zahrnují zúžené mozkové závitě, dilatované komory mozkové a atrofované subkortikální i kortikální struktury amygdaly, hippocampu a temporálních laloků⁵⁸.

Za více než 100 let, co je toto onemocnění známé, bylo zkoumáno a popsáno velké množství rizikových faktorů a celá řada hypotéz věnujících se vzniku AD. I přes tyto skutečnosti, nebyla hlavní příčina patologických změn doposud přesně vysvětlena. AD je tak považována za multifaktoriální onemocnění. Mezi rizikové faktory patří stárnutí, úrazy hlavy, infekce, cévní onemocnění, hypercholesterolemie, mutace genů, oxidační stres, neurogení záněty a další^{55,58,59}. Mezi dvě hlavní hypotézy patří hypotéza cholinergní a amyloidní, které jsou spolu s dalšími popsány níže⁵⁵.

Cholinergní hypotéza

Fyziologická funkce cholinergního systému je esenciální pro správnou činnost paměti a udržování kvalitativní úrovně vědomí. Již v časných stádiích AD dochází k postižení cholinergního neurotransmiterového systému a k snížení syntézy a výdeje acetylcholinu (ACh). To se projevuje kognitivními a behaviorálními poruchami. Za fyziologických podmínek je ACh ve zdravém mozku rozkládán účinkem AChE. BuChE jsou zastoupeny pouze menšinově a mají podpůrnou funkci. Tyto dvě cholinesterasy se navzájem liší ve své struktuře, což se projevuje i jejich rozdílnou substrátovou specifitou. AChE je vysoce selektivní vůči molekulám ACh, oproti tomu BuChE může metabolizovat různé molekuly a neuroaktivní peptidy. AChE existuje ve třech různých izoformách, které se dělí podle počtu katalytických podjednotek na monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4. V jednotlivých oblastech lidského mozku se nachází izoformy G1 a G4 v různých poměrech. BuChE existuje také ve více izomerních formách, ale ve zralém mozku se nejvíce vyskytuje izoforma G4. Během AD dochází k významným změnám v množství výše zmíněných izoform, předpokládá se, že tyto děje jsou způsobeny přítomností A β . Hladiny G4 AChE klesají až o 90 %, ale ke změnám v množství G1 AChE dochází jen velmi sporadicky. Isoforma G4 BuChE klesá nebo je nezměněna. Naopak G1 izoforma BuChE se zvyšuje až o 60 %. Inhibicí AChE a BuChE dojde ke zvýšení množství synaptického acetylcholinu, zlepšení acetylcholinergní transmise a oddálení progresu příznaků AD. Bylo potvrzeno, že

účinnost jednotlivých inhibitorů cholinesteras se liší, právě kvůli jejich rozdílné selektivitě k izoformám AChE a BuChE^{54,60}.

β-Amyloidní hypotéza

APP je transmembránově uložený protein, který se vyskytuje zcela běžně a podílí se například na tvorbě neurálních synapsí. Fyziologicky je APP přirozeně štěpen α-sekretasami na krátké solubilní fragmenty o délce 26 aminokyselin, které jsou schopny přecházet přes buněčné membrány. U AD působí patologicky enzymy β-sekretasa a γ-sekretasa, které štěpí APP na částice sestávající se z více než 42 aminokyselin, které se spojují mezi sebou. To vede ke vzniku neurotoxických oligomerů. Ty se dále shlukují a koagulují v mezibuněčných prostorech za vzniku Aβ, který se vyskytuje ve formě Aβ 40 a Aβ 42. Tyto formy tvoří základ senilních plaků. Přítomnost plaků vede k různým neuropatologickým dějům, jako je aktivace glykogen syntasy kinasy-3β (GSK-3β), degradace τ-proteinu, a následný vznik NFTs. Pozorovány jsou i další neurodegenerativní procesy, jako je aktivace cyklooxygenas a vznik zánětu v místě senilních plaků, dále také vyplavení nadbytku excitačních aminokyselin. V důsledku těchto dějů dochází k apoptóze poškozených neuronů^{9,55}.

Hypotéza τ-proteinu

τ-Protein je protein obsažený v neuronech. Jeho normální funkcí je stabilizace buněčných mikrotubulů. U AD dochází k hyperfosforylaci τ-proteinu, což vede k zvýšené depolymerizaci mikrotubulů a vzniku nerozpustných oligomerů, které dále akumulují a formují se v párová helikální filamenta. Tato filamenta se následně sdružují do NFTs v nervových buňkách. NFTs interagují s buněčnými proteiny a brání jejich normální funkci. Na hyperfosforylaci τ-proteinu se podílí kinasy, známým typem je GSK-3β (glykogen syntasy kinasy-3β) a CDK-5 (cyklin-dependentní kinasa 5). Předpokládá se, že aktivace těchto enzymů je iniciovaná akumulací Aβ. Existují také důkazy o tom, že toxický τ-protein zvyšuje produkci Aβ mechanismem zpětné vazby. Tyto děje vedou až k zániku neuronů^{57,61,62}.

Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) se nejvíce nachází v játrech, méně pak také v mozkové tkáni, kde je tvořen mikroglie a astrocyty. Slouží jako ligand pro částice lipoproteinů, a významně

se podílí na transportu cholesterolu, který je nezbytný pro normální funkci mozku a produkci myelinu. Gen pro ApoE je lokalizován na 19. chromozomu. ApoE je přítomný ve třech izoformách: ApoE2, ApoE3 a ApoE4, které jsou kódovány třemi alelami genu pro ApoE, a to sice epsilon2 (ϵ 2), epsilon3 (ϵ 3), epsilon4 (ϵ 4). ApoE- ϵ 4 hraje významnou roli v ukládání A β a tvorbě senilních plaků, a to jej řadí k silným rizikovým faktorům pro vznik presenilní i senilní formy. U osob s dvěma kopiemi ApoE ϵ 4 bylo sledováno až 8krát vyšší riziko vzniku AD, v porovnání s lidmi, kteří tuto alelu nemají. ApoE byl také detekován v amyloidových placích. Oproti tomu alely ApoE ϵ 2 and ApoE ϵ 3 mají protektivní funkci a jsou považovány za faktory snižující riziko vzniku AD^{55,58}.

Cholesterol a AD

Známá je také spojitost mezi AD a metabolismem lipidů. Cholesterol ovlivňuje neurodegenerativní procesy u AD pozitivně i negativně. Jedním z vysvětlení tohoto protikladného působení je jeho nerovnoměrná distribuce v různých kompartmentech buněčných membrán. Pozitivní je jeho protektivní funkce, jelikož brání vlivu toxického A β na buněčné membrány. Na druhé straně vysoké hladiny cholesterolu v krvi stimulují β -sekretasy. V důsledku toho dochází ke zvýšení množství A β a vzniku plaků. Vysoké hladiny cholesterolu způsobují aterosklerózu mozkových arterií, což vede k cerebrovaskulárním alteracím a zvýšení pravděpodobnosti vzniku AD. Z těchto zjištění vyplývá, že se hypercholesterolémie řadí mezi rizikové faktory pro vznik AD⁵⁸.

3.3.2.1.5 TERAPIE ALZHEIMEROVY CHOROBY

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o multifaktoriální onemocnění, jehož přesná etiopatogeneze není stále popsána. Terapie AD probíhá farmakologickými i nefarmakologickými postupy⁹.

Nefarmakologická léčba zahrnuje psychoterapeutické techniky, ke kterým patří například behaviorální terapie, relaxační techniky a aromaterapie. Pro pacienty je také velmi důležité procvičování doposud zachovalých dovedností. Podstatný je i laskavý přístup a velká trpělivost ošetřovatelů, kteří se o pacienty starají a rehabilitují s nimi. V neposlední řadě je důležité podporovat a pracovat s lidmi pečujícími o takto nemocné, mnohdy jim velmi blízké, osoby. Jedná se totiž o velmi vyčerpávající a psychicky náročnou činnost^{9,49}.

Současně dostupná farmakoterapie není schopna nemoc zastavit, či ji zcela vyléčit. Cílem je zpomalit progresi a oddálit tak nástup těžkých stádií. Podle EBM (Evidence-based medicine, medicína založena na důkazech) jsou k dispozici dva typy způsobu léčby, a to léčba pomocí inhibitorů cholinesteras a léčba za pomoci inhibitorů NMDA receptorů glutamátergního systému⁹.

Inhibitory cholinesteras

Takrin (Obr. 9) byl prvním používaným zástupcem léčiv ze skupiny inhibitorů cholinesteras. Kvůli jeho toxickému působení, které se manifestovalo jako hepatotoxicita a GIT dyskomfort, byl stažen z trhu. Huperzin A (Obr. 9) je alkaloid izolovaný z plavuně *Huperzia serrata*. Tato látka patří do skupiny inhibitorů cholinesteras, dále vykazuje neuroprotektivní účinky a snižuje glutamátem indukovanou excitotoxicitu. V tradiční čínské medicíně je známý a používaný již po velmi dlouhou dobu. Huperzin A se dostal do III. fáze klinického hodnocení⁵⁴.

V současné době jsou pro klinické použití dostupná pouze tři léčiva spadající do této skupiny. A to sice donepezil, galanthamin a rivastigmin. Tyto léčivé látky zpomalují průběh choroby a oddalují přechod z mírných a středních forem do těžkých stádií. Nejsou schopny AD vyléčit nebo trvale zastavit její progresi, ale zlepšují kvalitu života pacientů s touto diagnózou⁶³.

DONEPEZIL

Donepezil (Obr. 9) je velmi selektivní inhibitor acetylcholinesteras. Má dlouhý biologický poločas více než 70 hodin a díky tomu je možné jej podávat jedenkrát denně. Terapie začíná na dávkách 5 mg p.o. Při dobré toleranci se po měsíci dávky zvyšují na dvojnásobnou dávku 10 mg. Donepezil je metabolizován pomocí CYP 3A4 a CYP2D6, je tedy nutné sledovat a předcházet interakcím s inhibitory nebo induktory těchto enzymů^{63,64}.

RIVASTIGMIN

Rivastigmin (Obr. 9) je duální inhibitor. Blokuje AChE a na rozdíl od donepezilu a galanthaminu i BuChE. Dávky rivastigminu se postupně titrují, při p.o. podávání se začíná dávkou 1,5 mg dvakrát denně, postupným navyšováním se od čtvrtého měsíce užívá až 6 mg dvakrát denně. Při p.o. užívání se vyskytují nežádoucí účinky, které postihují gastrointestinální

trakt (nauzea, zvracení, nechutenství). V těchto případech je výhodná terapeutická alternativa v podobě transdermální náplasti. Rivastigmin je vhodný i pro použití u demencí doprovázených psychotickými příznaky^{63,64}.

GALANTHAMIN

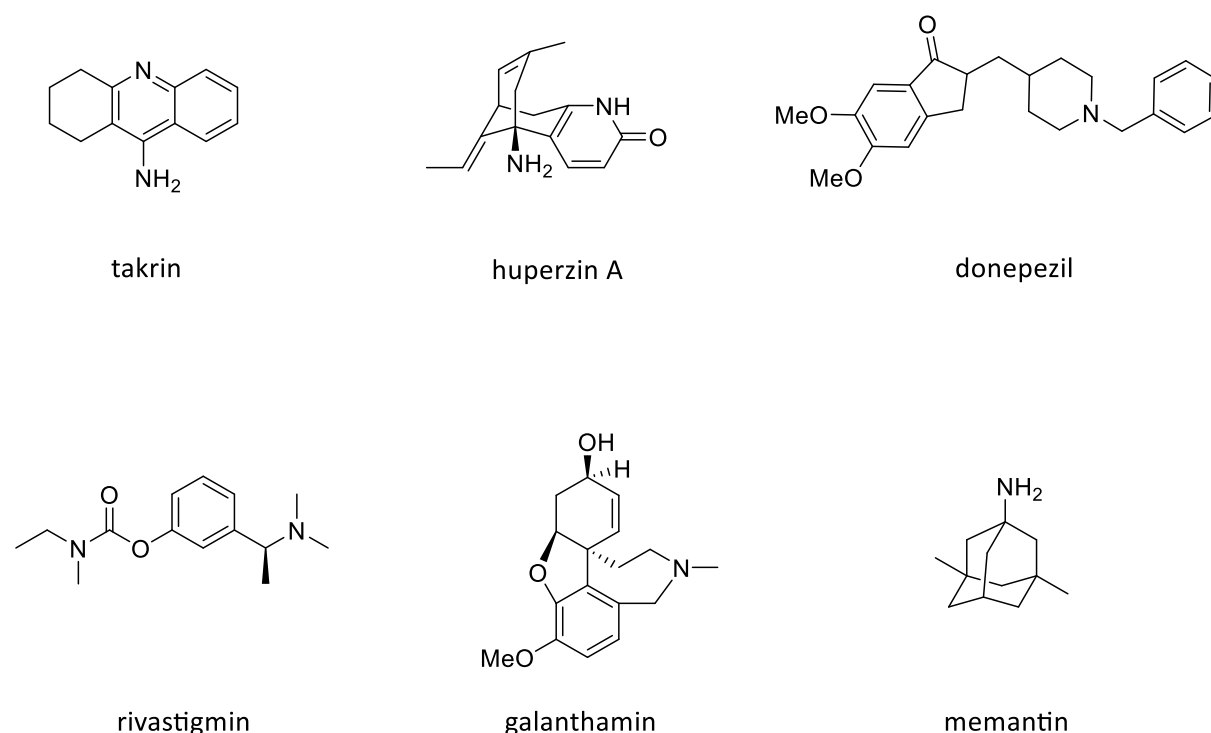
Galanthamin (Obr. 9) je selektivní, dlouhodobě působící, reversibilní inhibitor AChE. Dále také allostericky moduluje nikotinové receptory^{22,63}. Stejně jako u rivastigminu, je nutná titrace dávek. Existují formy neretardovaných i retardovaných tablet. Retardované tablety jsou výhodnější díky dávkování jedenkrát denně. U neretardovaných tablet se začíná s dávkou 4 mg dvakrát denně a postupně se navyšuje až na dávku 12 mg dvakrát denně, která je užívána od třetího měsíce léčby. Galanthamin je dobře tolerovanou substancí a má minimum nežádoucích účinků⁶³. Stejně jako u donepezilu musí být z důvodu metabolismu galanthaminu věnována zvýšená pozornost možným interakcím s induktory a inhibitory CYP 3A4 a CYP 2D6⁶⁴. Galanthamin se díky jeho schopnostem přecházet přes hematoencefalickou bariéru a ovlivňovat centrální nervový systém, stal prospektivním kandidátem nejen k léčbě AD a dalších demencí, ale i pro léčbu paralytických syndromů, schizofrenie a dalších nervových onemocnění²¹.

Inhibitory glutamátergních receptorů typu NMDA

V pokročilejších stádiích AD probíhají patologické procesy vedoucí k degeneraci glutamátergního systému, který je velmi důležitý pro správnou funkci paměti a mechanismus učení. V důsledku těchto procesů dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu a dalších excitačních aminokyselin. To se projevuje poruchami v přenosu signálů na úrovni receptorů. *N*-Metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou spojeny s otevíráním Ca²⁺ kanálů. U AD jsou tyto receptory nadměrně stimulovány, což vede k nadměrnému vstupu Ca²⁺ do neuronů. Tyto abnormální procesy směřují až k apoptóze a smrti neuronů⁶⁴.

Jedinou látkou ze skupiny slabých antagonistů NMDA receptorů, která je dostupná ke klinickému použití a používaná při terapii pokročilejších stádií AD, je memantin (Obr. 9). Memantin je indikován u středně těžkých a těžkých forem AD. Terapeutická dávka je 20 mg/den. Obecně bývá velmi dobře tolerován, vzácně se mohou objevit bolesti hlavy,

nauzea, nadměrná excitace či útlum a halucinace. Výhodné je jeho užívání v kombinaci s inhibitory acetylcholinesteras^{49,63}.



Obr. 9: Struktury takrinu, huperzinu A a léčiv používaných k terapii AD

Další léčebné alternativy

Standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloba* EGb 761 je doporučován jako adjuvantní léčba. Jeho účinnost je nižší než u memantinu a inhibitorů cholinesteras. Případně se může použít jako alternativa při jejich nesnášenlivosti⁵⁴. Další potenciálně účinná a nově vyvíjená léčiva vychází z dosud známých patofyziologických hypotéz. Jednou ze zkoumaných skupin jsou substance, které by působily proti tvorbě patologického A β a τ -proteinu. Účinnost je sledována u látek ze skupin inhibitorů β -sekretas, inhibitorů γ -sekretas a blokátorů GSK-3 β . Dále jsou zkoumány látky působící jako blokátory oligomerace solubilního A β . Velmi prospektivní se zdá být také imunoterapie vůči A β . Velká pozornost je věnována vývoji dalších léčiv ze skupin inhibitorů cholinesteras a inhibitorů monoaminoxidas. Studovány jsou i látky, které ovlivňují zánětlivé procesy, inzulinovou rezistenci nebo mitochondriální dysfunkci^{54,62}.

Jako další potenciální způsob léčby AD se jeví inhibitory prolyloligopeptidasy. Prolyloligopeptidasa (POP), známá také jako prolylendopeptidasa, je cytosolová serinová peptidasa, která štěpí peptidy s relativně malou molekulovou hmotností na karboxylovém

zbytku prolinu. Díky nejrůznějším studiím byla zjištěna spojitost mezi POP a neurodegenerativními procesy. U pacientů s AD byly zaznamenány její vyšší hodnoty. Doposud ale nebyl přesně objasněn mechanismus, kterým POP způsobuje poruchy paměti a učení. Bylo zjištěno, že inhibitory POP mohou zlepšovat kognitivní funkce, k čemuž dochází v důsledku blokace metabolismu endogenních peptidů. Objeven byl i vliv POP na štěpení APP a následnou tvorbu a akumulaci A β ^{12,65}.

3.3.2.2 Norbelladinový strukturní typ

Jak bylo popsáno výše, v rámci fytochemické studie druhu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, byly identifikovány i tři nové alkaloidy norbelladinového typu karltonin A, karltonin B a karltonin C. Ty byly podrobeny *in vitro* studiím, během kterých byl testován jejich potenciál působit inhibičně vůči lidské AChE, BuChE a POP. Aktivita vůči lidským cholinesterasám byla měřena spektrofotometrickou metodou podle George L. Ellmana a také její modifikovanou verzí. Jako standard byl použit galanthamin a fysostigmin. Karltonin A byl jako jediný z nově objevených alkaloidů izolován ve větším množství. Díky tomu mohla být testována i jeho inhibiční aktivita vůči POP. Z výsledku studie vyplývá značná selektivita a inhibiční aktivita karltoninu A a karltoninu B vůči BuChE. U karltoninu A byly zjištěné hodnoty inhibice POP ve stejném rozsahu jako u standardu berberinu. Hodnoty IC₅₀ jsou shrnuty v Tab. 4⁶.

Tab. 4: Inhibiční aktivity alkaloidů norbelladinového typu vůči AChE, BuChE a POP⁶.

Alkaloid	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)
Karltonin A	>100	0,91 ± 0,02	143 ± 12
Karltonin B	>100	0,031 ± 0,001	-
Karltonin C	>100	14,8 ± 1,1	-
Galanthamin	1,72 ± 0,12	42 ± 1	-
Fysostigmin	0,063 ± 0,005	0,13 ± 0,01	-
Berberin	0,72 ± 0,11	31 ± 4	142 ± 21

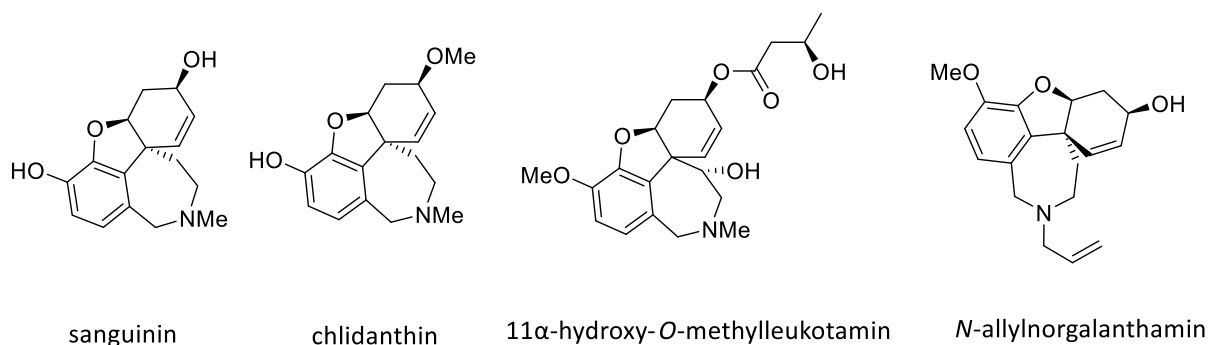
3.3.2.3 Galanthaminový strukturní typ

Nejnámějším zástupcem je galanthamin, který je důležitým léčivem používaným v léčbě AD. Díky tomu je věnována velká pozornost i dalším AmA alkaloidů tohoto typu a zjišťování jejich inhibičních aktivit vůči cholinesterasám⁶⁶.

Galanthamin byl poprvé objeven a izolován z *Galanthus woronowii* roku 1952. Hlavním zdrojem pro jeho získávání nadále zůstává rostlinný materiál, a to i přesto, že chemická syntéza galanthaminu je již známá. Ve střední a západní Evropě jsou zdrojem kultivary rodu *Narcissus*, ve východní Evropě je to *Leucojum aestivum*, v Číně je získáván z *Lycoris radiata*²².

Dalším zajímavým alkaloidem galanthaminového typu je sanguinin (9-*O*-demethylgalanthamin) (Obr. 10), který vykazoval v *in vitro* studiích 10krát vyšší aktivitu než galanthamin (Tab. 5). Ze studií vztahu mezi strukturou a aktivitou vyplývá, že tato silná inhibiční aktivita je způsobena přítomností volné hydroxylové skupiny. Předpokládá se, že se sanguinin váže na vazebná místa AChE pomocí vodíkových vazeb, které jsou tvořeny mimo jiné i právě těmito hydroxylovými skupinami⁶⁶. Bohužel, jejich přítomnost zvyšuje hydrofilitu molekuly, která znesnadňuje přechod sanguininu přes hematoencefalickou bariéru⁶⁷. Inhibiční účinek podobný galanthaminu byl sledován i u alkaloidu 11-hydroxygalanthaminu (Tab. 5)⁶⁶.

Dalším alkaloidem, u kterého byla popsána aktivita vůči AChE, je chlidanthin (Obr. 10), který byl izolován z rostliny *Chlidanthus fragrans*⁶⁸. Zajímavou látkou je i alkaloid 11 α -hydroxy-*O*-methylleukotamin (Obr. 10), který byl poprvé izolován z rostliny *Panocratium illyricum* L. V *in vitro* testech byla naměřena zajímavá inhibiční aktivita vůči AChE (Tab. 5)⁶⁹. Z *Leucojum aestivum* byly izolované *N*-alkylované alkaloidy galanthaminového typu *N*-allylnorgalanthamin (Obr. 10) a *N*-(14-metylallyl)norgalanthamin. Ze studia jejich inhibičního působení vyplývá, že jejich inhibiční aktivita vůči AChE, je vyšší než u galanthaminu (Tab. 5). To je přisuzováno substituci *N*-metylové skupiny galanthaminu allylovou nebo metylallylovou skupinou⁶⁷.



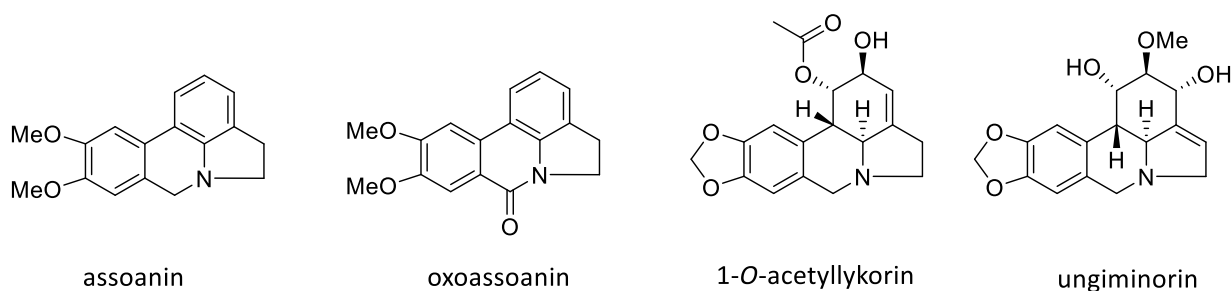
Obr. 10: Struktury vybraných AmA galanthaminového typu

Tab. 5: Inhibiční aktivity vybraných AmA galanthaminového typu vůči AChE.

Alkaloid	AChE IC ₅₀ (μM)
Sanguinin ⁶⁶	0,10 ± 0,01
Galanthamin ⁶⁶	1,07 ± 0,18
11-Hydroxygalanthamin ⁶⁶	1,61 ± 0,21
Chlidanthin ⁷⁰	23,50 ± 0,65
11α-hydroxy- <i>O</i> -methylleukotamin ⁶⁹	3,50 ± 1,10
<i>N</i> -allylnorgalanthamin ⁶⁷	0,18 ± 0,01
<i>N</i> -(14-metylallyl)norgalanthamin ⁶⁷	0,16 ± 0,01

3.3.2.4 Lykorinový strukturální typ

Lykorinový strukturální typ patří k dalšímu typu AmA, které vykazují zajímavou inhibiční aktivitu vůči AChE. Velmi aktivními alkaloidy jsou assoanin a oxoassoanin (Obr. 11), které byly izolované z *Narcissus assoanus*. V porovnání s ostatními alkaloidy lykorinového typu je jejich inhibiční aktivita výrazně vyšší (Tab. 6). To je spojováno s přítomností aromatického kruhu C, který zajišťuje planární uspořádání molekuly⁶⁶. Dalším sledováním vztahu mezi strukturou a inhibičním účinkem alkaloidů lykorinového typu bylo zjištěno, že pro správnou vazbu na enzym a následnou inhibiční aktivitu je důležitá přítomnost acetoxy a hydroxy skupin v polohách C1 a C2. Tyto strukturální vlastnosti se nachází u alkaloidu 1-*O*-acetyllykorinu (Obr. 11)⁷¹, který má výraznou inhibiční aktivitu IC₅₀ = 0,96 ± 0,04 μM⁷². U alkaloidu unginorinu (Obr. 11) byla pozorována až 10krát vyšší aktivita vůči AChE než u galanthaminu⁷³.



Obr. 11: Struktura vybraných AmA lykorinového typu

Tab. 6: Inhibiční aktivity vybraných AmA lykorinového strukturního typu vůči AChE.

Alkaloid	AChE IC ₅₀ (μM)
Assoanin ⁶⁶	3,87 ± 0,24
Oxoassoanin ⁶⁶	47,21 ± 1,13
1-O-Acetyllykorin ⁷²	0,96 ± 0,04
Ungiminorin ⁷³	0,35

Heterodimerní alkaloidy nově zavedeného narcikachninového strukturního typu vykazují zajímavé inhibiční aktivity vůči lidským cholinesterasám. Z cibulí rostlin *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton byl izolován alkaloid narciabduliin (Obr. 12), který se liší od ostatních doposud izolovaných alkaloidů tohoto strukturního typu schopností vyváženě inhibovat jak AChE, tak i BuChE a to v podobných koncentracích (Tab. 7)³⁰. Narciabduliin je svojí strukturou podobný druhému nově získanému alkaloidu narcieliinu (Obr. 12), liší se pouze v substituci benzenového jádra³⁰. Narciabduliin má na benzenovém jádře navázanou hydroxy a metoxy skupinu, zatímco benzenové jádro narcieliinu je substituováno třemi metoxy skupinami. Tento strukturní rozdíl je zodpovědný za zvýšenou inhibiční aktivitu Narciabduliinu vůči AChE³⁰. Alkaloid narcieliin, který byl izolován z cibulí rostliny *Zephyranthes citrina*, vykazuje velmi zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám i vůči POP (Tab. 7). V *in vitro* testech byla potvrzena schopnost narcieliinu přecházet přes hematoencefalickou bariéru pasivní difuzí⁷⁴.

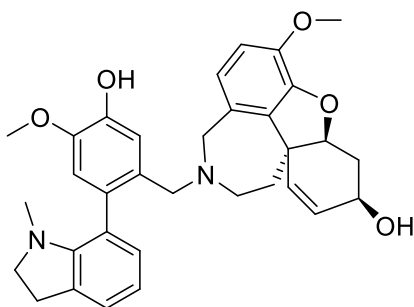
Další heterodimerní alkaloidy byly uvedené již v kapitole 3.3.2. Z rostliny *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol byly izolovány alkaloidy narcipavlin a narcikachnin. U alkaloidu narcipavlinu byla naměřena významná aktivita vůči BuChE (Tab. 7). Druhý z alkaloidů, narcikachnin, který se od narcipavlinu liší pouze v nepřítomnosti dvojné vazby mezi

C'13 a C'14, byl izolován v malém množství a z toho důvodu nemohl být podroben testům. Ovšem pokud by testy mohly být provedeny, jejich výsledky by pomohly zjistit, jak velký význam má přítomnost dvojně vazby na míru inhibičních aktivit²⁸. Alkaloid narcimatulin izolovaný z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master vykazoval velmi důležité inhibiční koncentrace nejen vůči BuChE, ale i vůči POP a GSK-3β (Tab. 7)¹⁷. Na rozdíl od narciabduliinu, inhibují alkaloidy narcipavlin a narcimatulin AChE jen slabě³⁰.

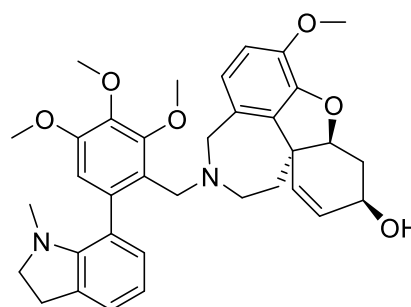
Tab. 7: Inhibiční aktivity vybraných heterodimerních alkaloidů.

Alkaloid	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)	GSK-3β IC ₅₀ (μM)
Narciabduliin ³⁰	3,29 ± 0,73	3,44 ± 0,02	nm	nm
Narcieliin ⁷⁴	18,7 ± 2,3	1,34 ± 0,31	163 ± 13	nm
Narcipavlin ²⁸	208 ± 37	24,4 ± 1,2	nm	nm
Narcimatulin ¹⁷	489 ± 60	5,9 ± 0,23	29,2 ± 0,9	20,7 ± 2,4

nm – nebylo měřeno



narciabduliin



narcieliin

Obr. 12: Strukturní vzorce nově izolovaných alkaloidů narcikachninového typu

3.3.3 Antivirová aktivita

Alkaloidy lykorin, homolykorin, trisphaeridin (Obr.12) a haemanthamin, které byly získané z *Leucojum vernum*, vykazovaly v *in vitro* studiích vysokou antiretrovirovou aktivitu v rozmezí IC₅₀= 0,4-7,3 μg/ml, která byla doprovázena nízkým terapeutickým indexem (TI₅₀ = 1,3-1,9). Tato aktivita proti HIV-1 byla testována na MT4 buněčné linii lidských T buněk. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8⁷⁵.

Tab. 8: Cytotoxické a antivirové účinky AmA^{a 75}.

Alkaloidy	TC ₅₀ (μg/ml) ^b	ID ₅₀ (μg/ml) ^c	ID ₅₀ (μg/ml) ^d	TI ₅₀ ^e
Lykorin	0,75	0,4	0,4	1,9
Homolykorin	12,8	7,3	-	1,8
Trisphaeridin	7,50	5,0	5,0	1,5
Haemanthamin	1,0	0,8	-	1,3

^a Všechny hodnoty jsou průměry výsledků pěti nezávislých experimentů; ^b Hodnoty TC₅₀ byly stanoveny pomocí MTT a [³H] thymidinového inkorporačního testu; ^c bylo určeno testem antigenu p24, s výjimkou homolykorinu, kde byl použit MTT test; ^d bylo stanoveno RT testem; ^e TI₅₀= ID₅₀/ TC₅₀

U alkaloidů lykorinu a haemanthaminu izolovaných z *Lycoris radiata* byla v *in vitro* studii potvrzena i schopnost inhibice replikace viru ptačí chřipky H5N1⁷⁶. Lykorin působí inhibičně vůči flavivirům, bunyavirům, viru hepatitidy C a enterovirům^{21,77}. Lykorin byl považován za perspektivní látku využitelnou v léčbě SARS-CoV. Problémem je jeho toxicita, toxické plazmatické koncentrace sledované u psů se pohybovaly v hodnotách 1 mg/kg⁷⁸. Derivát lykorinu, 1-*O*-acetyllykorin má schopnost potlačit proliferaci několika kmenů EV71 (Enterovirus 71), což bylo potvrzeno u různých buněčných linií⁷⁷.

Lykorin má potenciál se v budoucnu stát jednou z možností terapie infekcí způsobených virem Zika. Tento virus představuje vážné zdravotní problémy v tropických a subtropických oblastech a dosud nebyla objevena vhodná substance pro léčbu tohoto onemocnění. U lykorinu byla v *in vitro* experimentech potvrzena aktivita a selektivita jeho působení vůči viru Zika. V následně prováděných *in vivo* experimentech zvyšoval přežití myši a prokázal tak schopnost snižovat koncentrace viru v krvi⁷⁹. Lykorin působí inhibičně i na Herpes Simplex virus typu I a proti polioviru. Přesný mechanismus účinku antivirového působení lykorinu není doposud zcela jasně objasněn⁸⁰. Inhibice Herpes Simplex viru typu 1 byla potvrzena i u dalšího alkaloidu, pretazettinu. Pretazettin dále společně s narciklasinem působí inhibičně i proti flavivirům a bunyavirům⁴⁷.

3.3.4 Antimalarická a další antiprotozoální aktivity

Malárie je protozoární onemocnění, které je endemické v tropických oblastech. Jen na území tropické Afriky se incidence pohybuje kolem 200 milionů případů ročně a neustále se zvyšuje. V Evropě se můžeme setkat s malárií importovanou⁸¹.

Za přenos a šíření malárie je zodpovědný prvok *Plasmodium* a vektor choroby, kterým je samička komára rodu *Anopheles*. Pro člověka jsou patogenní *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*. Životní cyklus *Plasmodia* můžeme rozdělit na dvě části. První fáze (sexuální) probíhá ve střevě samičky komára, která při sání uvolňuje ze svých slinných žláz infekční formy parazitů (sporozoity) do krve člověka. Tím začíná druhá část životního cyklu, část asexuální. Sporozoity napadají buňky jaterního parenchymu. V hepatocytech se dělí a vyvíjejí v mnohojaderné schizonty. Následně se schizonty dělí na tisíce merozoitů, což vede k ruptuře hepatocytu a uvolnění merozoitů do krve, kde okamžitě napadají erythrocyty. Některé merozoity se v erythrocytech diferencují na gametocyty a po opětovném přisátí komára dochází k reiniciaci reprodukčního cyklu⁸¹.

Nejnebezpečnějším typem je *P. falciparum*, který způsobuje nejzávažnější tropickou malárii, takzvanou maligní terciánu. Nejčastějším typem je malárie způsobená *P. vivax*. Mezi příznaky patří periodické akutní záchvaty, které se projevují atakami horečky s třesavkou, doprovázenou pocením. Tyto opakující se ataky jsou způsobovány periodickým vyplavováním merozoitů a pyrogenů. Dále se objevují hepatosplenomegalie, abdominální bolesti a anémie⁸¹.

Z důvodu snižování účinnosti antimalarik a se zvyšující se rezistencí komárů na insekticidy, je kladen velký důraz na výzkum a vývoj nových léčiv pro tuto indikaci^{81,82}.

Jedna ze studií se zabývala zkoumáním antimalarické aktivity u AmA, konkrétně u lykorinového, krininového, tazettinového a galanthaminového typu. Dále byla zjišťována aktivita u ethanolických extraktů z cibulí *Pancratium maritimum*, *Leucojum aestivum* a *Narcissus tazetta* ssp. *tazetta*. *In vitro* byl sledován inhibiční potenciál těchto sloučenin vůči dvěma kmenům *P. falciparum*, chlorochin-senzitivnímu (T9.96) a chlorochin-rezistentnímu (K₁) kmenu. Nejvyšší potenciál působit proti *P. falciparum* byl sledován u haemanthaminu, 6-hydroxyhaemanthaminu (Obr. 13) a lykorinu. Alkaloidy galanthamin a tazettin byly nejméně účinné. Přehled získaných hodnot IC₅₀ testovaných alkaloidů je shrnut v následující Tab. 9⁸².

Vztah mezi strukturou a antimalarickým působením byl podrobněji popsán v jedné z *in vitro* studií, která sledovala aktivitu proti chlorochin-senzitivnímu kmenu *P. falciparum* u 31 derivátů odvozených od haemanthaminu, haemanthidinu a 11-hydroxyvittatinu (Obr. 13). Z výsledků vyplývá, že pro dobrou aktivitu derivátů haemanthaminu je důležitá přítomnost metoxy skupiny na C3 a volné hydroxylové skupiny na C11. Dalším důležitým prvkem je dvojná vazba mezi C1 a C2 v kruhu D⁸³.

Tab. 9: Hodnoty IC₅₀ testovaných alkaloidů a standardů chlorochinu a meflochinu proti T9.96 a K₁ kmenům *P.falciparum*⁸².

Testované látky	IC ₅₀ (μg/ml)	
	<i>P.falciparum</i> (T9.96)	<i>P.falciparum</i> (K ₁)
Lykorin	1,026	0,379
Krinin	2,110	1,650
Haemanthamin	0,703	0,433
6-Hydroxyhaemanthamin	0,348	0,352
3-Epihydroxybulbispermin	1,139	0,553
Galanthamin	4,38	15,93
Tazettin	5,420	5,080
Meflochin	-	3,94
Chlorochin	-	6,06

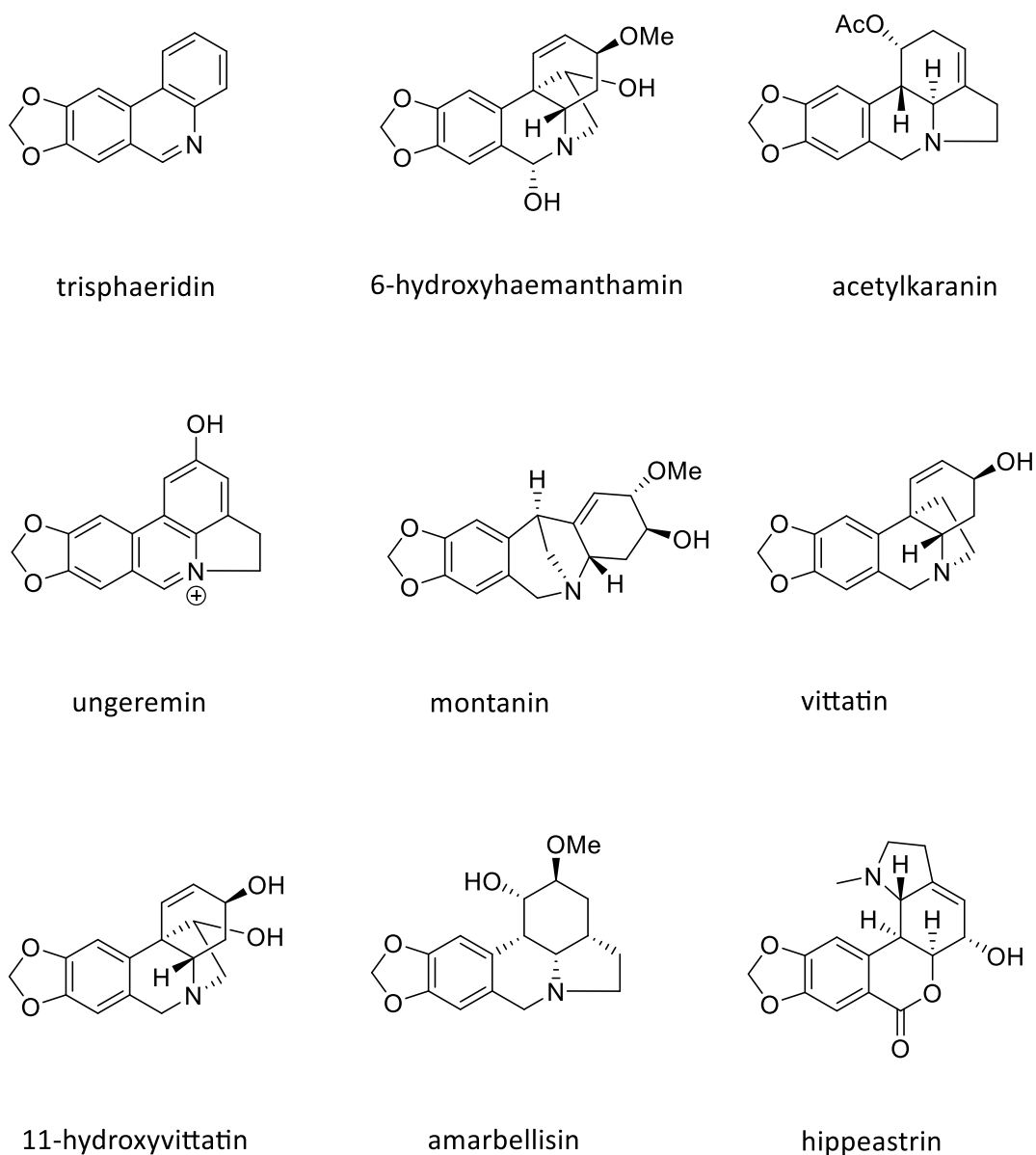
Alkaloid lykorinového typu, acetylkaranin (Obr. 13), který byl izolován z cibulí *Amaryllis belladonna* Steud., vykazoval silnou aktivitu proti chlorochin rezistentním kmenu Dd2. Hodnota IC₅₀ činila $3,3 \pm 0,3 \mu\text{M}^{84}$.

Alkaloid ungeremin, který byl izolován z cibulí rostliny *Phaedranassa dubia*, je aktivní proti *P. falciparum* a dobrou aktivitu vykazuje i proti prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense* a proti *T. cruzi*. Dalším alkaloidem s aktivitou vůči *T. brucei rhodesiense* je haemanthamin⁸⁵. Antiprotozoální aktivita byla sledována i u alkaloidů izolovaných z *Galanthus trojanus*. Konkrétně alkaloidy arolykoricidin, haemanthamin a dihydrolykorin byly nejvíce aktivní proti *T. brucei rhodesiense*.⁸⁶

3.3.5 Další biologická aktivita

Alkaloid montanin (Obr. 13), který byl izolován z *Rhodophiala bifida*, má dle doposud provedených studií potenciál stát se novým farmakologickým přístupem léčby autoimunitních onemocnění, konkrétně artritidy. Mohl by se tak zařadit mezi DMARD's (Disease-modifying antirheumatic drugs). Montanin *in vitro* studiích působil silně inhibičně na proliferaci lymfocytů a inhiboval i invazivnost fibroblastoidních synoviálních buněk⁷⁷.

Z *Hippeastrum equestre* byly izolovány pankracin (Tab. 1), vittatin, 11-hydroxyvittatin a nový alkaloid lykorinového typu amarbellisin (Obr. 13). Tyto alkaloidy působí antibakteriálně proti G⁺ *Staphylococcus aureus*. Amarbellisin i vittatin vykazují aktivitu i vůči G⁻ bakterii *Escherichia coli*. Lykorin, amarbellisin, a hippeastrin (Obr. 13) vykazují antifungální aktivitu vůči *Candida albicans*⁸⁷. Lykorin dále inhibuje růst *C. dubliniensis* a to s minimální inhibiční koncentrací 32 µg/ml. Alkaloidní extrakty získané z *Narcissus jonquilla* L. působí inhibičně vůči kvasinkám, MIC= 128 µg/ml⁷⁷.



Obr. 13: Struktury vybraných alkaloidů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a přístroje

4.1.1 Rozpouštědla a chemikálie

Aceton p.a. (Ac), (Penta a.s.)

Cyklohexan p.a. (cHx), (Penta a.s.)

Destilovaná voda (H₂O)

Diethylamin p.a. (DeA), (Penta a.s.)

Dusičnan bismutitý [Bi(NO₃)₃], (Penta a.s.)

Ethanol 95 %, denaturovaný methanolem, p.a. (EtOH), (Penta a.s.)

Chloroform p.a. (CHCl₃), (Penta a.s.)

Jodid draselný (KI), (Penta a.s.)

Kyselina vinná (C₄H₆O₆), (Penta a.s.)

Toluen p.a. (To), (Penta a.s.)

4.1.2 Pomocný materiál

Čištěná vata

4.1.3 Detekční činidla

Pro detekci alkaloidů po provedení TLC bylo používáno Dragendorffovo činidlo.

Zásobní roztok Dragendorffova činidla (podle Muniera) vznikne smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1.

Roztok A: 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého se rozpustí spolu s 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí v 40 ml vody.

Detekční roztok: 5 ml zásobního roztoku se smísí s 10 g kyseliny vinné a 50 ml destilované vody. Roztoky jsou uchovávány v lednici při teplotě 4 °C

4.1.4 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S1:	To: DeA	95:5
S2:	To: DeA	9:1
S3:	cHx: DeA	95:5
S4:	To: cHx: DeA	30:65:5
S5:	To: cHx: DeA	50:45:5
S6:	cHx: Ac: DeA	7:3:1
S7:	cHx: To: DeA	45:45:10
S8:	cHx: To: DeA	65:25:10

4.1.5 Chromatografické adsorbenty

Lité skleněné desky 15 x 15 cm, Kieselgel 60 GF 254

Komerční hliníkové TLC desky Silikagel 60 F₂₅₄, (Merck, Praha)

4.1.6 Přístroje

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent 7890 A GC 5975 (Agilent Technologies Santa Clara, Kalifornie, USA)

Polarimetr Automatic P3000, (A.Krüss Optronic, Německo)

Spektrometr Varian Inova VNMR S500, (Varian, USA)

Vakuová odparka Laborota 4000, (Heidolph, Německo)

Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA)

4.2 Všeobecné postupy

4.2.1 Příprava rozpouštědel

Všechna použitá komerční rozpouštědla byla z důvodu jejich přečištění nejdříve predestilována. Následně byla rozpouštědla řádně označena a uchovávána v hnědých skleněných lahvích chráněna před světlem.

4.2.2 Odpařování rozpouštědel

Rozpouštědla byla odpařována za pomoci vakuové rotační odparky na vodní lázni při teplotě 40 °C, za sníženého tlaku. Menší objemy byly umístěné ve skleněných ampulkách a odpařovány na vodní lázni o teplotě 60-80 °C, vysoušení bylo urychlováno proudem vzduchu.

4.2.3 Příprava litých desek pro preparativní TLC

Omyté skleněné desky o rozměru 15 × 15 byly nejdříve očištěny chloroformem. Poté byla na jejich povrch aplikována suspenze 6,5 g silikagelu a 20 ml destilované vody. Po rovnoměrném nanesení schnuly desky po dobu alespoň 24 hodin při laboratorní teplotě.

4.2.4 Tenkovrstvá chromatografie

Proces izolace alkaloidů byl prováděn za pomoci preparativní a analytické tenkovrstvé chromatografie. Byly používány desky komerční a lité. Lité desky byly použity v případě většího objemu extraktu, jelikož jejich kapacita činí přibližně 5mg/cm. Komerční desky, jejichž kapacita činí 1mg/cm, byly využity pro dělení menšího množství směsi a také pro kontrolní analytickou TLC. Vzorek byl rozpuštěn v CHCl₃:EtOH (1:1) a poté nanášen na start chromatografických desek perem nebo kapilárou, v závislosti na typu TLC. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupně. Pro vyvíjení byly použity skleněné komory, které byly předem dostatečně nasyceny příslušnou mobilní fází. Komory pro analytickou TLC byly syceny po dobu 15–20 minut a pro preparativní TLC tato doba činila 60 minut. Desky byly po vyvinutí vytaženy z příslušných komor a sušeny v digestoři. Přítomnost zón jednotlivých alkaloidů byla na chromatografických deskách potvrzena pomocí UV detekce při vlnové délce 254 nm. Poté byl proveden postřik Dragendorffovým činidlem, které reaguje s alkaloidy za vzniku oranžově zbarvených skvrn. Označené zóny byly z desek vyškrábnuty a promývány směsí CHCl₃ a EtOH přes vrstvu přečištěné vaty, aby se oddělil silikagel. Během eluce se sledovala přítomnost alkaloidů v promývaném materiálu jeho odebráním skleněnou kapilárou a detekcí Dragendorffovým činidlem. Eluce byla ukončena, když byla potvrzena nepřítomnost alkaloidu v promývaném materiálu. Po eluci alkaloidů byla směs použita pro promývání odpařena.

4.3 Izolace alkaloidů

4.3.1 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton byly zakoupené od firmy Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanickou verifikaci provedl Prof. RNDr. L. Opletal, Csc. Dokladové vzorky jsou uchované v herbáriu na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK v HK, pod označením: CUFPH-16130/AL-654.

4.3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Tato diplomová práce navazuje na práci výzkumné skupiny ADINACO. Abdullah Al Mamun, MSc. se během svého doktorského studia věnoval izolaci a strukturní identifikaci hlavních alkaloidů studované rostliny. Stručný popis přípravy a zpracování alkaloidního extraktu je stručně uveden na následujících řádcích. Podrobný popis je možné nalézt v následující referenci⁶.

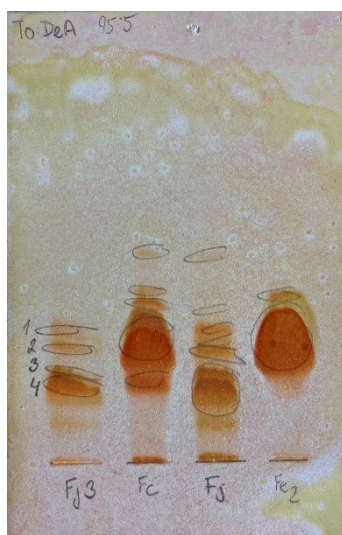
V rámci podrobné fytochemické studie bylo zpracováno 30 kg čerstvých cibulí rostliny *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Cibule byly rozemlety a třikrát extrahovány 96% ethanolem po dobu 30minutového varu pod zpětným chladičem. Ethanolové extrakty byly zfiltrány a odpařeny na vakuové odparce. Vzniklý odparek o hmotnosti 485 g byl okyselen 2% HCl a doplněn destilovanou vodou až do objemu 5000 ml. Tato suspenze (pH 1–2) byla filtrována a následně přečištěna od tuků vytřepáváním s diethyletherem (Et₂O) (3 × 1,5l). Vodný roztok byl zalkalizován na pH 9–10 pomocí 10% Na₂CO₃ a extrahován ethylacetátem (EtOAc) (3 × 1,5l). Po odpaření na vakuové odparce bylo získáno 245 g sumárního alkaloidního extraktu, který byl znovu rozpuštěn v 1000 ml 2% HCl a vytřepáván Et₂O (3 × 300 ml). Následně došlo k alkalizaci za pomoci 10% Na₂CO₃. Vodná fáze byla vytřepávána Et₂O (4 × 350 ml) a CHCl₃ (4 × 350 ml). Po pozitivní Dragendorffově reakci byly výtřepky spojeny a byl získán koncentrovaný alkaloidní extrakt hnědé barvy a sirupovité konzistence o celkové hmotnosti 187 g.

Alkaloidní extrakt byl separován pomocí gradientové sloupcové chromatografie. Jako stacionární fáze byl použit Al₂O₃ o hmotnosti 5800 g. Mobilními fázemi byly zvoleny: směs lékařského benzínu a CHCl₃ ve třech poměrech (1:1, 2:3, 1:4), každá o objemu 5000 ml; 3000 ml CHCl₃; a směs CHCl₃ a EtOH v šesti poměrech (99:1, 49:1, 97:3, 12:1, 1:1, 0:100), každá

o objemu 3000 ml. Celkem bylo odebráno 423 frakcí, které byly na základě GC-MS analýzy a stejných profilů sloučeny do finálních devíti frakcí. Jednotlivé frakce byly použity pro vlastní izolaci alkaloidů. Přehled izolovaných alkaloidů je možné nalézt v následující literatuře⁶. Vzhledem k tomu, že některé podfrakce zůstaly nezpracovány, byly použity v rámci předložené diplomové práce pro případnou izolaci nových doposud nepopsaných alkaloidů.

4.3.3 Proces izolace alkaloidů

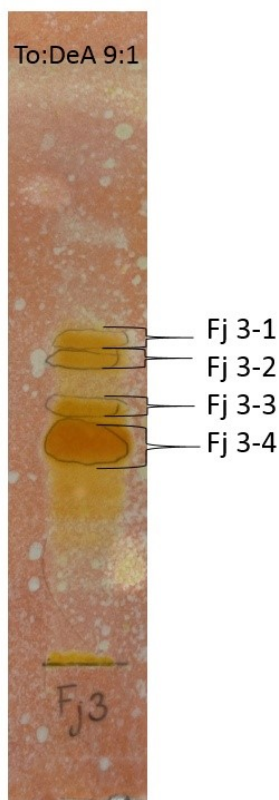
Z podfrakcí Fj 3, Fc, Fj a Fe2 byla do vialek odebrána malá množství, která byla dále rozpuštěna v CHCl₃:EtOH (1:1). Z těchto vzorků byla připravena analytická deska (Obr. 14), která byla vyvíjena v soustavě S1. Pro další zpracování a izolaci alkaloidů byla vybrána podfrakce Fj 3.



Obr. 14 TLC frakcí Fj3, Fc, Fj a Fe2

4.3.3.1 Zpracování podfrakce Fj 3

Z podfrakce Fj 3 bylo odváženo celkem 450 mg, které se dále zpracovávaly. Vzorek byl rozpuštěn v malém množství směsi CHCl₃:EtOH (1:1) a byla připravena analytická deska vyvíjená v mobilní fázi S2. Na analytické desce byly patrné 4 zóny, které byly označeny jako Fj 3-1, Fj 3-2, Fj 3-3 a Fj 3-4 (Obr. 15). Vzniklý tekutý extrakt nažloutlé barvy byl nanesen chromatografickým perem na celkem 10 litých skleněných desek. Desky byly dvakrát vyvinuty v komorách nasycených směsí S1. Po vyvinutí a následném vysušení v digestoři, byly desky podrobeny detekci pod UV lampou, kde byly viditelné 4 oddělené zóny. Na části desky byl proveden kontrolní postřik detekčním Dragendorffovým činidlem.

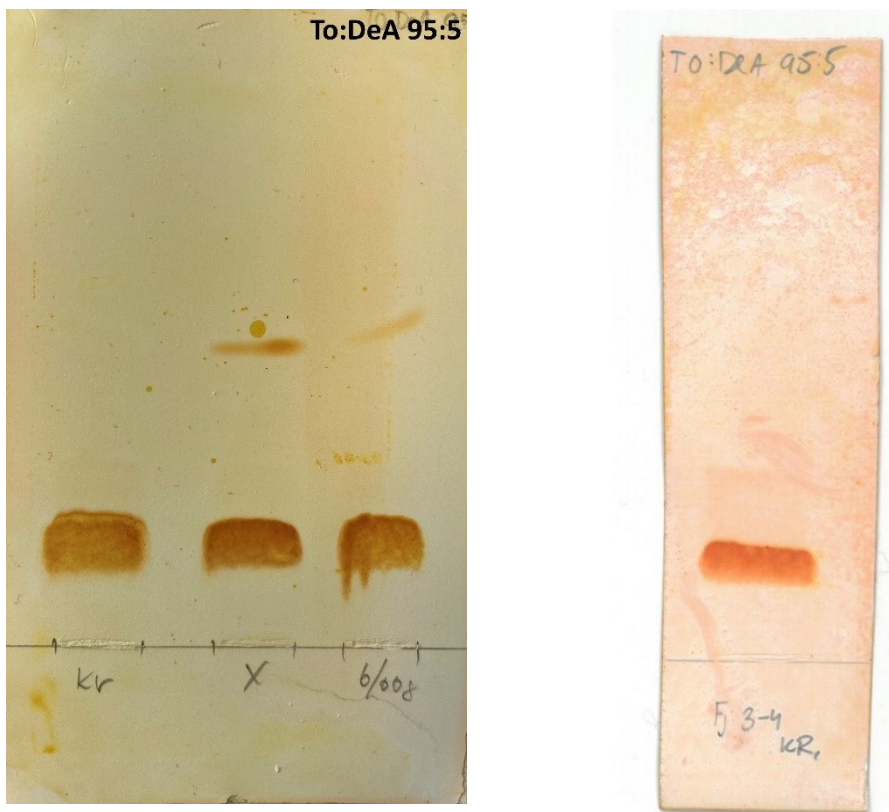


Obr. 15: TLC jednotlivých zón Fj3

Všechny označené zóny byly postupně zpracovávány tímto způsobem: každá zóna byla vyškrábnuta, nanesena na kolonu a následně přes vatou promývána směsí CHCl_3 :EtOH v poměru 1:1. Rozpouštědla z extraktu byla odpařena a získané podfrakce byly kvantitativně převedeny do vialek.

4.3.3.1.1 Zpracování Fj 3-4

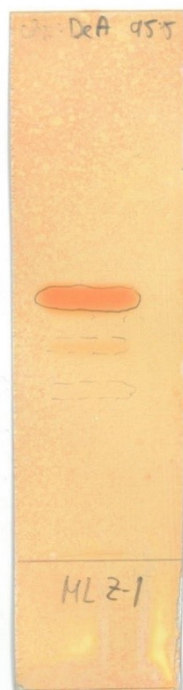
Jako první se výše popsaným postupem zpracovala zóna Fj 3-4. Po odpaření se vzorek v baňce rozpustil ve směsi CHCl_3 :EtOH (1:1) a převedl do vialky, látka byla označena jako Fj 3-4/kr. Ve vialce po chvíli začaly vznikat krystaly. Následně byl do druhé vialky odebrán matečný louh. Krystaly byly promyty malým množstvím směsi CHCl_3 :EtOH (1:1), poté byl odebrán vzorek krystalů, který byl podroben analýze GC-MS. Na základě výsledků byla provedena kontrolní TLC s krystaly lykoreninu (6/008), které byly na katedře izolovány již dříve. Podle TLC se potvrdila totožnost těchto krystalů. Krystaly lykoreninu byly převedeny do vialky a zváženy. Byly vyizolovány krystaly o hmotnosti 94 mg. Analytická TLC krystalů a standardu lykoreninu je uvedena na Obr. 16.



Obr. 16: Analytická TLC krystalů lykoreninu a standardu lykoreninu (6/008)

4.3.3.1.2 Fj 3-4 matečný louh (ML)

Matečný louh Fj 3-4 byl nanesen na šest litých desek, které byly podrobeny preparativní TLC a jedenkrát vyvíjeny ve směsi S5. Po vysušení byly desky jedenkrát vyvíjeny v soustavě S1. Vznikly dvě zóny, označené jako ML Z-1 a ML Z-2. Zóna ML Z-1 byla vyvíjena na komerční desce v soustavě S5, aby došlo k eliminaci malého množství přítomných nečistot. Tato zóna byla následně vyškrábána, promyta a odpařena. Zóna ML Z-1 ($m = 12,9$ mg) (Obr. 17) byla porovnána na TLC se zónou Fj 3-3/1 a vyvíjena v mobilní fázi S3 (Obr. 18). Byla zjištěna totožnost skvrny ML Z-1 a Fj 3-3/1 a potvrzeno, že se jedná o totožné látky. ML Z-1 byla převedena do vialky a spojena s Fj 3-3/1. Tyto spojené zóny byly rozpuštěny v $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) a pro přečištění od nečistot byly naneseny na jednu komerční desku a vyvinuty v mobilní fázi S3, po vyškrábání a promytí byla získaná látka o hmotnosti 2,9 mg.



Obr. 17: TLC ML Z-1



Obr. 18: TLC Fj 3-3/1 a ML Z-1

Ze zóny 2 matečného louhu (ML Z-2) bylo odebráno 22 mg, které byly rozpuštěny ve směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1). Roztok byl nanesen na 2 komerční desky, které byly třikrát vyvíjeny v mobilní soustavě S1. Horní zóna byla nazvaná jako ML Z-2/1. Ta byla následně vyškrábnuta, promyta a odpařena. Z ML Z-2/1 byla připravena analytická deska, která byla vyvíjena v mobilní fázi S6 (Obr. 19). Z důvodu přítomnosti více látek a malého množství tohoto vzorku ($m = 5,9$ mg) s ním nebylo dále pracováno.

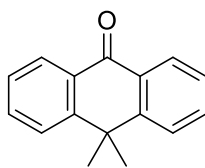


Obr. 19: TLC ML Z-2/1

4.3.3.1.3 Zpracování Fj 3-1

Vzorek o hmotnosti 15,7 mg byl rozpuštěn v malém množství $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) a přefiltrován přes čistou vatu, aby došlo k eliminaci přítomného silikagelu. Vzorek byl nanesen na jednu komerční desku, která byla jedenkrát vyvinuta v mobilní fázi S1. Výsledkem byla přítomnost pouze jedné zóny, která byla vyškrábnuta. Následovalo promytí, odpaření a byla získána látka o hmotnosti 7,5 mg. Kontrolní analytická deska byla vyvíjena v S3 (Obr. 21). Byl odebrán vzorek s označením Fj 3-1 pro GC-MS analýzu.

Tato látka byla pomocí GC-MS identifikována jako 10,10-dimethyl-9,10-dihydroantracen-9-on (Obr. 20). Vzhledem k tomu, že tato látka ve své struktuře neobsahuje žádný atom dusíku, předpokládá se, že došlo k falešně pozitivní reakci s Dragendorffovým činidlem. Stav, kdy Dragendorffovo činidlo reaguje s nealkaloidními strukturami za stejného výsledku jako se strukturami alkaloidními, byl popsán u celé řady látek. Společným znakem těchto látek je to, že vazba mezi atomem kyslíku a β uhlíkem má vysokou elektronovou hustotu. Mezi látky, které s Dragendorffovým činidlem reagují s falešně pozitivním výsledkem, patří např.: aldehydy, ketony, estery a peroxidy⁸⁸.



Obr. 20: vzorec 10,10-dimethyl-9,10-dihydroantracen-9-onu

4.3.3.1.4 Zpracování Fj 3-2

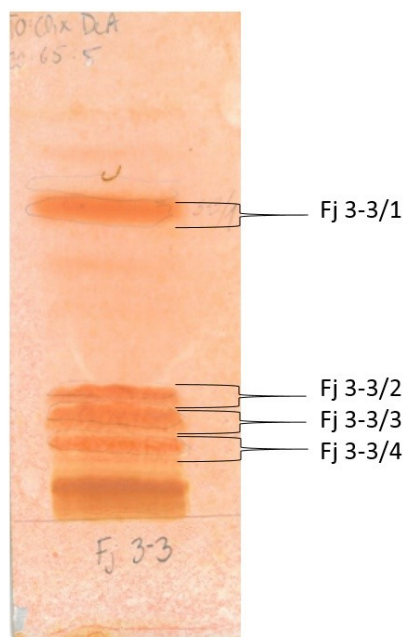
Fj 3-2 byla zpracována stejným způsobem jako Fj 3-1. Množství Fj 3-2 činilo 10,6 mg. Vzhledem k malému množství a přítomnosti 4 vzniklých zón, které byly patrné na analytické desce vyvíjené v mobilní fázi S3 (Obr. 21), nebylo s touto frakcí nadále pracováno.



Obr. 21: TLC zón Fj 3-1 a Fj 3-2

4.3.3.1.5 Zpracování Fj 3-3

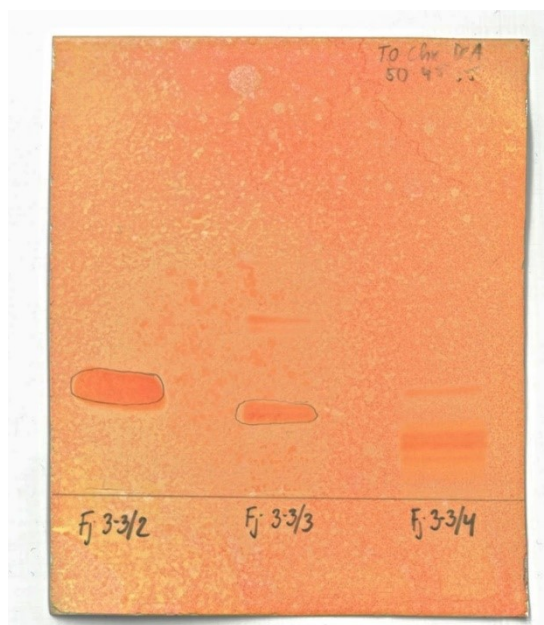
Po zpracování zóny Fj 3-3 bylo získáno 58,9 mg, které byly rozpuštěny v $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1). Následně byl tekutý extrakt nanesen na 5 komerčních desek. Desky byly vyvíjeny dvakrát v soustavě S4. Vzniklé 4 zóny byly označeny jako Fj 3-3/1 – Fj 3-3/4 (Obr. 22). Tyto zóny byly vyškrábnuty, promyty na koloně směsí $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) a odpařeny.



Obr. 22: TLC zón Fj 3-3/1 – Fj 3-3/4

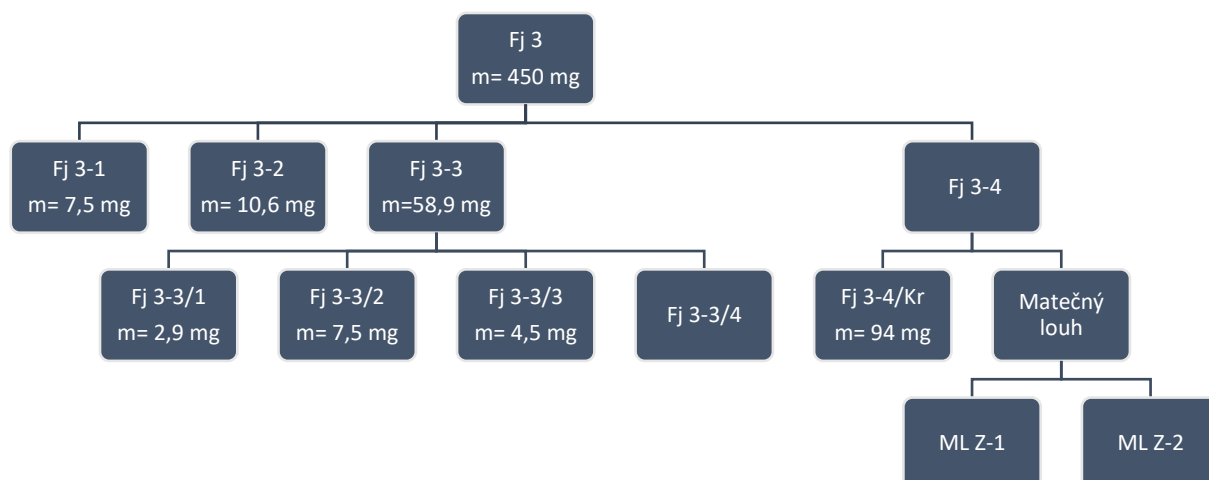
Jak již bylo zmíněno výše, Fj 3-3/1 byla porovnána pomocí analytické TLC se zónou Z1 matečného louhu podfrakce Fj 3-4 (Obr. 18). Byla zjištěna totožnost skvrn a ML Z-1 byla přidána k Fj 3-3/1. Tyto spojené zóny byly rozpuštěny v CHCl_3 a EtOH (1:1) a pro přečištění od nečistot byly naneseny na jednu komerční desku a vyvinuty v soustavě S3, po vyškrábání a promytí byla získána hmotnost 2,9 mg.

Zóny Fj 3-3/2, Fj 3-3/3 a Fj 3-3/4 byly vyškrábnuty, promyty, vysušeny a převedeny do vialek. Z jejich vzorků byla připravena analytická TLC vyvíjená v Soustavě S5 (Obr. 23). Hmotnost látky Fj 3-3/2 byla 7,5 mg a hmotnost Fj 3-3/3 činila 4,5 mg. Se zónami Fj 3-3/3 a Fj 3-3/4 nebylo dále pracováno vzhledem k minimálnímu množství a přítomnosti směsi několika látek. Zóna Fj 3-3/2 byla podrobena GC-MS analýze, která neposkytla jednoznačnou identifikaci látky, izolovaná látka byla odeslána na NMR analýzu a je v současné době v řešení. Předpokládá se, že by se mohlo jednat o novou látku, identifikace je tedy delší. V případě nové látky, bude tato struktura publikována s dalšími dodatečně izolovanými novými strukturami, které již byly izolovány.



Obr. 23: Souhrnná TLC Fj 3-3/2, Fj 3-3/3 a Fj 3-3/4

Pro lepší přehlednost procesu izolace přikládám Obr. 24 představující schéma postupu izolace a hmotnosti izolovaných látek z frakce Fj 3

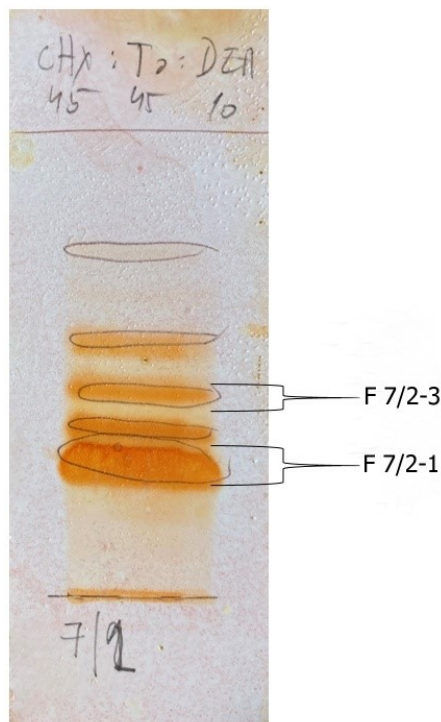


Obr. 24: Frakce Fj 3 - schéma postupu izolace a hmotnosti izolovaných látek

4.3.3.2 Zpracování matečného louhu frakce 7

Jako další byla zpracovávána část matečného louhu z frakce 7. Tato frakce byla nejdříve podrobena preparativní TLC v soustavě S7. Vznikly podfrakce F 7/1, F 7/2 a F 7/3. Pro další zpracování byla vybrána podfrakce F 7/2 (Obr. 25). Byly připraveny dvě analytické desky podfrakce F 7/2, jedna byla vyvíjena v mobilní fázi S7 a druhá v mobilní fázi S8. Vzorek o hmotnosti 180 mg byl nanesen na 12 komerčních desek, nejdříve byl čtyřikrát vyvíjen

v soustavě S8 a následně dvakrát v soustavě S7. Po vyvinutí a vysušení desek byla vyškrábnuta zóna F 7/2-1, která byla následně promyta. Získáno bylo 70 mg látky, která byla identifikována jako homolykorin. Dále byla zpracována dobře oddělená zóna F 7/2-3, jejíž hmotnost činila 30,3 mg a byla identifikována jako alkaloid hippeastrin.



Obr. 25: TLC podfrakce F 7/2

4.4 Určení struktury izolovaných alkaloidů

4.4.1 GC-MS analýza

Izolované alkaloidy byly podrobeny analýze pomocí plynového chromatografu (Agilent Technologies 7890A) spojeným s hmotnostním detektorem (Agilent Technologies 5975C). Analýza probíhala při elektronové ionizaci 70 eV. Pro separaci složek byla použita kolona HP- 5, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm. Nosným plynem bylo Helium 5.0 (Linde), jehož průtoková rychlost činila 0,8ml/min. Byl zvolen následující teplotní program: 100–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Methanolický roztok o objemu 1 μl, byl nastříknut při split módu v poměru 1:10. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Identifikace alkaloidů proběhla porovnáním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční

knihovně NIST, s daty v odborné literatuře a se spektry referenčních látek, které byly již dříve izolovány na Katedře farmaceutické botaniky FaF UK v HK.

4.4.2 LC-MS analýza

Vzorky o hmotnosti 0,2–0,3 mg byly před měřením rozpuštěny v 1ml metanolu. Pro analýzu byl použit kapalinový chromatograf spojený s hmotnostním spektrometrem Waters Autopurification™ HPLC-MS systém (Milford, USA). Měření probíhalo za laboratorní teploty. Vzorky byly separovány za pomoci kolony s reverzní fází XSelect® CSH™ Prep C18 OBD™ (100 mm × 4,6 mm i.d., 5µm) (Milford, USA). Mobilní fází byla zvolena směs vody s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a metanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1ml/min. Gradientová eluce byla naprogramována následovně (v/v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B a 1,5 min při počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Analýzy LC ESI-MS probíhaly v pozitivním iontovém režimu. Hodnoty parametrů ESI-MS byly následující: kapilární napětí: 0,8 kV, teplota sondy: 600 °C, kuželové napětí: 15 V. Hmotnostní spektra LC-MS byla zaznamenávána v rozmezí 200–800 m/z. Se zvyšující se eluční silou mobilní fáze, dochází k eluci látek v pořadí od více polárních k méně polárním.

4.4.3 NMR analýza

NMR analýza byla provedena za pomoci spektrometru VNMR S 500, který pracuje o frekvenci 499,87 MHz pro jádra ^1H a frekvencí 125,70 MHz pro jádra ^{13}C . Měření probíhala při teplotě 25 °C, jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný chloroform CDCl_3 . Pro vyjádření chemických posunů látek byly použity hodnoty δ pars per milion (ppm), které byly vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřnímu standardu. Hodnoty chemického posunu CDCl_3 byly následující: pro atomy ^1H $\delta = 7,26$ ppm a pro ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Data, která byla získaná měřením, byla uváděna ve výsledcích v tomto pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s je singlet, d je dublet, t je triplet, q je kvartet, dd je dublet dubletů, m je multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

4.4.4 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost izolovaných alkaloidů byla měřena na polarimetru P3000 za laboratorní teploty. Vzorky byly před měřením rozpuštěny v chloroformu. Specifická otáčivost byla vypočítána podle následujícího vzorce:

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

α = naměřená optická otáčivost [°]; t = teplota měření [°C]; D = D-linie sodíkového světla ($\lambda=589,3$ nm); c = koncentrace měřeného alkaloidu [$\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$]; l = délka kyvety [dm].

4.5 Testování biologické aktivity

4.5.1 Stanovení cholinesterasové inhibiční aktivity

4.5.1.1 Použité chemikálie

Acetylthiocholin jodid, (10 mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

Butyrylthiocholin jodid, (10 mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

Dimethylsulfoxid pro biologické testy $\geq 99,7\%$ p.a. (DMSO), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (5mM roztok), (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

Galanthamin hydrobromid $> 98\%$ (Changsha Organic Herb Inc., Čína)

Huperzin A 95% (TAZHONGHUI — Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Fysostigmin, (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)

4.5.1.2 Pufry

Fosfátový pufr (5 mM), pH= 7,4

Fosfátový pufr (5 mM) s obsahem NaCl (150 mM), pH= 7,4

Fosfátový pufr (100 mM), pH= 7,4

4.5.1.3 Biologický materiál

Jako zdroj AChE byl použit hemolyzát lidských erytrocytů, zdrojem BuChE byla lidská plazma.

K čerstvě odebrané krvi od zdravých dobrovolníků bylo přidáno antikoagulační činidlo citrát sodný, a to v poměru 9:1 (18 ml krve a 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Krev byla okamžitě po

odběru rozdělena do zkumavek, a to po konstantních objemech 5 ml. V dalším kroku byla centrifugací oddělena plazma, odstředění probíhalo rychlostí 4000 ot/min. po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Po odstředění byla ze zkumavek odebrána plazma, oddělená od erytrocytů, a byla uchovávána v lednici při teplotě 4 °C až do doby provedení stanovení aktivit BuChE.

K sedimentu erytrocytů bylo přidáno takové množství 5mM fosfátového pufru o pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby bylo dosaženo erytrocytární suspenze o objemu 13 ml. Následně byla výše popsaným způsobem provedena centrifugace. Erytrocytární sediment byl tímto pufrem během centrifugace třikrát promyt, aby došlo k dokonalému odstranění zbytků plazmy, BuChE a promývacího pufru. V dalším kroku bylo k erytrocytům přidáno 5 mM fosfátového pufru o pH 7,4 bez obsahu NaCl, a to v poměru erytrocyty: fosfátový pufr (9:1), tato směs byla zhomogenizována a poté přelita do Erlenmayerovy baňky. Na magnetické míchačce za neustálého míchání (300 ot/min.) byly erytrocyty ponechány spontánní hemolýze po dobu 10 min. Po ukončení procesu hemolýzy byla u suspenze stanovena její acetylcholinesterasová aktivita. Hodnota absorbance může být upravována přidáním potřebného množství 5 mM fosfátového pufru (rozmezí absorbance pro AChE = 0,08–0,15 a pro BuChE = 0,15–0,20). Získaný hemolyzát i plazma byly uchovávány při teplotě -22 °C až do doby jejich použití.

4.5.1.4 Stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Ke stanovení hodnot IC_{50} byla použita Ellmanova spektroskopická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substrát byl použit acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid. Principem této metody je hydrolýza těchto esterů cholinesterasami, kdy dojde ke vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. Thiolové funkční skupiny thiocholinu reagují spolu s DTNB za vzniku žlutého produktu.

Do jamek v mikrotitračních destičkách bylo napipetováno 8,3 μl plazmy nebo hemolyzátu, dále bylo přidáno 283 μl DNTB a 8,3 μl roztoku měřené látky v DMSO s klesající koncentrací (40 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0,4 mM a 0 mM). DMSO o objemu 8,3 μl byl použit jako porovnávací roztok. Při teplotě 37 °C probíhala po dobu 5 minut inkubace v komoře Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA). V dalším kroku bylo přidáno 33,3 μl roztoku substrátu a došlo ke vzniku žlutého produktu, jehož absorbance byla

měřena při příslušné vlnové délce (AChE hemolyzát: 436 nm; BuChE plazma: 412 nm). Procenta inhibice byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}} \right)$$

$\% I$ = procento inhibice; ΔA_{Bl} = pokles absorbance slepého vzorku během 1 min; ΔA_{Sa} = absorbance testovaného vzorku během 1 min

4.5.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči POP

Inhibiční aktivity vůči POP byly měřeny ve spolupráci s Centrem pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové. Podrobný popis metody je uveden v následujícím literárním zdroji²⁸.

4.5.3 Stanovení cytotoxické aktivity

Stanovení protinádorové aktivity izolovaných alkaloidních látek bylo realizováno ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Testování cytotoxických účinků provedl RNDr. Radim Havelek, Ph.D. Cytotoxické účinky byly sledovány na nádorových buněčných liniích Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2. Jako nádorová kontrolní linie buněk byla použita buněčná linie MRC-5. Popis použité metody a systému xCELLigence je uveden v následujícím literárním zdroji³⁸.

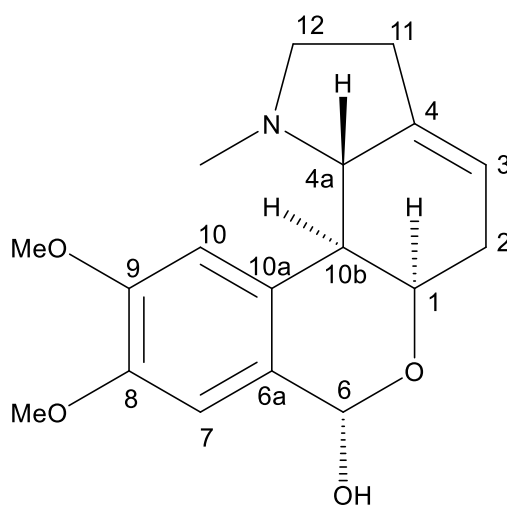
5 VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza izolovaných látek

5.1.1 Fj 3-4/kr: Lykorenin

Látka byla na základě provedených experimentů (GC-MS, NMR) a porovnáním získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu.

Sumární vzorec: $C_{18}H_{23}NO_4$



Obr. 26: Strukturní vzorec lykoreninu

5.1.1.1 GC-MS analýza

EIMS m/z (%): 317(-), 110(9), 109(100), 108(18), 94(3), 82(2)

5.1.1.2 NMR analýza

1H NMR (500 MHz, δ , $CDCl_3$, 25 °C)

6,94 (1H, s), 6,88 (1H, s), 6,04 (1H, bs), 5,49–5,44 (1H, m), 4,39–4,35 (1H, m), 3,89 (3H, s), 3,88 (3H, s), 3,17–3,10 (1H, m), 2,75–2,69 (1H, m), 2,69–2,59 (1H, m), 2,51–2,44 (3H, m), 2,37–2,29 (1H, m), 2,21 (1H, dd, $J = 17,5$ Hz, $J = 9,3$ Hz), 2,09 (3H, s).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , $CDCl_3$, 25 °C)

148,3, 148,3, 140,8, 130,5, 126,8, 115,6, 112,6, 109,8, 91,8, 67,3, 66,8, 56,9, 56,1, 55,8, 44,3, 44,2, 31,8, 28,1.

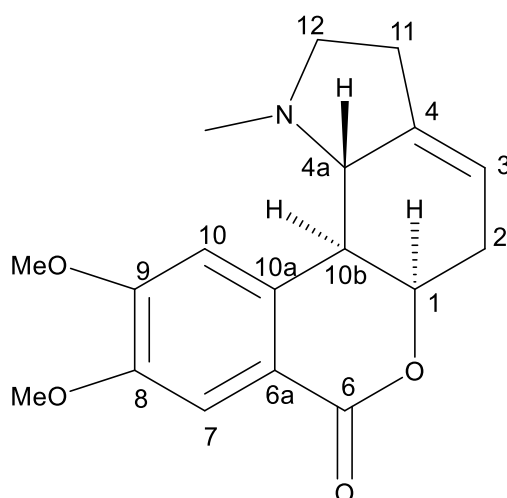
5.1.1.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = +180^\circ \text{ (} c=0,02; \text{CHCl}_3 \text{)}$$

5.1.2 F 7/2-1: Homolykorin

Látka byla na základě provedených experimentů (GC-MS, NMR) a porovnáním získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu homolykorin⁸⁹.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁NO₄



Obr. 27: Strukturní vzorec homolykorinu

5.1.2.1 GC-MS analýza

EIMS m/z (%): 206(<1), 178(2), 109(100), 150(1), 108(22), 94(3), 82(3)

5.1.2.2 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C)

7,56 (1H, s, H-7), 6,96 (1H, s, H-10), 5,50 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-3), 4,80 (1H, t, H-1), 3,95 (3H, s, OMe), 3,94 (3H, s, OMe), 2,71 (1H, m, H-4a), 2,63 (3H, m, H-2, H-10b), 2,50 (2H, m, H-11), 3,12 (1H, ddd, $J = 9,8; 3,3; 7,2$ Hz, H-12), 2,39 (2H, m, H-2), 2,23 (1H, q, $J = 9,8$ Hz, H-12), 2,00 (3H, s, NMe).

¹³C NMR (125 Hz, δ , CDCl₃, 25 °C)

165,9 (C-6), 153,1 (C-9), 148,9 (C-8), 140,9 (C-4), 137,8 (C-10a), 116,9 (C-6a), 115,2 (C-3), 111,9 (C-7), 110,8 (C-10), 77,7 (C-1), 66,6 (C-4a), 56,6 (C12), 56,4 (OMe), 56,2 (OMe), 44,2 (NMe), 43,8 (C-10b), 31,3 (C-2), 28,1 (C-11).

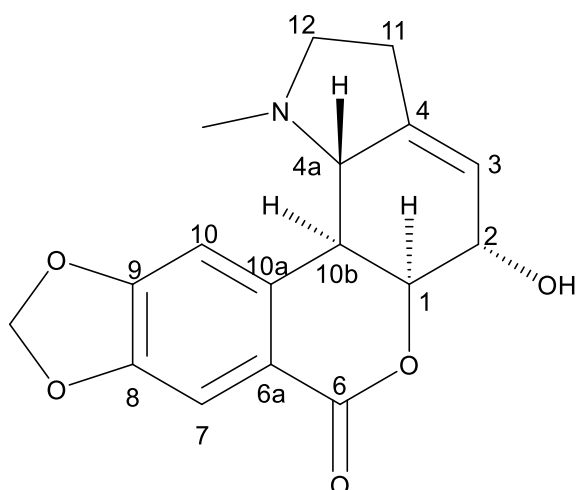
5.1.2.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = + 80^\circ (c=0,02; \text{CHCl}_3)$$

5.1.3 F 7/2-3: Hippeastrin

Látka byla na základě provedených experimentů (GC-MS, NMR) a porovnáním získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu hippeastrin⁹⁰.

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃



Obr. 28: Strukturní vzorec hippeastrinu

5.1.3.1 GC-MS analýza

EIMS m/z (%): 297(10), 279(9), 190(28), 126(84), 125(100), 124(84), 96(99)

5.1.3.2 NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C)

7,48 (1H, s, H-10), 6,98 (1H, s, H-7), 6,08 (1H, s, OCH₂O), 6,07 (2H, s, OCH₂O), 5,70 (1H, s, H-3), 4,61 (1H, s, H-1), 4,38 (1H, s, H-2), 3,25 (1H, m, H-12), 3,04 (1H, d, $J = 9,4$ Hz,

H-10b), 2,73 (1H, d, $J = 9,4$ Hz, H-4a), 2,54 (2H, m, H-11), 2,31 (1H, dd, $J = 17,2; 8,5$ Hz, H-12), 2,10 (3H, s, NMe).

^{13}C NMR (125 Hz, δ , CDCl_3 , 25 °C)

165,0 (C-6), 151,9 (C-9), 148,0 (C-8), 142,4 (C-4), 118,0 (C-6a), 138,8 (C-10a), 119,4 (C-3), 109,8 (C-7), 108,5 (C-10), 102,1 (OCH₂O), 82,2 (C-1), 67,1 (C-4a), 66,2 (C-2), 55,9 (C-12), 42,9 (NMe), 38,4 (C-10b), 27,3 (C-11).

5.1.3.3 Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{25} = + 130^\circ \text{ (c=0,3; CHCl}_3\text{)}$$

5.2 Biologická aktivita

Izolované alkaloidy byly testované na inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterasám, POP a GSK-3 β . U alkaloidů hippeastrinu a homolykorinu byla testována i jejich cytotoxická aktivita na devíti nádorových buněčných liniích. V Tab. 10 a Tab. 11 jsou uvedeny výsledky těchto studií.

Tab. 10: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β .

Látka	AChE IC ₅₀ (μM)	BuChE IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (mM)	GSK-3 β (% inhibice) ^a
Lykorenin	>500	>500	>500	48 \pm 3
Homolykorin	63,7 \pm 4,3	151 \pm 19	40,6 \pm 1,3	54 \pm 1
Hippeastrin	>1000	>1000	>1000	11 \pm 2
Galanthamin ^b	1,71 \pm 0,07	42,3 \pm 1,3	>1000	-
Huperzin A ^b	0,033 \pm 0,001	>1000	>1000	-
Berberin ^c	0,71 \pm 0,01	30,7 \pm 3,5	0,14 \pm 0,02	-
Z-Pro-prolinal ^c	-	-	3,27 \pm 0,02	-

^a testováno při koncentracích 10 μM , ^b standardy pro AChE a BuChE, ^c standardy pro POP

Tab. 11: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči buňkám nádorových linií (viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění alkaloidem při koncentraci 10 μ M).

Buněčná linie	Lykorenin	Homolykorin	Hippeastrin	Doxorubicin ^a
Jurkat	97 \pm 6	100 \pm 10	40 \pm 1	2 \pm 0
MOLT-4	95 \pm 9	100 \pm 3	50 \pm 20	0 \pm 0
A549	104 \pm 7	109 \pm 9	69 \pm 4	11 \pm 5
HT-29	89 \pm 10	106 \pm 8	66 \pm 5	47 \pm 3
PANC-1	80 \pm 2	92 \pm 1	84 \pm 5	78 \pm 3
A2780	98 \pm 0	94 \pm 5	50 \pm 10	5 \pm 1
HeLa	93 \pm 9	96 \pm 10	86 \pm 5	11 \pm 6
MCF-7	91 \pm 3	102 \pm 8	70 \pm 21	37 \pm 3
SAOS-2	95 \pm 4	103 \pm 4	83 \pm 2	17 \pm 5
MRC-5	92 \pm 6	93 \pm 4	69 \pm 10	29 \pm 3

^a referenční látka, c = 1 μ M

6 DISKUZE A ZÁVĚR

Rostliny čeledi amarylkovitých jsou pro svůj obsah AmA intenzivně studovány již mnoho let. Jako první byl roku 1877 izolován z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* alkaloid lykorin, od té doby bylo díky rozvoji izolačních a fyzikálně-chemických metod izolováno a strukturně identifikováno více než 650 AmA patřících do více než 15 strukturních typů¹². Tyto látky byly v průběhu let studovány z pohledu různých biologických aktivit a byly u nich popsány nejrůznější účinky. K těm nejvýznamnějším patří inhibiční aktivita vůči cholinesterasám, protinádorová, antivirová, antimalarická, protizánětlivá a antimikrobiální aktivita^{21,25}.

Jediným AmA schváleným pro terapeutické použití je galanthamin, který je indikován při léčbě mírných a středních forem AD. Galanthamin je z tohoto důvodu používán i jako standard při měření inhibičních aktivit alkaloidů vůči lidským cholinesterasám⁶. Nově objevený alkaloid narcikachninového typu narciabduliin má schopnost vyváženě inhibovat AChE i BuChE. Další alkaloidy narcipavlin, narcikachnin a narcieliin, které také patří k tomuto strukturnímu typu se vyznačují vysokou inhibiční aktivitou vůči BuChE a řadí se tak k potenciálním terapeutickým možnostem léčby AD^{17,28,30,74}. Významná protinádorová účinnost byla potvrzena u alkaloidů lykorinu, pankratistatinu, narciklasinu, haemanthaminu a montaninu a staly se tak předmětem dalších studií³⁵. AmA potenciálně využitelné v terapii virových onemocnění jsou alkaloidy lykorin a haemanthamin, které v *in vitro* testech vykazovaly významnou aktivitu vůči retrovirům a virům ptačí chřipky H5N1^{75,76}. Vysoký potenciál antimalarického působení byl v *in vitro* studiích sledován u haemanthaminu, a lykorinu⁸².

Předmětem této diplomové práce byla izolace alkaloidů se zaměřením na minoritní frakce, které byly získány ze sumárního alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Z přidělených frakcí, které doposud nebyly zpracovávány, byly za použití preparativní TLC izolovány tři alkaloidy Fj 3-4/kr, F 7/2-1, F 7/2-3, které byly podrobeny analýze. Dále byl izolován 10,10-dimethyl-9,10-dihydroantracen-9-on. Tato látka poskytla s Dragendorffovým činidlem falešně pozitivní reakci, jelikož se nejedná o alkaloidní strukturu. 10,10-dimethyl-9,10-dihydroantracen-9-on nebyl podroben studiu biologických aktivit. Zóna označená jako Fj 3-3/2 je v současné době v řešení. Ostatní zóny se nepodařilo izolovat

v čistém stavu a dostatečném množství pro analýzy. Dle výsledků GC-MS, NMR analýzy, určení optické otáčivosti a porovnáním s odbornou literaturou, byly izolované alkaloidy identifikovány jako hippeastrin, homolykorin a lykorenin, které patří k homolykorinovému strukturnímu typu. U těchto tří látek byla testována inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β . Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE byla porovnávána se standardy galanthaminem (IC_{50} AChE = $1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$, IC_{50} BuChE = $42,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$) a huperzinem A (IC_{50} AChE = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} BuChE > $1000 \mu\text{M}$). Jako standardy pro porovnání inhibiční aktivity vůči POP byly použity Z-Pro-prolinal (IC_{50} POP = $3,27 \pm 0,02 \text{ mM}$) a berberin (IC_{50} POP = $0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$). Inhibiční aktivita vůči GSK-3 β byla testována při koncentracích $10 \mu\text{M}$. Alkaloidy hippeastrin a homolykorin byly podrobeny screeningu cytotoxických aktivit u následujících nádorových buněčných linií: Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2. Jako kontrolní buněčná linie byla použita linie MRC-5.

Všechny z alkaloidů, které byly během experimentální části této diplomové práce získány, již byly v minulosti z rodu *Narcissus* L. izolovány a identifikovány. Přítomnost alkaloidu hippeastrinu byla doposud popsána například v zástupcích *N. tazetta* L., *N. x odorus* L. var. *rugulosus*²¹, *N. L. cv. Professor Einstein*²⁴, *N. serotinus*⁹¹ a *N. cv. Salome*⁹².

Alkaloid homolykorin byl identifikován u množství zástupců rodu *Narcissus* L. Konkrétně se jedná o rostliny *N. tazetta* L., *N. confusus* Pugsley, *N. muñozii-garmendiae* Fdez.Casas, *N. tortifolius* Fdez.Casas, *N. poeticus* L.⁹³, *N. poeticus* L., *N. poeticus* L. var. *ornatus* Hort., *N. vasconicus* Fdez.Casas, *N. bujei* Fdez. Casas, *N. eugeniae* Fdez. Casas, *N. pallidiflorus* Pugsley, *N. tazetta* L. var. *chinensis* Roem²¹, *N. L. cv. Professor Einstein*²⁴, *N. pseudonarcissus* cv. Carlton⁶.

Lykorenin byl izolován z rostlin *N. tazetta* L.⁹³, *N. muñozii-garmendiae* Fdez.Casas⁹⁴, *N. poeticus* L., *N. poeticus* L. var. *ornatus* Hort., *N. muñozii-garmendiae* Fdez.Casas, *N. bujei* Fdez. Casas, *N. eugeniae* Fdez. Casas, *N. tazetta* L. var. *chinensis* Roem²¹, *N. pseudonarcissus* cv. Carlton⁶.

Z výsledků testů inhibičních aktivit těchto alkaloidů vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β vyplývá, že nejvíce aktivní z izolovaných látek je homolykorin. Inhibiční aktivita homolykorinu vůči AChE (IC_{50} = $63,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$), BuChE (IC_{50} = $151 \pm 19 \mu\text{M}$) a POP ($40,6 \pm 1,3 \text{ mM}$) je ale v porovnání se standardy nízká. Inhibiční aktivita vůči GSK-3 β je mírná u alkaloidu homolykorinu (% inhibice = 54 ± 1) a lykoreninu (% inhibice = 48 ± 3). U hippeastrinu je tato

inhibiční aktivita vůči GSK-3 β (% inhibice = 11 ± 2) výrazně redukována, což bývá přisuzováno přítomnosti hydroxylové skupiny na C2⁹⁵. Aktivita alkaloidů hippeastrinu a lykoreninu vůči AChE (hippeastrin IC₅₀ >1000, lykorenin IC₅₀ >500), BuChE (hippeastrin IC₅₀ >1000, lykorenin IC₅₀ >500) a POP (hippeastrin IC₅₀ >1000, lykorenin IC₅₀ >500) je nevýznamná.

Během screeningu cytotoxického působení izolovaných alkaloidů nebyla pozorována významná protinádorová aktivita těchto látek.

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že izolované alkaloidy lykorenin, homolykorin a hippeastrin nevykazují biologické aktivity v takové míře, které by indikovaly jejich potenciální využití v terapii AD nebo nádorových onemocnění. Mohou představovat zajímavý zdroj pro přípravu semisyntetických derivátů, a to především z toho důvodu, že se jedná o alkaloidy, které se v čeledi Amaryllidaceae vyskytují ve vyšších koncentracích.

7 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky

Řešitel: Hana Šimková

Školitel: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Alkaloidy rodu *Narcissus*: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita

Klíčová slova: *Narcissus*, alkaloidy, biologická aktivita, Alzheimerova choroba, cytotoxická aktivita

Předmětem této diplomové práce byla izolace alkaloidů se zaměřením na minoritní frakce, které byly získány ze sumárního alkaloidního extraktu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Pro účel izolace byla použita metoda preparativní TLC, pomocí které byly z přidělených frakcí izolovány tři látky alkaloidní povahy Fj 3-4/kr, F 7/2-1, F 7/2-3. Tyto látky byly za použití GC-MS, NMR analýzy, optické otáčivosti a následného porovnání s daty v odborné literatuře identifikovány jako alkaloidy homolykorinového typu lykorenin, homolykorin a hippeastrin.

U těchto tří alkaloidů byla testována inhibiční aktivita vůči AChE, BuChE, POP a GSK-3 β . Jejich inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE byly porovnávány se standardy galanthaminem (IC_{50} AChE = $1,71 \pm 0,07 \mu M$, IC_{50} BuChE = $42,3 \pm 1,3 \mu M$) a huperzinem A (IC_{50} AChE = $0,033 \pm 0,001 \mu M$, IC_{50} BuChE > $1000 \mu M$). Jako standardy pro porovnání inhibiční aktivity vůči POP byly použity Z-Pro-prolinal (IC_{50} POP = $3,27 \pm 0,02$ mM) a berberin (IC_{50} POP = $0,14 \pm 0,02$ mM). Nejvíce aktivním z izolovaných alkaloidů byl homolykorin s inhibičními aktivitami vůči AChE (IC_{50} = $63,7 \pm 4,3 \mu M$), BuChE (IC_{50} = $151 \pm 19 \mu M$) a POP ($40,6 \pm 1,3$ mM). Mírná inhibiční aktivita vůči GSK-3 β byla zaznamenána u alkaloidu homolykorinu (% inhibice = 54 ± 1) a lykoreninu (% inhibice = 48 ± 3).

U izolovaných alkaloidů byla testována jejich cytotoxická aktivita u devíti nádorových buněčných linií Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2. Na základě výsledků studií jejich protinádorových aktivit, nebyla zaznamenána u těchto látek významná cytotoxická aktivita.

8 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany

Author: Hana Šimková

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

Title of diploma thesis: Alkaloids of genus *Narcissus*: isolation, structural identification, biological activity

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

The aim of the diploma thesis was an isolation of alkaloids with a focus on minor fractions. These fractions were obtained from the summary alkaloid extract of *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. The method of preparative TLC was used for the isolation of alkaloids. Three substances of alkaloid origin marked as Fj 3-4/kr, F 7/2-1, F 7/2-3 were isolated from the assigned fractions. These substances were identified as alkaloids of homolycorine type lycorenine, homolycorine and hippeastrine by using GC-MS, NMR and optical rotation. The results were also compared with data in the literature.

These three alkaloids were tested for their inhibitory activity against AChE, BuChE, POP and GSK-3 β . The inhibitory activity against AChE and BuChE was compared with the reference substances galanthamine (IC_{50} AChE = $1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$, IC_{50} BuChE = $42,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$) and huperzine A (IC_{50} AChE = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, IC_{50} BuChE > $1000 \mu\text{M}$). The inhibitory activity against POP was compared to Z-Pro-prolinal (IC_{50} POP = $3,27 \pm 0,02 \text{ mM}$) and berberine (IC_{50} POP = $0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$). The most active one of the isolated alkaloids was homolycorine. Inhibitory activity of homolycorine against AChE (IC_{50} = $63,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$), BuChE (IC_{50} = $151 \pm 19 \mu\text{M}$) and POP ($40,6 \pm 1,3 \text{ mM}$). Moderate inhibitory activity against GSK-3 β was observed in alkaloids homolycorine (% inhibition = 54 ± 1) and lycorenine (% inhibition = 48 ± 3).

Isolated alkaloids were tested for their cytotoxic activity using nine cancer cell lines including Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2. The results did not indicate any significant cytotoxic activity.

9 LITERATURA

1. Cragg, G. M., Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670–3695, (2013).
2. Tomko, J., Kresánek, J., Hubík, J., Suchý, V., Felklová, M., Sikyta, B., Libický, A. *Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. Osveta, Martin (1999).
3. Petrovska, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* 6, 1–5, (2012).
4. Moreno, R., Tallini, L.R., Salazar, C., Osorio, E.H., Montero, E., Bastida, J., Oleas, N.H., Acosta León, K. Chemical Profiling and Cholinesterase Inhibitory Activity of Five *Phaedranassa* Herb. (Amaryllidaceae) Species from Ecuador. *Molecules* 25, 2092, (2020).
5. Spilková, J., Martin, J., Siatka, T., Tůmová, L., Kašparová, M. *Farmakognozie*, Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha (2016).
6. 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* 10, 1–17, (2020).
7. Non communicable diseases. World Health Organisation. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (staženo 14.7.2021).
8. Alberti, G. Noncommunicable diseases: tomorrow's pandemics. *Bulletin of the World Health Organisation* 79, 907–907, (2001).
9. Jiráček R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi* 9, 240–244, (2008).
10. Jahodář, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha 2006.
11. Opletal, L. Daidalea. <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSystematic.asp> (staženo 18.6.2021).
12. Ka, S., Koirala, M., Mérindol, N., Desgagné-Penix, I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 25, 4901, (2020).
13. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L., Cahlíková, L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* 107, 701–708, (2013).
14. Herbář Wendys - *Galanthus nivalis* - sněžěnka podsněžník. <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/287-galanthus-nivalis-snezenka-podsneznik> (staženo 30.6.2021).

15. Herbář Wendys - *Narcissus pseudonarcissus* - narcis žlutý.
<https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/307-narcissus-pseudonarcissus-narcis-zluty> (staženo 30.6.2021).
16. Herbář Wendys - *Leucojum vernum* - bledule jarní.
<https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/10-leucojum-vernum-bledule-jarni> (staženo 30.6.2021).
17. Hulcová, D., Maříková, J., Korábečný, J., Hošťálková, A., Jun, D., Kuneš, J., Chlebek, J., Opletal, L., De Simone, A., Nováková, L., Andrisano, V. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* 165, 112055, (2019).
18. Berkov, S., Martínez-Francés, V., Bastida, J., Codina, C., Ríos, S. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry* 99, 95–106, (2014).
19. Classification System. The Daffodil Society. <https://thedaffodilsociety.com/a-guide-to-dafodils/classification-system/> (staženo 15.7.2021).
20. *Narcissus* 'Carlton' - Plant Finder.
<https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=251044&isprofile=0&> (staženo 17.6.2021).
21. Bastida, J., Lavilla, R. & Viladomat, F. Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of *Narcissus* Alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 63, 87–179, (2006).
22. Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. Plant Sources of Galanthamine: Phytochemical and Biotechnological Aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23, 1170–1176, (2009).
23. Akram, M. N., Verpoorte, R., Pomahačová, B. Effect of bulb age on alkaloid contents of *Narcissus pseudonarcissus* bulbs. *South African Journal of Botany* 136, 182–189, (2021).
24. Breiterová, K., Koutová, D., Maříková, J., Havelek, R., Kuneš, J., Majorošová, M., Opletal, L., Hošťálková, A., Jenčo, J., Řezáčová, M., Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. *Plants* 9, 1–12, (2020).
25. Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochemistry Reviews* 20, 409–431, (2020).
26. Reis, A., Magne, K., Massot, S., Tallini, L.R., Scopel, M., Bastida, J., Ratet, P., Zuanazzi, J.A. Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Scientific Reports* 9, 1–11, (2019).
27. Breiterová, K. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění. Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, (2019).
28. Šafratová, M., Hošťálková, A., Hulcová, D., Breiterová, K., Hrabcová, V., Machado, M., Fontinha, D., Prudêncio, M., Kuneš, J., Chlebek, J., Jun, D. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research* 41, 208–218, (2018).

29. Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., Rubiralta, M., Quirion, J.C. A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry* 29, 2685–2687, (1990).
30. Maříková, J., Al Mamun, A., Shammari, L.A., Korábečný, J., Kučera, T., Hulcová, D., Kuneš, J., Malaník, M., Vašková, M., Kohelová, E., Nováková, L. Structure Elucidation and Cholinesterase Inhibition Activity of Two New Minor Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 26, 1279, (2021).
31. Cancer. World Health Organisation. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer> (staženo 17.6.2021).
32. Nádorová onemocnění. SZÚ. <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni> (staženo 17.6.2021).
33. Cedrón, J. C., Ravelo, Á. G., León, L. G., Padrón, J. M., Estévez-Braun, A. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 20, 13854–13863, (2015).
34. Roy, M., Liang, L., Xiao, X., Feng, P., Ye, M., Liu, J. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107, 615–624, (2018).
35. Cahlíková, L., Breiterová, K., Opletal, L. Chemistry and Biological Activity of Alkaloids from the Genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Molecules* 25, 1–20, (2020).
36. Hu, M., Yu, Z., Mei, P., Li, J., Luo, D., Zhang, H., Zhou, M., Liang, F., Chen, R. Lycorine Induces autophagy-associated apoptosis by targeting MEK2 and enhances vemurafenib activity in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)* 12, 138–155, (2020).
37. Wang, P., Yuan, H.H., Zhang, X., Li, Y.P., Shang, L.Q., Yin, Z., *et al.* Novel Lycorine Derivatives as Anticancer Agents: Synthesis and *In Vitro* Biological Evaluation. *Molecules* 19, 2469–2480 (2014).
38. Doskočil, I., Hošťálková, A., Šafratová, M., Benešová, N., Havlík, J., Havelek, R., Kuneš, J., Královec, K., Chlebek, J., Cahlíková, L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13, 394–398, (2015).
39. Yu, H., Qiu, Y., Pang, X., Li, J., Wu, S., Yin, S., Han, L., Zhang, Y., Jin, C., Gao, X., Hu, W. Lycorine Promotes Autophagy and Apoptosis via TCRP1/Akt/mTOR Axis Inactivation in Human Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 16, 2711–2723, (2017).
40. Sun, Y., Wu, P., Sun, Y., Sharopov, F.S., Yang, Q., Chen, F., Wang, P., Liang, Z. Lycorine possesses notable anticancer potentials in on-small cell lung carcinoma cells via blocking Wnt/ β -catenin signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 911–921, (2018).
41. Fürst, R. Narciclasine – an Amaryllidaceae Alkaloid with Potent Antitumor and Anti-Inflammatory Properties. *Planta Medica* 82, 1389–1394, (2016).
42. Yuan, Y., He, X., Li, X., Liu, Y., Tang, Y., Deng, H. Narciclasine Induces Autophagy-Mediated Gastric Cancer Cell Apoptosis Through The Akt/mTOR Signaling Pathway. <https://www.researchsquare.com/article/rs-235918/v1> (staženo 29.6.2021).
43. Pandey, S., Kekre, N., Naderi, J., McNulty, J. Induction of apoptotic cell death specifically in rat and human cancer cells by pancratistatin. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 33, 279–295, (2005).

44. McLachlan, A., Kekre, N., McNulty, J. & Pandey, S. Pancratistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* 10, 619–630, (2005).
45. Kekre, N., Griffin, C., McNulty, J., Pandey, S. Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56, 29–38, (2005).
46. Griffin, C., McNulty, J., Pandey, S. Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 38, 1549–1556, (2011).
47. Habartová, K., Cahlíková, L., Řezáčová, M., Havelek, R. The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications* 11, 1587–1594, (2016).
48. Nair, J. J., Bastida, J., Viladomat, F., Van Staden, J. Cytotoxic Agents of the Crinane Series of Amaryllidaceae Alkaloids. *Natural Product Communications* 8, 553–564, (2013).
49. Franková V. Demence u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 18, 30–33, (2017).
50. Ressler, P. Alzheimerova choroba—diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi* 4, 11–16, (2004).
51. Zvěřová M. *Alzheimerova demence*. Grada Publishing (2017).
52. Franková V. Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 16, 79–82, (2015).
53. Castellani, R. J., Rolston, R. K., Smith, M. A. Alzheimer Disease. *Disease a Month* 56, 484–546, (2010).
54. Hroudová, J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 18, 7–10, (2017).
55. Breijyeh, Z., Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25, 5789, (2020).
56. Lane, C. A., Hardy, J., Schott, J. M. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 25, 59–70, (2018).
57. Al Mamun, A., Uddin, M. S., Mathew, B., Ashraf, G. M. Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* 15, 1417–1420, (2020).
58. Cibičková, L., Palička, V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klinická biochemie a metabolismus* 13, 127–130, (2005).
59. Armstrong, R. A. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica* 57, 87–105, (2019).
60. Brunovský, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi* 2, 112–117, (2007).
61. Briggs, R., Kennelly, S. P., O'Neill, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine* 16, 247–253, (2016).
62. Jiráček, R., Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 19, 342–345, (2009).
63. Jiráček, R., Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství* 5, 176–178, (2009).
64. Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie* 18, 212–214, (2004).

65. Siatka, T., Adamcová, M., Opletal, L., Cahlíková, L., Jun, D., Hrabínová, M., Kuneš, J., Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Molecules* 22, 1181, (2017).
66. López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 71, 2521–2529, (2002).
67. Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F. & Bastida, J. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 2263–2266, (2008).
68. Cahlíková, L., Hrabínová, M., Kulhánková, A., Benešová, N., Chlebek, J., Jun, D., Novák, Z., Macáková, K., Kuneš, J., Kuča, K., Opletal, L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Natural Product Communications* 8, (2013).
69. Iannello, C., Pigni, N.B., Antognoni, F., Poli, F., Maxia, A., de Andrade, J.P., Bastida, J. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancratium illyricum* L. *Fitoterapia* 92, 163–167, (2014).
70. Ortiz, J. E., Garro, A., Pigni, N.B., Agüero, M.B., Roitman, G., Slanis, A., Enriz, R.D., Feresin, G.E., Bastida, J., Tapia, A. Cholinesterase-inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species. *Phytomedicine* 39, 66–74, (2018).
71. Ding, Y., Qu, D., Zhang, K.M., Cang, X.X., Kou, Z.N., Xiao, W., Zhu, J.B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* 19, 53–100, (2017).
72. Elgorashi, E. E., Stafford, G. I., Van Staden, J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica* 70, 260–262, (2004).
73. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., Hong, X. Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5, 16562–16574, (2015).
74. Kohelová, E., Maříková, J., Korábečný, J., Hulcová, D., Kučera, T., Jun, D., Chlebek, J., Jenčo, J., Šafratová, M., Hrabínová, M., Ritomská, A. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry* 107, 104567, (2021).
75. Szlávik, L., Gyuris, Á., Minárovits, J., Forgo, P., Molnár, J., Hohmann, J. Alkaloids from *Leucojum vernalis* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica* 70, 871–873, (2004).
76. He, J., Qi, W.B., Wang, L., Tian, J., Jiao, P.R., Liu, G.Q., Ye, W.C., Liao, M. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 922–931, (2013).
77. Jin, Z., Yao, G. Amaryllidaceae and Scellium alkaloids. *Natural Product Reports* 36, 1462–1488, (2019).

78. Mani, J. S., Johnson, J.B., Steel, J.C., Broszczak, D.A., Neilsen, P.M., Walsh, K.B., Naiker, M. Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A review. *Virus Research* 284, 197989, (2020).
79. Chen, H., Lao, Z., Xu, J., Li, Z., Long, H., Li, D., Lin, L., Liu, X., Yu, L., Liu, W., Li, G. Antiviral activity of lycorine against Zika virus *in vivo* and *in vitro*. *Virology* 546, 88–97, (2020).
80. Li, S.Y., Chen, C., Zhang, H.Q., Guo, H.Y., Wang, H., Wang, L., Zhang, X., Hua, S.N., Yu, J., Xiao, P.G., Li, R.S. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research* 67, 18–23, (2005).
81. Fendrich, Z. Malárie a její léčba. *Klinická farmakologie a farmacie* 19, 89–94, (2005).
82. Şener, B., Orhan, I., Satayavivad, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 17, 1220–1223, (2003).
83. Cedrón, J. C., Gutiérrez, D., Flores, N., Ravelo, Á. G., Estévez-Braun, A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 5464–5472, (2012).
84. Cho, N., Du, Y., Valenciano, A.L., Fernández-Murga, M.L., Goetz, M., Clement, J., Cassera, M.B., Kingston, D.G. Antiplasmodial alkaloids from bulbs of *Amaryllis belladonna* Steud. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28, 40–42, (2018).
85. Osorio, E. J., Berkov, S., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Cabezas, F., Bastida, J. *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters* 3, 161–163, (2010).
86. Kaya, G.I., Sarikaya, B., Onur, M.A., Somer, N.U., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J., Lauinger, I.L., Kaiser, M., Tasdemir, D. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochemistry Letters* 4, 301–305, (2011).
87. Evidente, A., Andolfi, A., Abou-Donia, A.H., Touema, S.M., Hammada, H.M., Shawky, E. and Motta, A. (–)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* 65, 2113–2118, (2004).
88. Habib, A.A.M. False-Positive Alkaloid Reactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69, 37–43, (1980).
89. Huang, S.D., Zhang, Y., Hong-Ping, H.E., Shi-Fei, L.I., Gui-Hua, T.A.N.G., Duo-Zhi, C.H.E.N., Ming-Ming, C.A.O., Ying-Tong, D.I., Xiao-Jiang, H.A.O. A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11, 406–410, (2013).
90. Jeffs, P. W., Abou-Donia, A., Campau, D. & Staiger, D. Alkaloids of the Amaryllidaceae. 27. Structures of 9-*O*-demethylhomolycorine and 5 α -hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium*. Assignment of Aromatic Substitution Patterns from ¹H-Coupled ¹³C Spectra. *Journal of Organic Chemistry* 50, 1732–1737, (1985).
91. Pigni, N. B., Ríos-Ruiz, S., Martínez-Frances, V., Nair, J.J., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products* 75, 1643–1647, (2012).
92. Almanza, G. R., Fernández, J.M., Wakori, E.W., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. Alkaloids from *Narcissus* cv. Salome. *Phytochemistry* 43, 1375–1378, (1996).

93. Nair, J. J., Van Staden, J., The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South African Journal of Botany* 136, 157–174, (2020).
94. Lewis, J. R. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports* 12, 339–345, (1995).
95. Hulcová, D., Breiterová, K., Siatka, T., Klímová, K., Davani, L., Šafratová, M., Hošťálková, A., De Simone, A., Andrisano, V., Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules* 23, 719, (2018).